

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANATLI HAYVAN KESİMHANESİ BİYOLOJİK
ARITMA SUYUNDA BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN
MİKROALG KÜLTÜRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Gamze KATIRCIOĞLU SINMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL

Eylül 2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI HAYVAN KESİMHANESİ BİYOLOJİK
ARITMA SUYUNDA BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN
MİKROALG KÜLTÜRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Gamze KATIRCIOĞLU SINMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 12 / 09 /2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Gamze KATIRCIOĞLU SINMAZ

12.09.2022

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin araştırma, planlanma, deneysel yönlendirme ve yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL'e,

Fikirleri ve yönlendirmeleri ile doktora tezime olan katkıları, akademik çalışmalarımda yardım ve destekleri için değerli hocalarım Prof. Dr. Abdil ÖZDEMİR ve Prof. Dr. Nurtaç ÖZ'e,

Doktora çalışmamda, laboratuvar konusunda yaşadığım aksaklıklardaki katkıları, manevi destekleri ve arkadaşlıkları için Büşra ERDEN'e, Meryem AKSU'ya ve N. Pınar TANATTI'ya

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini arkamda hissettiğim değerli annem Nazife KATIRCIOĞLU'na, değerli babam Adnan KATIRCIOĞLU'na ve sevgili kardeşim Gökhan KATIRCIOĞLU'na,

Doktora eğitimimin her aşamasına şahit olan, fikirlerini ve desteğini esirgemeyen, sevgili eşim Durmuş SINMAZ'a sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Biyoyakıtlar	6
2.2. Mikroalgler	4
2.2.1. Mikroalg gelişimi için gerekli şartlar ve besinler	6
2.2.1.1. Işık	7
2.2.1.2. Sıcaklık	8
2.2.1.3. pH	9
2.2.1.4. Tuzluluk	9
2.2.1.5. Karbon kaynağı ve CO ₂	10
2.2.2. Mikroalg büyüme dinamikleri	11
2.2.3. Mikroalg üretim sistemleri	12
2.2.4. Atıksuda mikroalg kültürünün geliştirilmesi	13
2.2.5. Literatürdeki atıksuda mikroalg geliştirme çalışmaları	13

2.2.6. Literatürdeki kesimhane atıksuyunda mikroalg geliştirme çalışmaları	16
2.3. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi	17
2.3.1. Biyodizel üretimi için mikroalg türü seçimi	18
2.3.2. Mikroalg yetiştirme yönteminin belirlenmesi	20
2.3.3. Mikroalg hasat yöntemleri	22
2.3.4. Lipit ekstraksiyonu	24
2.3.4.1. Lipit ekstraksiyonu için ön işlem	25
2.3.4.2. Lipit ekstraksiyon yöntemleri	27
2.3.5. Transesterifikasyon	28
2.3.6. Yağ asidi metil esterleri (FAME)	31
2.4. Mikroalg Enzim Aktiviteleri	32
2.4.1. Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROT)	32
2.4.2. Serbest radikallerin lipitlere etkisi	33
2.4.3. Antioksidan enzim aktiviteleri	33
2.4.3.1. LPO, lipit peroksidaz enzim aktivitesi	33
2.4.3.2. SOD, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi	34
2.4.3.3. APOD, askorbat peroksidaz enzim aktivitesi	34
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Mikroalg Kültürünün Yetiştirilmesinde Kullanılan Besin Ortamı.....	35
3.2. Kanatlı Hayvan Kesimhanesi Atıksuyunda Mikroalg Yetiştirilmesi..	36
3.2.1. pH şoklama çalışması	36
3.2.2. Alkali pH'ta <i>Chlorella vulgaris</i> kültürü geliştirme çalışmaları	36
3.2.3. Optimum şartlarda ışık yoğunluğunun etkisinin incelenmesi ..	36
3.2.4. Optimum şartlarda CO ₂ ilavesinin etkisinin incelenmesi	38
3.2.5. Optimum şartlarda kültür ortamına nanopartikül ilavesi ile <i>Chlorella vulgaris</i> 'in enzim aktiviteleri ve toplam lipit miktarları üzerine etkisinin belirlenmesi	38
3.3. Atıksu Analizleri	39
3.4. Yetiştirilen Biyokütlenin Analizleri	39

3.4.1. Toplam biyokütle analizi	39
3.4.2. Klorofil-a analizi	40
3.4.3. Yetiştirilen biyokütlenin hasat edilmesi	40
3.4.4. Hasat edilen biyokütlenin hücre parçalanması için uygulanan ön işlem	41
3.4.5. Lipit ekstraksiyonu ve toplam lipit miktarlarının hesaplanması	41
3.4.6. Transesterifikasyon işlemleri	41
3.4.7. GC ile yağ asidi metil ester profilinin belirlenmesi	42
3.5. Optimum Şartlarda Mikroalg Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	42
3.5.1. H ₂ O ₂ miktar analizi	43
3.5.2. Lipit peroksidasyon analizi (LPO)	43
3.5.3. Toplam askorbat peroksidaz analizi (APOD)	44
3.5.4. Toplam süperoksit dismutaz analizi (SOD)	44
3.6. Kinetik Hesaplamalar	45
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. pH Şoklama Çalışmaları	46
4.1.1. pH şoklama çalışmalarının biyokütle artışına etkisi	46
4.1.2. pH şoklama çalışmalarının toplam lipit miktarı ve yağ asidi oluşumuna etkisi	48
4.2. Alkali pH'ta Mikroalg Kültürü Geliştirme Çalışmaları	50
4.2.1. Alkali pH'ın biyokütle artışına etkisi	50
4.2.2. Alkali pH'ın nütrient giderimine etkisi	53
4.2.3. Alkali pH'ın toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi	55
4.3. Optimum Şartlarda Işık Yoğunluğunun Etkisinin Belirlenmesi	56
4.3.1. Işık yoğunluğunu çalışmalarının biyokütle artışına etkisi	57
4.3.1.1. 20 µmolphoton/m ² s	57
4.3.1.2. 60 µmolphoton/m ² s	58
4.3.1.3. 100 µmolphoton/m ² s	60
4.3.1.4. 140 µmolphoton/m ² s	61
4.3.1.5. Işık yoğunluğu değişiminin biyokütle artışına etkisi	62

4.3.2. Işık yoğunluğunu çalışmalarının nütrient giderimine etkisi	67
4.3.2.1. 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$	67
4.3.2.2. 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$	69
4.3.2.3. 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$	70
4.3.2.4. 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$	71
4.3.2.5. Işık yoğunluğunun nütrient giderimine etkisi	73
4.3.3. Işık yoğunluğunun toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi	75
4.4. CO ₂ İlavesinin Mikroalg Gelişimine Etkisinin İncelenmesi	80
4.4.1. CO ₂ ilavesinin biyokütle artışına etkisi	80
4.4.2. CO ₂ ilavesinin nütrient giderimine etkisi	82
4.4.3. CO ₂ ilavesinin toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi	83
4.5. Nanopartikül İlavesinin Mikroalg Enzim Aktivitelerine ve Toplam Lipit Miktarına Etkisinin Belirlenmesi	84
4.5.1. H ₂ O ₂ miktarları	84
4.5.2. MDA miktarları	85
4.5.3. SOD miktarları	86
4.5.4. APOD miktarları	87
4.5.5. Biyokütle oluşumuna etkisi	88
4.5.6. Toplam lipit miktarına etkisi	89
4.6. Kinetik Model Hesaplamaları	91
4.6.1. Mikroalg gelişim kinetikleri	91
4.6.2. Atıksudan nütrient giderimi kinetikleri	93
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APOD	: Askorbat peroksidaz enzimi
DME	: Dimetil eter
FAME	: Yağ asidi metil esteri
KOI	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
LPO	: Lipit peroksidasyon enzimi
MDA	: Malondialdehit
MUFA	: Tekli doymamış yağ asidi
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
ROT	: Reaktif oksijen türler,
SFA	: Doymuş yağ asidi
SOD	: Superoksit peroksidaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Işık yoğunluğunun fototrofik hücre büyüme üzerine etkisi	8
Şekil 2.2. Alg kültürlerinde karakteristik büyüme eğrisi	11
Şekil 2.3. Mikroalgden biyodizel eldesi	18
Şekil 2.4. Yağ asidi zincirleri	24
Şekil 2.5. Lipit molekülleri	25
Şekil 2.6. Transesterifikasyon prosesi	29
Şekil 3.1. pH şoklama çalışmasındaki pH değiştirme süresi ve periyodu	36
Şekil 3.2. Optimum ışık yoğunluğunu belirleme çalışmasındaki pH şoklama süresi ve periyodu	38
Şekil 4.1. pH şoklama çalışmasında zamana bağlı biyokütle grafiği. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	47
Şekil 4.2. pH şoklama çalışmasında zamana bağlı klorofil-a grafiği. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	48
Şekil 4.3. pH şoklama çalışmasında elde edilen yağ asidi metil esterlerinin toplam biyokütlerdeki oranları. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	49
Şekil 4.4. C5,2'nin içerdiği yağ asidi metil esterlerinin kromotogramı. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	50
Şekil 4.5. Alkali pH'ta zamana bağlı biyokütle miktarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	51
Şekil 4.6. Alkali pH'ta zamana bağlı klorofil-a miktarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	52
Şekil 4.7. NH_4^+ ve PO_4^{3-} konsantrasyonlarının zamana bağlı giderimleri. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	53
Şekil 4.8. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	57

Şekil 4.9. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	58
Şekil 4.10. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	59
Şekil 4.11. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	60
Şekil 4.12. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	60
Şekil 4.13. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	61
Şekil 4.14. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	62
Şekil 4.15. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	62
Şekil 4.16. Zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı biyokütle değişim grafikleri (BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için)	65
Şekil 4.17. Zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı klorofil-a değişim grafikleri (BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için)	66
Şekil 4.18. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	68
Şekil 4.19. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	68
Şekil 4.20. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	69
Şekil 4.21. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	70
Şekil 4.22. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	70
Şekil 4.23. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	71
Şekil 4.24. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	72

Şekil 4.25. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	72
Şekil 4.26. Işık yoğunluğuna bağlı NH_4^+ giderimi (%)	73
Şekil 4.27. Işık yoğunluğuna bağlı PO_4^{-3} giderimi (%)	74
Şekil 4.28. Işık yoğunluğuna bağlı kuru mikroalg biyokütlesindeki yağ asidi metil esterlerinin oranları (%)	78
Şekil 4.29. CO_2 ilavesinin biyokütle miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	81
Şekil 4.30. CO_2 ilavesinin klorofil-a miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	82
Şekil 4.31. Nanopartikül ilavesinin H_2O_2 miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	84
Şekil 4.32. Nanopartikül ilavesinin MDA miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	85
Şekil 4.33. Nanopartikül ilavesinin SOD miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	86
Şekil 4.34. Nanopartikül ilavesinin APOD miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	87
Şekil 4.35. Nanopartikül ilavesinin biyokütle oluşumuna etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	88
Şekil 4.36. Nanopartikül ilavesinin klorofil a,b,c miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	89
Şekil 4.37. Nanopartikül ilavesinin toplam lipid miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	90
Şekil 4.38. Kinetik hesaplamalardan elde edilen teorik biyokütle miktarları ve deneysel biyokütle miktarlarının karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	92
Şekil 4.39. Kinetik hesaplamalardan elde edilen teorik klorofil-a miktarları ve deneysel klorofil-a miktarlarının karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$	93

Şekil 4.40. Kinetik hesaplamalardan elde edilen zamana bağlı teorik PO_4^{-3} giderim verimleri ve deneysel PO_4^{-3} giderim verimlerinin karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ 94

Şekil 4.41. Kinetik hesaplamalardan elde edilen zamana bağlı teorik NH_4^+ giderim verimleri ve deneysel NH_4^+ giderim verimlerinin karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ 94



TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Biyodizel kaynakları için gerekli olan arazi miktarları ve yağ içerikleri	5
Tablo 2.2. Mikroalglerin özellikleri, avantajları ve dezavantajları	6
Tablo 2.3. Bazı mikroalg türlerinin lipid içerikleri ve lipid üretme kapasiteleri	19
Tablo 3.1. Biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu	35
Tablo 4.1. pH şoklama çalışmasında elde edilen toplam lipid miktarı ve kuru biyokütlerdeki lipid oranı. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	49
Tablo 4.2. NH_4^+ , NO_3^- , ve PO_4^{+3} konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	54
Tablo 4.3. Alkali şartlarda geliştirilen mikroalg kuru biyokütlerindeki toplam lipid ve FAME oranı. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	55
Tablo 4.4. Işık yoğunluğuna bağlı toplam mikroalgde gelişen toplam lipid (g) ve FAME oranları (%)	76
Tablo 4.5. C5,2 numunesinin farklı ışık yoğunluğunda içerdiği SFA, MUFA ve PUFA oranları (%)	79
Tablo 4.6. CO_2 ilavesinin amonyum ve fosfat giderimi oranlarına etkisi (%). Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	83
Tablo 4.7. CO_2 ilavesi ile mikroalgde gelişen toplam lipid miktarı (gr) ve FAME oranları (%). Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	83
Tablo 4.8. Nanopartikül ilavesinin biyokütle, toplam lipid ve kuru biyokütlerdeki lipid oranına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$	90
Tablo 4.9. Kinetik hesaplamalardan elde edilen biyokütle ve Klorofil-a için R^2 ve k değerleri	91
Tablo 4.10. Kinetik hesaplamalardan elde edilen PO_4^{-3} ve NH_4^+ için R^2 ve k değerleri	93

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Chlorella vulgaris*, mikroalg, biyodizel, FAME

Bu çalışmada, kanatlı hayvan kesimhanesi biyolojik arıtma suyunda biyodizel üretimi için *Chlorella vulgaris* mikroalg kültürünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kullanılan atıksu içerisinde bulunan zararlı organizmaların yok edilmesi amacıyla besin ortamına pH şoklama ve alkali pH yöntemleri uygulanmıştır. Optimum sonuç alınan numunelerde ışık yoğunluğunun mikroalg gelişimine ve kullanılan atıksuyun ileri arıtımına etkisi araştırılmıştır. Mikroalg gelişiminin takibi için biyokütle miktarı ve klorofil-a içeriği zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Atıksuyun arıtımı için ise zamana bağlı olarak nitrat, amonyum ve fosfat konsantrasyonları takip edilmiştir. Elde edilen mikroalg biyokütlelerinin biyodizel üretimine uygunluğu toplam lipit miktarlarına, kuru biyokütlerdeki lipit oranlarına ve yağ asidi metil ester içeriklerine göre yorumlanmıştır. Biyokütle ve lipit miktarları gravimetrik olarak ölçülmüştür. Klorofil-a, nitrat, amonyum ve fosfat miktarları spektrofotometrik yöntemler ile tespit edilmiştir. Lipitler transesterifikasyon prosesi ile biyodizel elde edilmiştir. Biyodizelin yağ asidi metil ester (FAME) türleri ve kompozisyonu GC-MS cihazı ile belirlenmiştir.

Araştırmada elde edilen bulgulara göre, kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda C5,2 pH şoklama şartlarında ve 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda en uygun lipit, yağ asidi metil esterler türleri ve içeriği elde edilmiştir. C5,2 numunesinde kuru biyokütlenin %20'si toplam lipit olarak hesaplanmıştır. C5,2 numunesinden elde edilen biyodizel C16:0, C18:0, C18:2 ve C18:3 yağ asidi metil esterler türlerini içermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, *Chlorella vulgaris* ile 100 ve 140 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında atıksudan amonyum ve fosfat konsantrasyonlarında %100'e varan giderim verimleri elde edilmiştir. Lipit miktarının artırılması için stres oluşturma amacıyla besin ortamına ilave edilen nanopartiküllerden $\text{TiO}_2 < 25$ nm partikül ilavesiyle lipit miktarında 12 mg lipit artışı ile kontrol numunesine göre %0,5 artış olmuştur.

DEVELOPMENT OF MICROALGAE CULTURE IN BIOLOGICALLY TREATED POULTRY SLAUGHTERHOUSE WASTEWATER FOR PRODUCTION OF BIODIESEL

SUMMARY

Keywords: *Chlorella vulgaris*, microalgae, biodiesel, FAME

In this study, it was aimed to develop *Chlorella vulgaris* microalgae culture for biodiesel production in poultry slaughterhouse biological treatment water. In order to destroy harmful organisms in the wastewater used, pH shock and alkaline pH methods were applied to the growth medium. The effect of light intensity on microalgae growth and advanced treatment of used wastewater was investigated in samples with optimum results. To monitor microalgae growth, biomass and chlorophyll-a concentrations were measured depending on time. The suitability of the microalgae biomass obtained for biodiesel production was interpreted according to total lipid amounts, lipid ratios in dry biomass, and fatty acid methyl ester contents. Biomass and lipid amounts were measured gravimetrically. Chlorophyll-a, nitrate, ammonium and phosphate amounts were determined by spectrophotometric methods. Biodiesel was obtained from lipids by the transesterification process. Fatty acid methyl ester (FAME) types and composition of biodiesel were determined by GC-MS.

According to the findings obtained in the study, the most suitable lipid, fatty acid methyl ester types and content were obtained in poultry slaughterhouse wastewater at C5.2 pH shock conditions and 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ light intensity. In the C5.2 sample, 20% of the dry biomass was calculated as total lipid. The biodiesel obtained from the C5.2 contains C16:0, C18:0, C18:2 and C18:3 fatty acid methyl esters types. According to the results obtained, removal efficiencies of up to 100% were obtained with *Chlorella vulgaris* at 100 and 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ light intensities from wastewater at ammonium and phosphate concentrations. In order to increase the lipid amount, with the addition of $\text{TiO}_2 < 25$ nm particles, one of the nanoparticles added to the nutrient medium to create stress, there was a 12 mg lipid increase in the lipid amount and 0.5% increase compared to the control sample.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Biyoyakıtlar yağlı tohum bitkilerinden, atık yağlardan ve mikroalgal biyokütleden üretilmektedirler (Biernat ve ark., 2013). Diğer biyodizel kaynaklarına göre mikroalgler; yüksek lipit içeriği, hızlı biyokütle oluşturmaları ve çok daha az arazi gereksinimi gibi avantajlı özelliklere sahiptirler (Yin ve ark., 2020).

Fotosentez ile çoğalan mavi yeşil mikroalglerin gelişimi için bazı parametreler hayati önem taşımaktadır. Işık, sıcaklık, pH, karbon, azot ve fosfor kaynakları mikroalg yaşamının devamı için en önemli faktörlerdir (Chisti, 2007; Ananthi ve ark., 2021). Mikroalg yetiştirilen sistemler genel olarak açık ve kapalı sistemler olarak sınıflandırılırlar. Açık mikroalg üretim sistemleri; kanal, dairesel, eğimli ve karışimsız havuzlardan; kapalı sistemler ise borulu, dikey plakalı, yatay plakalı, dairesel plakalı, düz plakalı, fermenter tipi ve iç aydınlatmalı sistemlerden oluşmaktadır (Mata ve ark., 2010).

Mikroalgler genellikle türlerine uygun olarak seçilen yapay besin ortamlarında yetiştirilirler. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda biyodizel üretimi amacıyla mikroalg yetiştirilirken, farklı sektörlere ait atıksuların besin ortamı olarak kullanılması yaygınlaşmıştır. Atıksudan azot ve fosfor gibi mikroalg büyümesi için gerekli olan besinler sağlanmaktadır (Chiu ve ark., 2015).

Son yıllarda kanatlı hayvan kesimhane atıksuları kullanılarak mikroalg kültürü geliştirmeye yönelik çalışmalar literatürde yerini almıştır. Bu atıksular farklı ön arıtmalardan geçirilerek farklı mikroalg türlerinin yetiştirilmesinde kullanılmışlardır (Hernández ve ark., 2016; Taşkan, 2016; Azam ve ark., 2020; Terán Hilares ve ark., 2021). Literatürde *Chlorella vulgaris*'in farklı sektörelere ait atıksularda

geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur ancak kanatlı hayvan kesimhanesinin biyolojik arıtıma çıkış prosesinden alınan atıksular ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada kullanılan su içerisinde, rotifer gibi mikroalg gelişimine zarar veren organizmalar bulunmaktadır. Besin ortamında bulunan bu organizmaları yok etmek amacıyla pH şoklama yöntemi ve alkali pH yöntemleri uygulanarak *Chlorella vulgaris* kültürü geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen optimum mikroalg geliştirme şartlarında farklı ışık yoğunluklarının *Chlorella vulgaris* gelişimine ve kullanılan atıksuyun ileri arıtımına etkisi araştırılmıştır. Zamana bağlı olarak *Chlorella vulgaris*'in biyokütle artışı ve atıksuyun ileri arıtım verimi amonyum ve fosfat giderimlerinin kinetik modeli oluşturularak incelenmiştir. Farklı ışık yoğunluklarında elde edilen biyokütlenin toplam lipid miktarları, kuru biyokütle içerisindeki lipid oranları ve oluşturduğu yağ asidi metil esterlerinin (FAME) tür ve miktarları incelenmiştir. Elde edilen biyodizelin kalitesi literatürdeki çalışmalar ve Avrupa standartları ile kıyaslanmıştır. *Chlorella vulgaris* gelişimini ve yağ asidi içeriğini artırmak amacıyla optimum şartlarda CO₂ ilavesinin biyokütle ve arıtım verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Benzer amaçla mikroalg gelişim ortamına ilave edilen nanopartiküllerin *Chlorella vulgaris*'in biyokütle miktarı, toplam lipid miktarı ve yağ oranı üzerine olan etkisi incelenmiştir. Nanopartiküllerin *Chlorella vulgaris* lipidleri üzerindeki etkisi lipid peroksidasyon miktarları malondialdehit (MDA) cinsinden ve savunma mekanizmaları için sentezlenen Toplam süperoksit dismutaz (SOD) ve Toplam askorbat peroksidaz (APOD) enzim aktivitelerinin seviyeleri ölçülerek belirlenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyoyakıtlar

Atmosferik CO₂ seviyesi, fosil yakıtların yakılması nedeniyle sanayi öncesi CO₂ seviyesinin %148'ine ulaşmıştır (WMO, 2020). Enerji ihtiyacı küresel olarak artmaya devam ederken, fosil yakıt kullanımı da artmaya devam edecektir. CO₂ emisyonlarını azaltmak, öncelikle yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımına odaklanarak mümkündür. Sürdürülebilir, çevre dostu ve karbon kaynağı içermeyen enerji kaynaklarını kullanmak amacıyla araştırmalar bu doğrultuda artmıştır. Alternatif enerji kaynakları; güneş enerjisi, rüzgar enerjisi, jeotermal enerji, hidroelektrik enerji ve biyoyakıtlar olarak sınıflandırılmaktadır (Almutairi, 2015).

Biyoyakıt eldesi için kullanılan biyokütle kaynakları, fiziksel, kimyasal veya biyokimsal işleme derecesine bağlı olarak üç gruba ayrılmaktadırlar.

- Birincil enerji kaynakları: Mısır, kanola, hindistan cevizi, soyafasülyesi, odun, saman,
- İkincil enerji kaynakları: Çamur, gübre, arıtma çamuru ve diğer organik atıklar
- İşlenmiş enerji kaynakları: Çeşitli endüstrilerin atıklarından ve yan ürünlerinden oluşmaktadır (Biernat ve ark., 2013).

Yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyoyakıtlar, yağlı tohum bitkilerinden ve mikroalgal biyokütleden üretilmektedir. Kullanılan biyokütlenin yenebilen ve yenmeyen kısımlarından farklı tipte biyoyakıtlar elde edilmektedir. Biyokütlenin nişasta içeren kısımlarından fermentasyon prosesi ile etanol ve bütanol elde edilmektedir. Biyokütlenin lipit içeren kısımlarından ise transesterifikasyon prosesi ile biyodizel elde edilmektedir. Kısa yağ asitleri, tarımsal atıkların ve bitkilerin yenmeyen

kısımlarının fermentasyonu ile elde edilmektedir. Aynı şekilde bu biyokütlelerden anaerobik fermentasyon yoluyla metan oluşturulmaktadır. Dimetil eter (DME), metanol ve dizel ise gazlaştırma yöntemi kullanılarak yoluyla elde edilmektedir (Pittman ve ark., 2011). Üretilmesi planlanan biyoyakıt ve yan ürünlerin türlerine uygun olan bir biyokütlenin seçimi önem taşımaktadır. Seçilen enerji kaynaklarından elde edilmesi planlanan biyoyakıt türüne uygun bir proses tasarlanmalıdır (Biernat ve ark., 2013).

2.2. Mikroalgler

Güneş enerjisi, fotosentez vasıtasıyla klorofil içeren yeşil yapraklı bitkilerde ve alglerde organik madde şeklinde birikir ve enerji üretimi için hammadde olarak kullanılabilecek katı bir form olan biyokütleye dönüştürülür (Biernat ve ark., 2013). Saf mikroalg kültürünün izole edilmesi ilk olarak Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck (1890) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bakteri bulunmayan kültürlerden ilk olarak Chlorella ve Scenedesmus türlerini saf kültür halinde izole etmiştir (Andersen, 2005). Mikroalglerden biyodizel üretimi, mikroalglerin bitki kaynaklarına göre avantajlı özelliklere sahip olması nedeniyle umut verici olarak kabul edilmektedir. Mikroalgler yağlı tohumlu bitkilere oranla daha yüksek fotosentetik verimlilik, lipit içeriği, hızlı biyokütle oluşturma ve daha az arazi gereksinimi gibi avantajlara sahiptir (Mata ve ark., 2010; Jaimes-Duarte ve ark., 2012; Komolafe ve ark., 2014). Aynı alan ölçüsüne sahip arazide yetişen yağlı tohumlu bitkilerinden ve mikroalglerden elde edilen yağ miktarı karşılaştırıldığında; mikroalglerin yağ içeriği mısır yağından 796 kat, soya yağından 306 kat ve hurma yağından 23 kat daha fazladır (Chisti, 2007). Tablo 2.1.'de de gösterildiği gibi mikroalglerin yağ içeriğinin yüksek olmasının yanında, araziye ekilen yağlı tohum bitkilerinden ya da ağaçta yetişen biyodizel hammaddelerinden çok daha hızlı çoğalmaktadırlar. Uygun fiziksel ve kimyasal şartlar sağlandığında mikroalgler kütlelerini 24 saat içerisinde iki katına çıkartabilmektedirler (Andersen, 2005).

Tablo 2.1. Biyodizel kaynakları için gerekli olan arazi miktarları ve yağ içerikleri (Chisti, 2007)

Ürün	Yağ miktarı (L/ha)	Gerekli arazi alanı (M ha)
Mısır	172	1540
Soya fasulyesi	446	594
Kanola	1190	223
Hindistan cevizi	2689	99
Palm yağı	5950	45
Mikroalg ^a	58700	4,5
Mikroalg ^b	136900	2

a (kuru biyokütlesinin %30'u ağırlıkça yağ olan)

b (kuru biyokütlesinin %70'i ağırlıkça yağ olan)

Bununla birlikte, arazi kullanımı ve gıda talebi sebebiyle besin amaçlı kullanılan yetiştirilen biyodizel kaynaklarının kullanım amacının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle, besin maddesi amacıyla kullanılan kaynaklardan biyodizel üretimi yaygın olarak uygulanmamaktadır. Arazi kullanımı, arazi değişikliği, ekili alan verimi, biyoçeşitlilik kaybına ve arazi rekabetine neden olabilmektedir. Kullanılan arazi miktarını azaltmak için yenilenebilir bir hammaddeye ihtiyaç duyulmaktadır (Yin ve ark., 2020).

Mikroalglerin temel özellikleri, yetiştirilme esnasındaki sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 2.2.'de verilmiştir. Yağ içeriği ve büyüme hızının yüksek olması sebebiyle içerdiği pigment, yağ, protein gibi değerli ürünlerin elde edilmesi için uygun bir hammaddedir (Yin ve ark., 2020). Fototrofik mikroalglerin havadaki karbondioksiti kullanarak gelişmesi çevresel açıdan oldukça önemlidir. Benzer şekilde atıksu kullanılarak geliştirilen mikroalg kültürleri çift yönlü çevresel fayda sağlamaktadır. Hızlı gelişen mikroalglerin, içerdiği ürünlerin ekstrakte edilmesi amacıyla geliştirilirken tek bir tür olarak kontrol edilmesinin zorlukları mevcuttur. Saf kültür yetiştirilmesi amaçlanan alg geliştirme sistemlerinin kültürün başka bir tür ile kontamine olmaması için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Tablo 2.2. Mikroalglerin özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Yin ve ark., 2020)

Özellikleri	Avantajları	Dezavantajları
Negatif yüklüdürler ve boyutları 5-50 µm arasındadır.	Yüksek yağ içeriği, fotosentez hızı ve büyüme verimliliğine sahiptirler.	Mikroorganizma kontaminasyonu sebebiyle saf kültür yetiştirilememe riskine sahiptir.
Daha fazla yüzey alanına sahiptirler.	Fotosentez yoluyla biyokütle sentezlemek için; su, CO ₂ ve güneş ışığından yararlanma kapasitesine sahiptirler.	Yüksek sıcaklık açık havuzlu alg yetiştirme sistemlerinde ciddi bir tehdittir.
Fazla miktarda klorofil pigmentine, belirgin çekirdek ve hücre zarı yapısına sahiptirler.	Verimsiz arazilerde yetiştirilebilirler dolayısıyla tarım arazilerinin biyodizel üretimi dışında kullanılması mümkündür.	Fazla miktarda su ve besin ihtiyacına sahiptirler.
Fotosentetik ökaryotik veya fotosentetik prokaryotik organizmalardır.	Fotoototrofik mikroalgler, karasal bitkilerden 10-50 kat daha hızlı büyüyebilir ve böylece daha yüksek bir karbondioksit fiksasyon oranı elde edebilir.	Mikroalg biyokütlesi hasadı ve değerli ürünlerin ekstraksiyonu yüksek maliyetlidir.
Tek hücreli veya çok hücreli yapıya sahiptirler	Pigment, protein, yağ gibi değerli ürünlerin ekstraksiyonu için uygun bir hammaddedir.	
	Pestisit veya herbisit uygulamasına gerek yoktur.	
	Atıksuyudan kirlilik giderimi kapasitesine sahiptir.	

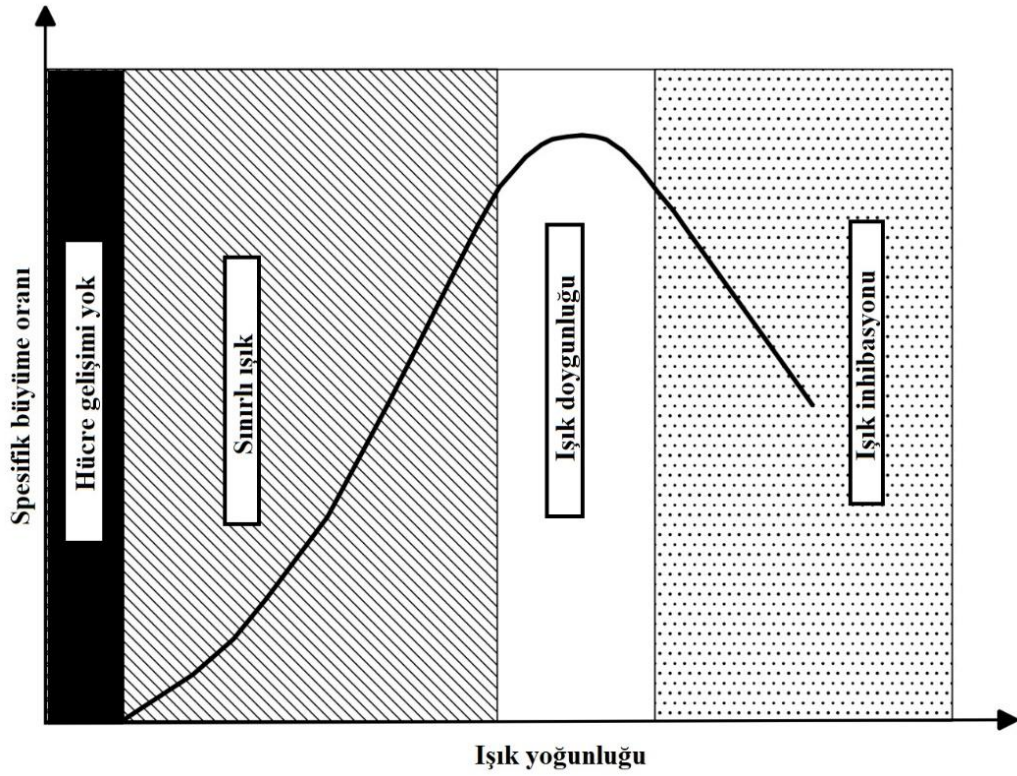
2.2.1. Mikroalg gelişimi için gerekli şartlar ve besinler

Mikroalg gelişimi için hayati faktörler; ışık, sıcaklık, pH, tuzluluk, CO₂, su, nütrientler (azot, fosfor, potasyum, magnezyum) ve yeterli miktarda bazı ağır metallerdir (Andersen, 2005; Chisti, 2007; Ananthi ve ark., 2021). Farklı sınıflara ait mikroalg türleri için bazı gelişim şartları öne çıkmaktadır. Örneğin; tuzlu su algleri için sıcaklık

ve tuzluluk oldukça önemlidir. Tatlı su algleri ise genellikle sıcaklığa daha az duyarlıdır. Ancak pH ve alkalinite tatlı su algleri için önemli hayati parametrelerdir (Andersen, 2005). Mikroalglerin izole edildikleri veya uzun süre adapte oldukları ortam koşullarını korumak uzun süreli kültür gelişimi için göz önünde tutulmalıdır.

2.2.1.1. Işık

Işık, fotosentez yapan mikroalgler için hayati parametrelerden birisidir. Yeterli besinlerin varlığında mikroalg kültürünün gelişimi için ışığın varlığı ve ışık yoğunluğu oldukça önemlidir. Yetersiz veya yüksek ışık yoğunlukları özellikle mavi yeşil mikroalg kültürlerinin gelişimleri üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Şekil 2.1.1.'de ışık yoğunluğunun fotosentetik hücrelerin gelişimi üzerine etkisini gösteren bir büyüme eğrisi verilmiştir (Ogbonna ve Tanaka, 2000). Işık yokluğunda fotosentez gerçekleşmemesi sebebiyle mikroalg gelişimi olmamaktadır. Işık yoğunluğunun artması ile birlikte mikroalg büyüme hızı da artış göstermektedir. Mikroalglerin ışık varlığında karbondioksiti fotosentez yoluyla metabolizma için aktif bileşenlere dönüştürme ile geliştiklerinden, ışık yoğunluğu arttıkça daha fazla biyokütle oluşturmaları beklenmektedir (Chang ve ark., 2016). Doygunluk noktasına kadar artan ışık yoğunluğu, mikroalg kültürünün büyüme hızında da artış sağlamaktadır. Ancak bir noktada ışık doygunluğuna ulaşan kültür ortamında alg büyümesi sabit kalmaktadır. Doygunluk noktasının üzerindeki ışık yoğunluğuna maruz kalan mikroalg kültürlerinde fotoinhibasyon gerçekleşmektedir (Andersen, 2005). Fazla ışığın gelişimi inhibe edici etkisi sonucu alg ölümlerinin artması ile birlikte büyüme hızı gittikçe azalmaktadır. Aşırı ışık yoğunluğu bir noktadan sonra mikroalg büyümesini engellemektedir (Ogbonna ve Tanaka, 2000).



Şekil 2.1. Işık yoğunluğunun fototrofik hücre büyüme üzerine etkisi (Ogbonna ve Tanaka, 2000)

2.2.1.2. Sıcaklık

Fotosentezin sıcaklığa bağlı bir dizi fizikokimyasal reaksiyon olmasından dolayı, kültür ortamı sıcaklığı mikroalg büyümesi için önemli bir sınırlayıcı faktördür. Mikroalgler, çeşitli sıcaklıkları tolere edebilirler ancak sıcaklık değişimlerine tepkileri; beslenme gereksinimlerini, metabolizmanın hızlarını ve hücre bileşimlerini etkilemektedir (Zhang, 2015). Sıcaklık optimum mikroalg gelişimi için 20-30°C arasında olmalıdır. Bu sıcaklık aralığının ± 5 °C seviyelerinde mikroalgler hayati fonksiyonlarını sürdürebilecek dayanıklılığa sahiptirler. Ancak çok yüksek ve çok düşük sıcaklıkların mikroalg gelişimleri üzerine inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Chisti, 2007). Düşük sıcaklıklar mikroalg gelişimini yavaşlatmaktadır. Çoğu mikroalg türü 15 °C'ye kadar düşük sıcaklıkları kolaylıkla tolere edebilmektedirler ancak türe göre değişen optimum sıcaklıkların 2-4°C altında veya üstünde kültür kaybı gerçekleşmektedir. Yüksek sıcaklığın ise mikroalg metabolik davranışlarını ve solunum kapasitesini engelleyici etkisi bulunmaktadır. Aynı zamanda yüksek sıcaklık suda düşük CO₂ çözünürlüğüne neden olmaktadır (Zhang, 2015). Mikroalglerin

büyüme hızı, sıcaklık artışları ile birlikte türlerine bağlı olarak değişen optimum değerlere kadar artmaktadır. Ancak optimum sıcaklığa ulaştıktan sonra büyüme hızları düşmektedir (Dickinson ve ark., 2017). Bu sebeple mikroalg kültür ortamlarının sıcaklıkları belli aralıklarda tutulmalı ve kontrol edilmelidir.

2.2.1.3. pH

Mikroalg gelişimi sırasında dikkat edilmesi gereken önemli çevresel faktörlerden biri pH'dır. Bunun en önemli nedeni, pH'ın mikroalgal büyüme için CO₂'nin çözünürlüğünü ve dolayısıyla kullanılabilirliğini belirleyebilmesidir (Andersen, 2005). CO₂ suda çözündüğünde karbonik asit halinde ortamda bulunmasından dolayı, CO₂/karbonik asit tüketimi pH'ı yükseltir ve daha bazik bir ortam oluşur (Dickinson ve ark., 2017). Besinler mikroalgler tarafından metabolize edildikçe ortamın pH'ı değişir. Amonyum mikroalgler tarafından tüketildiğinde hidrojen açığa çıkar ve ortamın pH'ının düşmesine neden olur. Buna karşılık, nitrik ve fosforik asitlerin tüketimi de pH'ın yükselmesine neden olur (Dickinson ve ark., 2017). Mikroalgal aktivite sırasında fotosentezin etkisi ile karbondioksitin azalmasına bağlı olarak kültür ortamının pH'ı yükselme eğilimindedir (Andersen, 2005). Bu nedenle, mikroalg yetiştirilirken pH'ın dikkatli bir şekilde izlenmesi hayati önem taşır.

2.2.1.4. Tuzluluk

Ortamdaki tuzluluğun yüksek olması tatlı su alglerinin yaşamını tehdit etmektedir. Artan tuzlulukla birlikte oluşan ozmotik basınç da alg yaşamı için tehdit oluşturmaktadır. Tatlı su mikroalgi olan *Chlorella vulgaris* bazı adapte olmuş türleri hariç yüksek tuzluluğa genellikle fazla tolerans gösterememektedir (Luangpipat ve Chisti, 2017). Ortamın yüksek tuzluluğuna bir tepki olarak mikroalgin lipid yağ asidi profilinde değişiklikler meydana gelir. Adaptasyon için mikroalg yapısında gerçekleşen bu değişikliklerin temel sebebi hücre zarını ve sıvısını koruyarak tahribatın önüne geçmektir (Zhila ve ark., 2011).

2.2.1.5. Karbon kaynağı ve CO₂

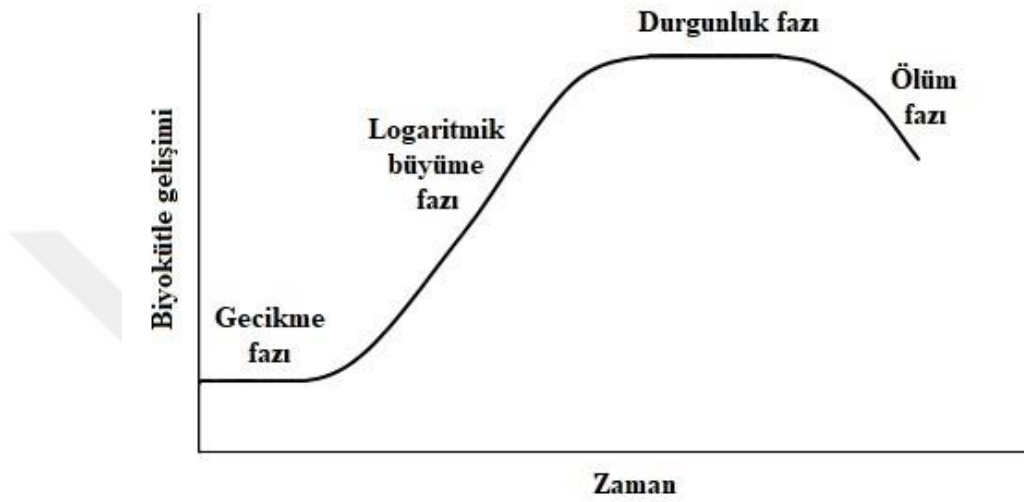
Mavi yeşil algler, klorofil a ve b pigmentlerini içeren tek hücreli organizmadır ve CO₂'yi O₂'ye dönüştürmek için yüksek fotosentetik etkinliğe sahiptirler. Bu nedenle gelişimleri için fotosentez yaparak havadaki CO₂'i tüketirler (Singh ve Singh, 2014). Havuz gibi açık mikroalg yetiştirme sistemlerinde ortam havasında bulunan CO₂, mikroalgler tarafından kullanılmaktadır. Ancak kapalı sistemlerde mikroalg gelişimi için bir karbon kaynağının ilave edilmesi gerekmektedir (Bhola ve ark., 2014). Fototrofik mikroalgler, glikoz üretimi için güneş ışığını ve karbon kaynağı olarak genellikle CO₂'yi kullanırlar. Aynı zamanda mikroalgler, gelişim ortamında bulunan inorganik karbonları; Na₂CO₃ ve NaHCO₃ gibi çözünür karbonatları da kullanılmaktadırlar (Dickinson ve ark., 2017). İnorganik karbon sulu ortamlarda; sıcaklık ve pH tarafından kontrol edilen reaksiyonlar yoluyla birbirine dönüştürülebilen CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ ve CO₃²⁻ gibi çeşitli kimyasal formlarda bulunabilirler. Mikroalg hücreleri, daha zayıf bir karbon kaynağı olmasına rağmen, CO₂ yerine HCO₃⁻ kullanmayı tercih etmektedirler (Zhang, 2015).

2.2.1.6. Nütrientler

Özellikle azot, fosfor ve az miktarda (demir gibi) bazı eser elementler mikroalgal büyüme için gereklidir. Genel mikroalg formülü CO_{0.48}H_{1.8}N_{0.11}P_{0.01} (Chisti, 2007; Zhang, 2015), C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P (Xu ve ark., 2014), ve C₁₀₆H₂₆₃O₁₁₀N₁₆ gibi farklı formüller ile temsil etmektedir. Mikroalg formülüne göre azot ve fosfor oranı ihtiyacı 16/1 olarak kabul edilmektedir. Azot ve fosfor, mikroalglerin metabolizma aktivitesi ve hücresel büyümesi için hayati önem taşımaktadır. Alg hücrelerinde proteinler ve nükleik asit oluşumu için azot kullanılırken; DNA, RNA, fosfolipitler, fosfoproteinler ve polifosfat oluşumu için fosfat kullanılmaktadır (Juneja ve ark., 2013; Shahid ve ark., 2020).

2.2.2. Mikroalg büyüme dinamikleri

Optimum fiziksel ve kimyasal şartların sağlandığı bir kültür ortamına aşıl原因an mikroalg hücrelerinin gelişimi Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi zamanla farklı dinamikler göstermektedir.



Şekil 2.2. Alg kültürlerinde karakteristik büyüme eğrisi (Çirik ve Gökpınar, 2008)

Mikroalg hücrelerinin kültür ortamına aşıl原因masıyla “gecikme fazı” adı verilen bir evre boyunca mikroalg miktarında hemen hemen hiç artış gözlenmez. Bunun nedeni mikroalg hücrelerinin kültür ortamına adaptasyon sürecidir. Gecikme fazının ne kadar süreceği aşıl原因an mikroalg hücrelerinin büyümenin hangi fazında olduğu ile doğrudan ilgilidir. Gecikme fazında yavaş artış gösteren mikroalg miktarı belirli bir seviyeye ulaşınca “logaritmik büyüme fazına” ulaşılır. Logaritmik büyüme fazında, mikroalg hücreleri hızlı bir artış gösterirler. Sabit hacimde kesikli kültürlerde bu artış ortamdaki besin tükenene kadar devam etmektedir. Mikroalg hücrelerinin artışı belirli bir noktaya ulaştığında büyüme evresini sona erdiren sınırlayıcı faktörler devreye girer. Besin azlığı, besin yokluğu, yüksek hücre konsantrasyonu sonucu oluşan ışık ulaşımının sınırlanması, ortamda artan metabolik artıklar sonucu oluşan toksik etkiler gibi sınırlayıcı faktörler mikroalgal büyümenin devam etmesini engeller. Bu evreye “durgunluk fazı” adı verilir. Ölü hücrelerin sayısının yükselmesiyle sabit kalan hücre konsantrasyonunda azalış başlamaktadır. Bu azalma sebebiyle “ölüm fazı” adı verilen son evreye ulaşılır (Çirik ve Gökpınar, 2008).

2.2.3. Mikroalg üretim sistemleri

Mikroalg üretimi için geliştirilen sistemler genel olarak askıda ve kapalı sistemler olarak sınıflandırılırlar. Açık mikroalg üretim sistemleri; kanal, dairesel, eğimli ve karışimsız havuzlardır. Kapalı sistemler ise borulu, dikey plakalı, yatay plakalı, dairesel plakalı, düz plakalı, fermenter tipi ve iç aydınlatmalı olarak kategorize edilmektedirler (Mata ve ark., 2010). Hem açık hem kapalı sistemler için aydınlatma direkt güneş ışığı ya da yapay ışık kaynağı kullanılarak yapılabilmektedir. Askıda ve kapalı sistemlerin birbirlerine kıyasla bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Askıda mikroalg gelişimi yapılan büyük çaplı sistemlerde yetiştirilen biyokütle yoğunluğu az olmaktadır. Mikroalg yoğunluğunun az olması, yetiştirilen mikroalgin hasat edilmesi (susuzlaştırılması) için harcanacak enerjinin daha yüksek olacağı anlamını taşımaktadır (Katarzyna ve ark., 2015). Açık sistemlerin bir diğer dezavantajı da kontaminasyon riskinin kapalı sistemlere göre yüksek olmasıdır (Chisti, 2007). Askıda sistemlerin sebep olduğu bazı problemler sebebiyle son yıllarda askıda olmayan sistemlere karşı ilgi artmıştır. Bununla birlikte kapalı sistemlerde mikroalg geliştirilmesinin işletme maliyeti açık sistemlere oranla daha maliyetlidir. Kapalı sistemlerde karbondioksit ilavesi, homojenlik için karıştırma ve aydınlatma gibi ek yatırım maliyetleri bulunmaktadır. Kapalı sistemlerin en önemli avantajı ise kontaminasyon riskinin düşük olmasıdır (Suali ve Sarbatly, 2012).

Büyük hacimlerde mikroalg üretimi açısından açık havuzlar tercih edilmektedir. İşletilmesinin kapalı sistemlere göre daha kolay olması ve elde edilen mikroalg miktarının daha büyük hacimlerde olması endüstriyel alg üretiminde açık havuzların tercih edilmesinin genel sebebidir (Katarzyna ve ark., 2015). Mikroalg ve atıksu içeren sistemlerde de genellikle karışık mikroalg kültürleri tercih edilmiştir. Çoğunlukla bu çalışmalarda askıda alg yetiştirilen sistemler kullanılmıştır. Algal biyoyakıt üretim sistemlerinde de aynı şekilde büyük hacimlerde mikroalg yetiştirilebilmesinin avantajı ile açık havuzlar kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2022).

2.2.4. Atıksuda mikroalg kültürünün geliştirilmesi

Mikroalgler genellikle biyodizel üretmek için yapay besin ortamlarında yetiştirilirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar atık sularda da gelişebileceklerini göstermektedir (Mulbry ve ark., 2008; Sydney ve ark., 2011; Wu ve ark., 2012; Taşkan, 2016; Gao ve ark., 2019; Hu ve ark., 2019).

Atıksudaki azot ve fosfor, mikroalg kültürünün gelişimi için değerli besin kaynaklarıdır. Mikroalg kültürü geliştirilirken atık suların arıtılması da sağlanmaktadır. Bu koşullar altında, atıksudan azot ve fosfor gibi mikroalg büyümesi için gerekli olan besinler sağlanır (Chiu ve ark., 2015). Azot atıksularda mikroalglerin tüketebileceği nitrat, nitrit ve amonyum gibi farklı formlarda bulunmaktadır. Hızlı büyüme oranına sahip mikroalgler, azot kaynağı olarak öncelikle NH_4^+ kullanırlar (Zhang, 2015; Sharma ve ark., 2020). Mikroalglerin atık sudaki NO_3^{2-} , NH_4^+ ve PO_4^{3-} tüketimleri farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Sydney ve ark., 2011; Wu ve ark., 2012; Cabanelas ve ark., 2013; Gao ve ark., 2015; Su ve ark., 2016). Biyodizel üretimi için mikroalg kültürü geliştirilmesi amacıyla; kanalizasyon atıksuyu (birincil ve ikincil atıksu), tarımsal atık su, endüstriyel atık su (Wu ve ark., 2012) ve sentetik atıksu (Ji ve ark., 2018; Gao ve ark., 2019) gibi farklı atık su türleri kullanılmıştır. Mikroalg kültürü geliştirilmesi amacıyla yüksek besin içeriği ve düşük ağır metal konsantrasyonları nedeniyle evsel atıksular çalışmalarda tercih edilmiştir. Son yıllarda kanatlı hayvan kesimhane atıksuları kullanılarak mikroalg kültürü geliştirmeye yönelik çalışmalar literatürde yerini almıştır. Mikroalg geliştirilen bu çalışmalarda kullanılan kanatlı kesimhane atıksuları; arıtılmamış (Hernández ve ark., 2016), filtrelenip otoklavlanarak sterilize edilmiş (Taşkan, 2016), otoklavlanmış (Azam ve ark., 2020) veya asit çökeltme ile ön arıtmadan sonra kullanılmış (Terán Hilaes ve ark., 2021) atıksulardır.

2.2.5. Literatürdeki atıksuda mikroalg geliştirme çalışmaları

Son yıllarda özellikle biyoyakıt üretimi amacıyla mikroalg kültürünün yetiştirildiği çalışmalarda mikroalg besin ortamı olarak arıtılmış, suni olarak hazırlanmış, ön

işlemden geçirilmiş, kısmi olarak arıtılmış ya da ham atıksular kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalardan bazıları hakkında literatür incelemesi aşağıda verilmiştir.

Bir çalışmada ham ve biyolojik olarak arıtılmış mandıra atıksuları kullanılarak naylon bir yüzey üzerinde tutundurularak biyofilm şeklinde mikroalg kültürü geliştirilmiştir. Naylon bir ağ üzerinde biyofilm oluşturan mikroalg biyokütlesi pompa yardımıyla ham veya biyolojik olarak arıtılmış mandıra atıksuları ile beslenmiştir. Çalışmada bir kaç mikroalg türünün bir arada bulunmasıyla oluşturulan karışık kültür ile çalışılmış. Atıksuyun arıtılmış veya arıtılmamış olmasının mikroalg gelişimine etkisi araştırılmıştır (Mulbry ve ark., 2008).

Literatürdeki bir çalışmada ikincil evsel atıksu arıtım çıkış suyu kullanılarak yirmi farklı mikroalg suşunun büyüme parametreleri incelenmiştir (Sydney ve ark., 2011). Elde edilen ilk sonuçlara göre türü bilinmeyen LEM-IM 11 adı verilen bir suş, *Botryococcus braunii* ve *Chlorella vulgaris* ile fotobiyoreaktörde mikroalg üretim çalışmalarına devam edilmiştir. Kullanılan atıksudan azot ve fosfor giderimleri incelenmiştir. Transesterifikasyon yoluyla elde edilen yağ aside metil esterlerinin tür ve miktarları incelenmiştir.

Wu vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada endüstriyel atıksu kullanılarak düşük ışık yoğunluğunda ($25 \mu\text{mol photon/m}^2$) *Chlamydomonas sp* ve *Desmodesmus sp.* türleri yetiştirilmiştir. Kullanılan endüstriyel atıksudan nütrient giderimleri incelenmiştir. Elde edilen biyokütle miktarı, lipid miktarı ve kuru biyokütlenin lipid oranı incelenmiştir. Transesterifikasyon yoluyla elde edilen yağ aside metil esterlerinin tür ve miktarları biyodizel üretimine uygunluğu açısından değerlendirilmiştir.

Bir başka çalışmada, ön arıtma sonrasında alınan atıksu içerisinde ve gliserolde *Chlorella vulgaris* ve *B. terribilis* yetiştirilmiştir. Karbonhidrat, toplam lipid, toplam karoten, protein içerikleri incelenmiştir. $174 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda 18 gün boyunca mikroalg gelişimleri, amonyum, nitrat, nitrit ve fosfat giderimleri takip edilmiştir (Cabanelas ve ark., 2013).

Gao ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 20 gün boyunca *Chlorella vulgaris*'in atıksu ikincil arıtma çıkış suyunda geliştirilmesi incelenmiştir. İki farklı (biyofilmlili ve askıda) reaktör kullanılarak atıksudan amonyum, fosfat, nitrat ve nitrit giderimleri karşılaştırılmıştır.

Literatürdeki bir diğer çalışmada, *Scenedesmus rubescens* ve *Chlorella vulgaris* türleri ile ikincil atıksu arıtma tesisi çıkış suyu kullanılarak açık fotobiyoreaktörde uzun süreli olarak mikroalg ile atıksu arıtımı çalışılmıştır. Kullanılan biyofilmsiz reaktör kesintisiz çalıştırılırken biyofilmlili olan reaktör belli aralıklarla temizlenmiş. Farklı hidrolik bekleme sürelerinde çalıştırılarak selde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Biyokütle, toplam azot, nitrat, fosfat, nitrit ve çözünmemiş fosfor miktarları takip edilerek reaktör bazında karşılaştırılmıştır. Toplam biyokütle dışında lipit ile ilgili bir inceleme yapılmamıştır (Su ve ark., 2016).

Ji ve ark. (2018) tarafından sentetik atıksuda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, *Chlorella vulgaris*-*Bacillus licheniformis* ve *Microcystis aeruginosa*-*Bacillus licheniformis* türlerinin halindeki gelişimleri takip edilmiştir. Konsorsiyum halinde bulunan alg-bakteri karışık kültürünün hazırlanan atıksudan karbon, azot ve fosfor giderimleri incelenmiştir.

Sentetik atıksu kullanılan bir çalışmada başlangıç TOC/TN oranlarının mikroalg gelişimine olan etkisi araştırmak için *Chlorella sp.* kültürü ile çalışılmıştır. 120 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda 16 gün boyunca farklı TOC/TN oranlarının kuru biyokütlenin lipit oranlarına ve yağ aside metil ester miktarına etkisi incelenmiştir (Gao ve ark., 2019).

Sharma ve ark. (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada 2 farklı karışık mikroalg kültürleri kullanılarak evsel atıksuyun arıtımı ve biyokütle geliştirilmesi incelenmiştir. Kullanılan evsel atıksu alg gelişim ortamına farklı oranlarda seyreltilerek ilave edilmiş. Çalışmada ağır metal giderimi üzerine etkisi mikroalglerin etkisi de araştırılmıştır. Oluşan lipit, protein ve klorofil pigmenti, lipit ve yağ asidi metil esterleri de incelenmiştir.

2.2.6. Literatürdeki kesimhane atıksuyunda mikroalg geliştirme çalışmaları

Bir çalışmada fotobiyoreaktör kullanılarak, karışık kültür ile kesimhane atıksuyunda organik madde ve nütrient giderimi çalışılmıştır. Kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu membrane filtreden geçirilmesinin adından otoklav ile sterilize edilerek kullanılmıştır. Farklı seyreltme oranlarında mikroalg gelişim ortamına ilave edilerek mikroalg kültürünün gelişimi takip edilmiştir. Atıksudan kullanılan azot, fosfor ve organik karbon miktarları araştırılmıştır (Taşkan, 2016).

Hernández vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu kullanılarak 115 gün süre ile alg kültürü yetiştirilmiş. 75 L hacimli iki havuzdan birisi sera ortamında birisi ise laboratuvar şartlarında tutulmuştur. Zamana bağlı biyokütle gelişimi ve atıksu arıtımı takip edilerek sonuçlar birbirleri ile kıyaslanmıştır. Karışık kültür olarak ortamda bulunan mikroalg türlerinin değişimi takip edilmiş. Elde edilen biyokütlenin lipit, protein ve karbonhidrat içerikleri incelenmiştir.

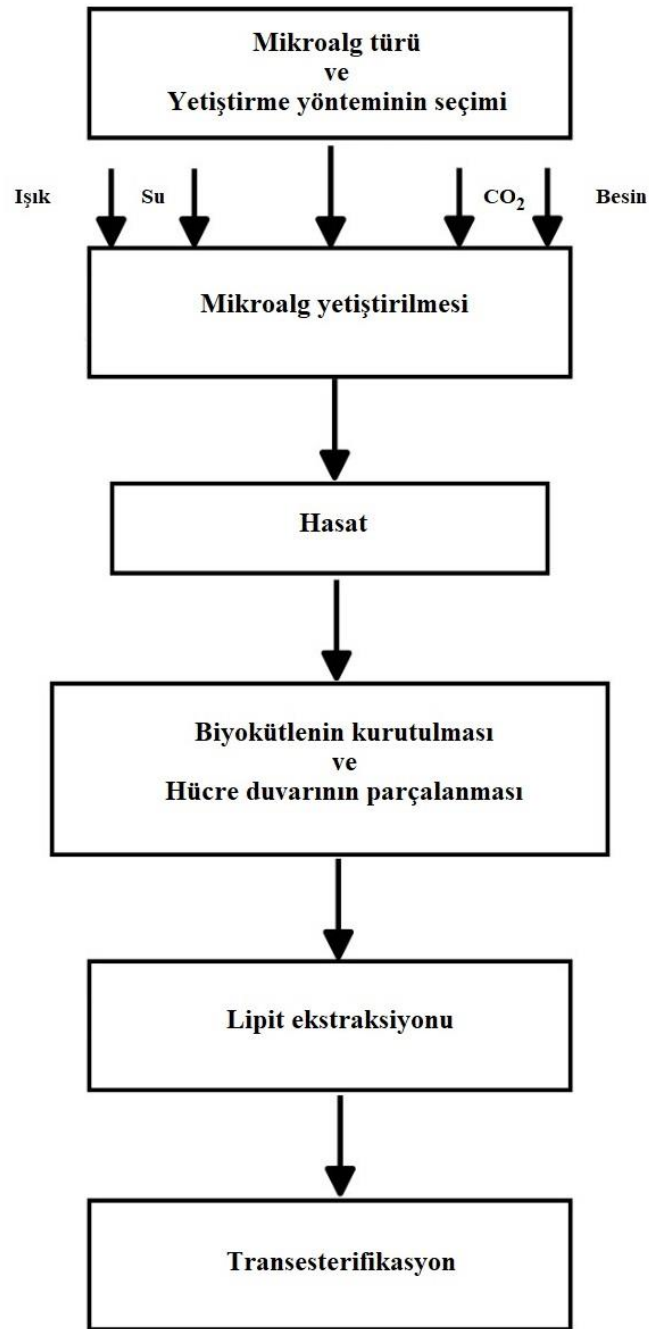
Kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ham atıksu kullanılmadan önce otoklav ile sterilize edilerek kullanılmıştır. *Chlorella pyrenoidosa* kullanılan çalışmada atıksu farklı miktarlarda seyreltilerek alg gelişim ortamına eklenmiştir. Farklı seyreltme oranlarında gerçekleşen azot ve fosfor giderimi incelenmiştir. Yetiştirilen biyokütlenin klorofil, protein karbonhidrat oranları incelenen çalışmada, lipit içeriği ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır (Azam ve ark., 2020).

Kanatlı hayvan kesimhane atıksuyunun kullanıldığı bir çalışmada pH'ın düşürülmesi ile asit çökelme yöntemi uygulanmıştır. Bu şekilde ortamdaki zararlı organizmalardan arındırılarak mikroalg gelişimi için uygun hale getirilmiştir. *Chlorella vulgaris* yetiştirilen çalışmada, KOİ giderimi takip edilmiştir. Yetiştirilen biyokütlenin kuru ağırlığının lipit, karbonhidrat ve protein içerikleri incelenmiştir (Terán Hilares ve ark., 2021).

2.3. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretimi için ilk geniş çaplı mikroalg geliştirilmesi 1960'lı yıllarda Nihon Chlorella firması tarafından Chlorella kültürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1970'lerde yakıt krizinin patlak vermesiyle yenilenebilir enerji için mikroalg kullanımı ilgi çekici bir konu haline gelmiştir. Bu konuda çalışmaların artması ile özellikle Amerika Birleşik Devletlerinin “alternatif kaynaklardan biyodizel üretimi” hakkındaki destek programları vasıtası ile büyük hacimli havuzlarda biyodizel üretimi amacıyla mikroalg kültürü geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Son yıllarda da yükselen yakıt fiyatlarının daha fazla yükseleceğinin öngörülmesi, emisyon kirliliğinin ve sera gazlarının azaltılması motivasyonu ile özel şirketlerin de mikroalglerden biyodizel üretimi üzerine ilgisi artmıştır. Çok sayıda şirket geniş çaplı mikroalg üretimi, mikroalgden biyodizel üretim prosesinin tümünü ya da yetiştirilme, hasat, esterleştirme gibi bir bölümünü kapsayan alanlarda çalışmalarına devam etmektedirler (Mata ve ark., 2010).

Mikroalglerden biyodizel üretimi için izlenmesi gereken adımlar Şekil 2.3.'te verilmiştir. Öncelikle biyodizel üretimi için lipid içeriği ve çoğalma hızı ile uygun olan bir mikroalg türü seçilmesi gerekmektedir. Mikroalg türünün seçilmesinin ardından, çalışmanın ölçeğine bağlı olarak uygun bir yetiştirilme türünün belirlenmektedir. Işık, su, karbon kaynağı ve besine mikrolaglerin yeterli düzeyde ulaşmaları için deney tasarımı planlaması yapılmalıdır. Belirlenen şartlarda ve sürede mikroalg geliştirilmesinin ardından yetiştirilen biyokütle ortamdan ayrılarak susuzlaştırılmaktadır. Hasat adı verilen bu prosesi, elde edilen biyokütlenin kurutulması ve kimyasal/fiziksel ön işlem ile hücre duvarının yıkımı takip etmektedir. Kurutulan ve ön işleminden geçirilen biyokütleden toplam lipidler ekstrakte edilmektedir. Ekstrakte edilen lipidler transesterifikasyon prosesi ile yağ asidi metil esterlerine dönüştürülmektedir.



Şekil 2.3. Mikroalgden biyodizel eldesi (Mata ve ark., 2010)

2.3.1. Biyodizel üretimi için mikroalg türü seçimi

Biyodizel üretimi amacıyla yetiştirilecek mikroalg türünün yüksek yağ yüzdesine ve hızlı üreme kapasitesine sahip olması gerekmektedir (Chisti, 2007). Tablo 2.3.'de de gösterildiği üzere mikroalg yağ yüzdesi kuru ağırlığının %75'ine ulaşabilmektedir

ancak genellikle *Botryococcus braunii* gibi zamana bağlı düşük üretkenliğe sahip mikroalg türlerinde bu durum görülmektedir. *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloris* gibi türlerde ise yağ oranı mikroalg kuru ağırlığının %20-50'sini oluşturmaktadır (Mata ve ark., 2010). Ancak yağ oranı daha düşük olan türlerin bazılarının da çoğalma hızları yüksek olduğu için lipit üretimi için tercih edilmektedirler.

Tablo 2.3. Bazı mikroalg türlerinin lipit içerikleri ve lipit üretme kapasiteleri

Mikroalg türü	Lipit içeriği, kuru ağırlık (%)	Lipit üretme kapasitesi (mg/L.gün ⁻¹)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	20
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19-22	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58	11,2-40
<i>Dunaliella salina</i>	6-25	116
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1-33	37,8
<i>Nannochloris sp.</i>	20-56	60,9-76,5
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6-21,1	40,8-53,9
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5-23	27-36,4

Yağ oranının yanı sıra yağ aside metil esterlerinin içeriği de üretilecek biyodizelin karakterizasyonunda oldukça önemlidir. Mikroalg kütesinden elde edilecek biyodizel C12-C22 karbonlu doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadırlar. Mikroalglerden elde edilen lipit'in C16 ve C18 yağ asidi metil esterlerini içermesi, kaliteli biyodizelin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017; Gao ve ark., 2019). *Chlorella vulgaris*, yüksek lipit içeriği ve hızlı büyüme hızı nedeniyle farklı atık su türlerinde üremek için en çok tercih edilen mikroalg suşlarından biridir (Chinnasamy ve ark., 2010; Sydney ve ark., 2011; Cabanelas ve ark., 2013; Liang ve ark., 2013; Gao ve ark., 2015; Su ve ark., 2016; Ji ve ark., 2018). Bu çalışmalardan elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) türleri de atıksuda yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'in biyodizel üretimi için uygun bir suş olduğunu göstermiştir (Chinnasamy ve ark., 2010; Cho ve ark., 2011; Sydney ve ark., 2011;

Cabanelas ve ark., 2013). Aynı zamanda mikroalg gelişimi ve atıksu arıtımı amacıyla *Chlorella vulgaris*'in yetiştirildiği atık sularda; NH_4^+ ve PO_4^{3-} için yüzde 99'a varan yüksek giderim verimleri elde edilmiştir (Su ve ark., 2016).

2.3.2. Mikroalg yetiştirme yönteminin belirlenmesi

Mikroalg yetiştirme yönteminin seçiminde ve tasarlanmasında dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Bunlar su ihtiyacı, kullanılan suyun mikroalg türüne uygun olarak tatlı ya da tuzlu su olması, kullanılan sistemin açık ya da kapalı sistem olması, kesikli ya da sürekli system tercihi, besin ilavesi periyodu, hasat periyotları, mevsimsel koşullar, sıcaklık ve pH kontrolü olarak sıralanmaktadır (Mata ve ark., 2010).

Seçilen mikroalg türünün tatlı su veya tuzlu su mikroalgi olması, alg gelişim ortamı için hayati öneme sahiptir. Tatlı su mikroalgleri üzerinde ozmotik basınç sebebiyle yüksek tuzluluğun olumsuz etkileri olmaktadır (Andersen, 2005). Suyun önemli olmasının bir diğer sebebi oluşan metabolic atıkların mikroalg üzerine olan toksik etkisinin azaltılmasıdır. Kesikli veya sürekli system olmasına bağlı olarak suyun miktarı bu sebeple önemlidir. Benzer şekilde çok yoğun gelişen mikroalg biyokütlesinin ışığa homojen şekilde ulaşamamasına bağlı olarak mikroalg gelişimi olumsuz etkilenmektedir (Ogbonna ve Tanaka, 2000).

Kullanılacak mikroalg yetiştirme sisteminin açık veya kapalı olmasının yanında geliştirilecek mikroalg biyokütlesinin amacına hizmet edecek bir sistem olması da gerekmektedir. Büyük hacimli açık havuzlar genel olarak protein, b-karoten ve sağlıklı besin takviyesi üretilmek amacıyla tercih edilmektedir (Yin ve ark., 2020). Düşük su içeriğine sahip ve kontaminasyona açık mikroalg türlerinin geliştirilmesinde, önemli parametrelerin daha kolay kontrol edilebileceği kapalı sistemler tercih edilmektedir (Andersen, 2005).

Kurulacak mikroalg geliştirme sisteminin kesikli, yarı kesikli/sürekli ya da sürekli olması da oldukça önemlidir. Kesikli ya da sürekli system seçilmesine bağlı olarak

hasat ve besin ilavesinin yapılma periyotları yetiştirilen türe göre belirlenmesi gerekmektedir. Kesikli sistemler çoğunlukla laboratuvar tipi ön çalışmalar için uygun olmaktadır. Nütrient giderim yüzdeleri yüksek olmakla birlikte düşük kontaminasyon riskine sahiptirler. Bu durumun yanısıra düşük biyokütle üretkenliği elde edilmektedir. Kesikli sistemler tek bir mikroalg gelişim döngüsüne sahiptir. Yarı kesikli sistemler ise yüksek biyokütle üretkenliğine ve yüksek atıksu arıtma kapasitesine sahiptirler. Dezavantaj olarak bu sistemlerin yatırım maliyeti yüksek, uzun süreli performansının sürekliliği öngörülememekte ve kontaminasyona daha açık olduğu bilinmektedir. Sürekli sistemlerde ise mikroalg gelişme oranları uzun süreli olarak ayarlanabilir ve korunabilmektedir. Sürekli sistemlerde kullanılan mikroalg türü başka türler ile kontamine olabilir ve zaman içerisinde baskın olan mikroalg türü de bu sebeple değişebilmektedir. Bu durum mikroalg geliştirme amacına uygun olmayan ve istenmeyen bir türün gelişmesine sebep olabilir (Yin ve ark., 2020).

Özellikle açık sistemlerde; sistemlerin kurulacağı bölgenin mevsimsel koşulları, hava sıcaklığı, sistemin yalıtımı, buharlaşma durumu göz önünde bulundurulmalıdır. Seçilen mikroalg türüne bağlı olarak çevresel koşulların uyumlu olması, sistemin uzun süreli devam edebilmesi açısından önemlidir ve iyi bir planlama yapılması gerekmektedir. Mikroalg gelişim sisteminin açık ve kapalı olması, karbon kaynaklarına ulaşım açısından dikkat edilmesi gereken bir konudur. Karbon miktarının yetersiz geldiği durumlarda uygun oranda seyreltilmiş CO₂ ilavesi yapılması ya da başka bir karbon kaynağından sağlanması gerekmektedir. Mikroalg gelişimi için gerekli nütrient ve iz elementlerin de kesikli sistemlerde uygun miktarda başlangıçta kültür ortamında bulunması gerekmektedir. Devamlı sistemlerde ise besin miktarı kontrol edilerek gerekli aralıklarla kültür ortamına ilave edilmesi gerekmektedir (Mata ve ark., 2010).

Mikroalglerin sağlıklı gelişimi için türlerine göre de değişiklik gösteren uygun pH aralıkları bulunmakadır. Çoğu mikroalg türü için 6-8 pH aralığı sağlıklı hücre gelişimi için uygun olarak kabul edilir. Geniş bir pH aralığında gelişebilen *Chlorella vulgaris* türünün aksine, çoğu mikroalg türü hücre büyümesi için elverişsiz ortam yaratan pH değerlerin meydana gelen çok küçük değişikliklere karşı hassastırlar (Suparmaniam

ve ark., 2019). Mikroalgal aktivite sırasında karbondioksitin azalmasına bağlı olarak kültür ortamının pH'ı yükselme eğilimindedir. pH'ı aynı seviyelerde tutmak, sağlıklı mikroalg hücrelerinin gelişimi için daha iyidir. Aynı zamanda mikroalg gelişimi devam ederken, başlangıçtaki pH'dan bağımsız olarak, ortam pH'ı 10 civarında sabitlenmektedir (Gong ve ark., 2014).

Son yıllarda mikroalg geliştirilmesinin ve mikroalglerin atıksu arıtma kapasitesinin beraber incelendiği çalışmalar yapılmaktadır (Zhang, 2015; Taşkan, 2016; Gao ve ark., 2019; Sharma ve ark., 2020; Terán Hilaes ve ark., 2021). Bu tür sistemlerde önemli olan konu kullanılan atıksuyun arıtmanın hangi bölümünden alındığı ve içerdiği diğer organizmalardır. Mikroalgler, atık sudaki diğer organizmalarla bir konsorsiyumda yaşayabilirler (Liang ve ark., 2013; Ji ve ark., 2018), ancak rotiferler gibi bazı organizmalar tarafından da tüketilebilirler. Bu nedenle mikroalg gelişimine zarar vermeden atıksulardan mikroalglere zararlı olan organizmaların uzaklaştırılması gerekmektedir (Cho ve ark., 2011; Kim ve ark., 2017).

2.3.3. Mikroalg hasat yöntemleri

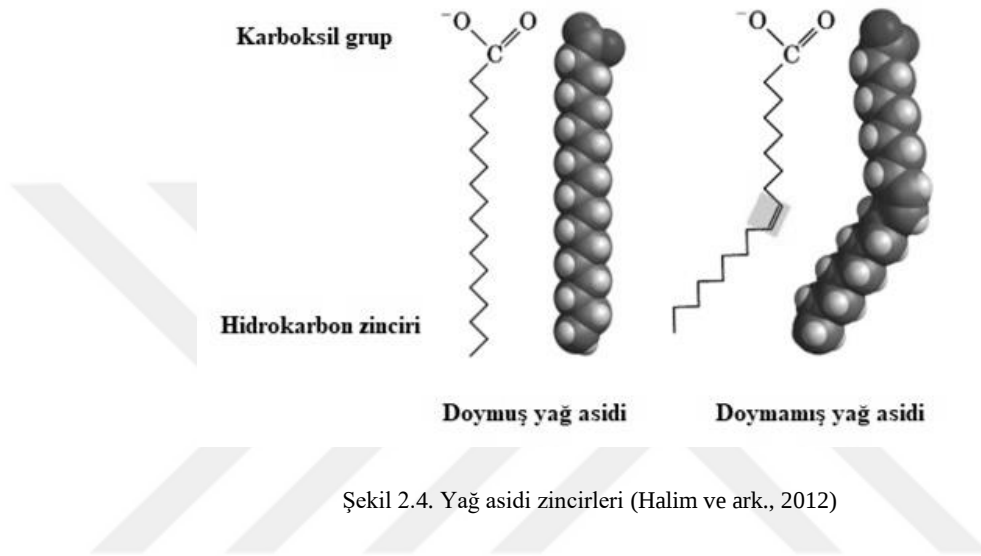
Mikroalg kültürü geliştirildikten sonra yetiştirilen biyokütlenin susuzlaştırılması gerekmektedir. Hasat adı verilen bu proses biyokütlenin yetiştirilen ortamdan ayrıştırılması, susuzlaştırma ve kurutma proseslerinden oluşmaktadır. Yetiştirilen biyokütlenin biyodizel üretimi amacıyla kullanılacaksa içerdiği yüksek miktardaki sudan arındırılması gerekmektedir. Kullanılacak hasat yöntemi belirlenirken mikroalg geliştirme yöntemi de dikkate alınarak maksimum biyokütle geri kazanımı, minimum işletme, enerji, bakım maliyetlerinin gözetilmesi ve düşük bir çevresel etki ile uygulanabilecek ideal bir yöntemi seçilmelidir (Vasistha ve ark., 2021). Mikroalg hasat yöntemleri genel olarak; sedimentasyon, santrifüj, filtrasyon, flokülasyon, (nanopartikül ile flokülasyon, kimyasal flokülasyon, biyoflokülasyon, otoflakülasyon), elektrokoagülasyon, flotasyon şeklinde sınıflandırılmaktadır (Kadir ve ark., 2018; Chatsungnoen ve Chisti, 2019; Menegazzo ve Fonseca, 2019; Yin ve ark., 2020; Vasistha ve ark., 2021; Khan ve ark., 2022). Bu yöntemlerin farklı avantajları, dezavantajları ve bazı limitleyici faktörleri vardır.

Sedimentasyon düşük bütçeli ve işletilmesi kolay bir yöntemdir. Biyokütlenin çökmesinden sonra kalan sıvı kısım tekrar mikroalg geliştirme sistemine verilebilir. Ancak herhangi bir flokülant eklenmediği için askıda kültürlerin çökmesi için gereken süre (0,1-2,6 cm/sa) oldukça uzundur ve kısa bekletme süreleri için hasat verimi düşük bir yöntemdir (Khan ve ark., 2022). Santrifüj yöntemi ile kısa sürede biyokütleyi sıvı kısımdan ayırmak mümkün olmaktadır. Hızlı bir yöntem olmasının yanı sıra neredeyse tüm mikroalg türleri için uygundur. Hücre yapısına zarar verebilir ve büyük ölçekli olarak kurulması durumunda yüksek yatırım maliyetine sahip bir yöntemdir (Yin ve ark., 2020). Filtrasyon yöntemlerinin; mikro, makro, ultra, vakum filtrasyon gibi çeşitleri bulunmaktadır (Yin ve ark., 2020). Bu filtrasyon yöntemlerinden birisinin uygulanması için en önemli parametre mikroalg çapıdır. Filtrasyon yönteminde gelişen en önemli sorun gözeneklerin küçük çaplı mikroalgler ile tıkanmasıdır. Bu sebeple filtrelerin düzenli olarak temizlenmesi gerekmektedir. Bu filtrasyon tekniği genellikle iplikli türler gibi büyük boyutlu alglerin hasat edilmesinde kullanılır. Bu işlem *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* vb. gibi mikroalg türleri için uygun değildir (Enamala ve ark., 2018). Flokülasyonun; nanopartikül ile flokülasyon, kimyasal flokülasyon, biyoflokülasyon, otoflakülasyon gibi çeşitleri bulunmaktadır. Genel olarak yüksek verimliliğe, düşük enerji maliyetine sahiptirler. Ancak kullanılan flokülanta bağlı olarak işletme maliyeti yüksek olmaktadır. Bazı mikroalg, bakteri ve mantar türleri kullanılarak da biyoflokülasyon yoluyla hasat edilebilirler. Ancak bu durum maliyeti azaltırken başka sorunlara sebep olmaktadır. Hasat edilen biyokütlenin içeriği biyoflokülantlar ile değişmektedir (Suparmaniam ve ark., 2019). Bir diğer hasat yöntemi olan flotasyon yönteminde hava kabarcıkları, mikroalg hücrelerinin zeta potansiyeli ile etkili bir şekilde etkileşime girmektedir. Bu yöntem yüksek hacim ölçeğinde uygun maliyetlidir. Hava kabarcıklarının boyutu ve mikroalg çaplarının boyutu hasat verimini etkilemektedir (Yin ve ark., 2020).

2.3.4. Lipit ekstraksiyonu

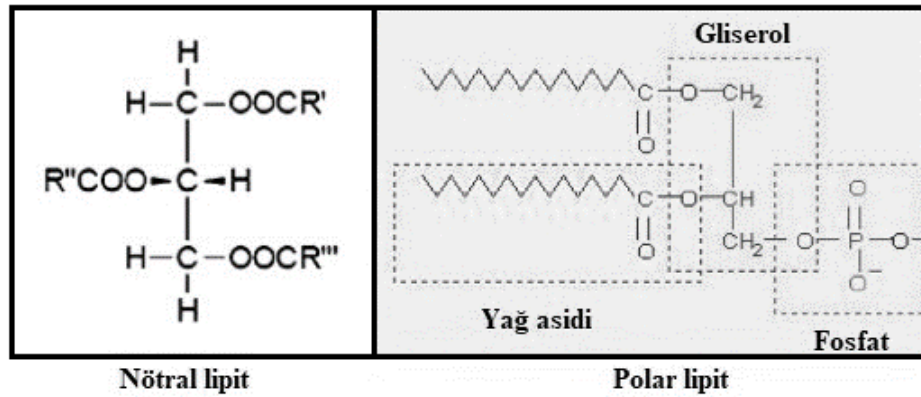
Yağ asidi molekülü hidrofobik bir hidrokarbon zincirinin bir ucuna bağlı bir hidrofilik karboksil grubundan oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Yağ asitleri, hidrokarbon zincirindeki toplam karbon atomu sayısı ve hidrokarbon zinciri boyunca çift bağların sayısı temel

alınarak isimlendirilmektedir. Doymuş yağ asitlerinde çift bağ bulunmazken, doymamış yağ asitleri en az bir çift bağdan oluşmaktadır (Moser, 2009). Yağ asidi molekülünün karboksil ucu, gliserol gibi yüksüz bir baş grubuna bağlandığında, triaçilgliserol gibi nötral bir lipit molekülü oluşmaktadır. Benzer şekilde, bir yağ asidi molekülü gliserol ve fosfat kompleksi gibi yüklü bir baş grubuna bağlandığında fosfolipit gibi bir polar lipit molekülü oluşturur.



Şekil 2.4. Yağ asidi zincirleri (Halim ve ark., 2012)

Lipitler genel olarak baş grubun polaritesine göre nötral ve polar lipitler olarak iki kategoride sınıflandırılırlar. Polar lipitler, fosfolipitleri ve glikolipitleri içermektedirler (Deshmukh ve ark., 2019). Polar lipitler paralel şekilde dizilerek mikroalg hücrelerinin çift katmanlı hücre zarlarını oluştururlar (Şekil 2.5.). Nötral lipitler, açilgliserolleri ve serbest yağ asitlerini içerirler. Nötral lipitler mikroalg hücrelerinde enerji deposu olarak kullanılırlar. Açilgliserolleri; monoaçilgliseroller (MG), diasilgliseroller (DG), triaçilgliserol (TG) oluşturur. Serbest yağ asitleri ise bir hidrojen atomuna bağlı yağ asididir (Arif ve ark., 2020).



Şekil 2.5. Lipit molekülleri (Halim ve ark., 2012)

Lipit ekstraksiyonu için yöntem belirlenirken; lipit ekstraksiyon veriminin yüksek, ekonomik, büyük çaplı kullanılabilen, çevreye zararı az olan, ekstraksiyon süresi kısa olan, kullanılacak biyokütle miktarına uygun olmalıdır. Yöntem kararı verilirken ekstraksiyon sonrası proseslerin de değerlendirilmesi gerekmektedir (Mubarak ve ark., 2015).

2.3.4.1. Lipit ekstraksiyonu için ön işlem

Mikroalgler son derece karmaşık hücre duvarlarından, protein ile etkileşimli polisakkaritlerden oluşmaktadır. Hücre duvarını kırmak ve lipiti tamamen çıkarmak için iyi bir çözücü ve enerji harcanması gereken mekanik bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Geleneksel lipit ekstraksiyon yöntemlerinde fazla miktarda solvent gereklidir. Çok fazla solvent kullanımı çevre kirliliğine, maliyetleri artışına ve ekstraksiyon sürecinde çok fazla enerji tüketilmesine neden olur. Bu nedenle lipit ekstraksiyonundan önce, mikroalg hücre tipine bağlı olarak uygun bir hücre parçalama yönteminin seçilmesi gerekmektedir (Dai ve ark., 2014). Mikroalg hücrelerinin parçalanması ve lipitlerin ekstraksiyon veriminin artırılması için hücre yıkım işleminin uygulanması önemlidir (Vasistha ve ark., 2021). Mikroalgden biyodizel eldesinde yüksek enerji gerektiren lipit ekstraksiyonunun verimini artırmak amacıyla farklı yöntemler ile hücre duvarı parçalanmaktadır. Hücre duvarının yıkımı mekanik, mekanik olmayan yöntemler veya ikisinin kombine edilmesi ile gerçekleştirilir. Mekanik yöntemler yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonikasyon, boncuk öğütme

(bead beating), otoklavlama, liyofilizasyon (dondurarak kurutma) ve mikrodalgayı içerirken; mekanik olmayan yöntemler genellikle mikroalgal hücrelerin asitler, alkaliler, enzimler veya ozmotik şoklarla parçalanmasını içermektedir (Halim vd., 2012). Kullanılan yöntemlerin uygulama verimliliği ve farklı mikroalg türleri üzerindeki etkileri farklı araştırmacılarca çalışılmıştır. (Lee ve ark., 2010, 2014; Prabakaran ve Ravindran, 2011; Florentino de Souza Silva ve ark., 2014; Arif ve ark., 2020; Nzayisenga ve ark., 2020).

Mikrodalgalar, eşit ve hızlı ısıtma, az solvent tüketimi ve kısa ekstraksiyon süresi sağlaması gibi bir çok avantaja sahiptir (Dai ve ark., 2014). Mikrodalgalar özellikle polar moleküller ile etkileşime girip ısı üretmektedir. Bu şekilde mikroalg hücre zarı zarar görmekte ve lipitler ekstrakte edilebilmektedir. Mikroalga ile hücre parçalama işlemi, kuru veya su içeren mikroalg biyokütlesi için etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ultrases sıvıdaki solventlerin moleküler enerjisini ve ayrıca hücre duvarını yok etmek için güçlü bir yöntemdir (Dai ve ark., 2014).

Farklı hücre parçalama metodlarının kullanılmasının ardından lipit ekstraksiyon veriminin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Dondurarak kurutma, boncuk ile öğütme, mikrodalga gibi farklı metodların lipit ekstraksiyonunun verimini artırıcı etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mikrodalga ile hücre parçalama en yüksek lipit verimin elde edilmesini sağladığını göstermiştir (Meullemiestre ve ark., 2016).

Otoklav ile hücre parçalama yöntemleri tek başına ya da seyreltik asit ilavesi ile birlikte farklı araştırmacılar tarafında çalışılmıştır. NHO_3 ve H_2SO_4 'ün düşük konsantrasyonlarda (%0,1 - %0,9) biyokütle üzerine ilave edilmesi ile hücre parçalamanın etkisi arttırılmıştır (Lee ve ark., 2014). Otoklavın tek başına kullanılması mikrodalga yöntemine göre daha düşük verim göstermesine rağmen (Florentino de Souza Silva ve ark., 2014), düşük konsantrasyonlarda asit ilavesi ile etkisini arttırmak mümkün olmuştur (Lee ve ark., 2014).

2.3.4.2. Lipit ekstraksiyon yöntemleri

Lipitler, organik çözücülerde çözünebilen biyolojik moleküllerdir. Hem nötral hem de polar lipit moleküllerinin ana bileşenleri olan yağ asitleri, doymuş ve doymamış tiplerden oluşmaktadır. Doymuş yağ asitlerinde çift bağ bulunmazken doymamış yağ asitlerinde en az bir çift bağ bulunmaktadır. Mikroalglerin lipit içeriği, türlerine göre farklılıklar gösterir. Aynı mikroalg türünden ekstrakte edilen lipitlerin bileşimi ve yağ asidi profili; ortam bileşimi, sıcaklık, aydınlatma yoğunluğu, aydınlık/karanlık döngüsü oranı ve havalandırma hızı gibi yetiştirme koşullarından etkilenmektedir. Mikroalglerden elde edilen yağ asidi metil esterleri 12 ila 22 karbonlu olarak değişmektedir (Mubarak ve ark., 2015).

Kullanılan lipit ekstraksiyon metotları, fiziksel ve kimyasal metotlar olarak sınıflandırılırlar. Fiziksel metotlar; yağ presleme, ultra ses katkılı metotlar ve mikrodalga katkılı metotlar olarak sınıflandırılırlar. Yağ presleme yöntemi yüksek miktarda biyokütlenin ekstraksiyonu için tercih edilmektedir ancak verimi solvent ekstraksiyonu kadar yüksek değildir (Halim ve ark., 2013). Kimyasal metotlar ise solvent ekstraksiyonu, süperkritik ekstraksiyon ve iyonik sıvı ekstraksiyonu olarak sınıflandırılırlar. İyonik sıvılar; uçucu olmamaları, termal kararlılıkları ve sentetik esneklikleri nedeniyle mikroalglerden lipit ekstraksiyonu için uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Vasistha ve ark., 2021). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi ile lipit ekstraksiyonu için yüksek basınç altında sıvı haline dönüştürülen CO₂ yardımıyla lipit ekstrakte edildikten sonra basıncın düşürülmesiyle CO₂ tekrar gaz fazına geçer. Süperkritik akışkanlar lipit ekstraksiyonu için solvent içermeyen bir yöntem olması açısından önemlidir. Süperkritik akışkanın çözücü gücü, yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak, ekstraksiyon basıncı ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Süper kritik CO₂ (SCCO₂), orta kritik basıncı (7,4 MPa) ve düşük kritik sıcaklığı (31,1°C) nedeniyle süper kritik sıvı ekstraksiyonlarının çoğunda yaygın olarak kullanılan birincil çözücüdür (Mubarak ve ark., 2015). Süperkritik akışkan yönteminin en önemli dezavantajı yüksek yatırım ve işletme maliyetidir.

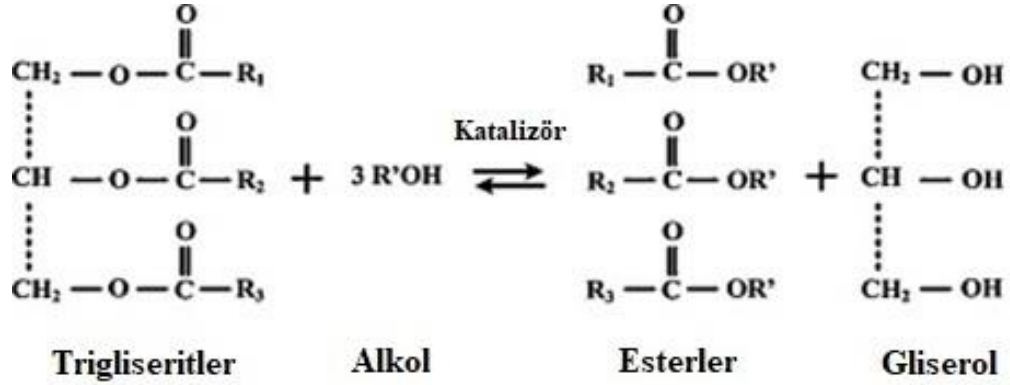
Polar ve polar olmayan solventlerin beraber kullanıldığı hücresel parçalama yöntemleri, lipit ekstraksiyon verimini açık ve önemli bir şekilde artırmaktadır. Kloroform/metanol, hegzan/etanol, diklorometan/metanol gibi polar ve polar olmayan solvent karışımlarının kullanılması, tek solvent ile yapılan ekstraksiyona kıyasla genellikle daha verimli sonuçlar vermektedir (Menegazzo ve Fonseca, 2019).

Lipit ekstraksiyonu için farklı solventlerin ayrı ya da farklı oranlarda karıştırılarak kullanıldığı, farklı alg türleri ile yapılan bir çok çalışma literatürde mevcuttur (Lee ve ark., 2010; Halim, Harun, ve ark., 2012; Soares ve ark., 2014; Meullemiestre ve ark., 2016). Farklı çözücülerin kullanılması ile yetiştirilen mikroalg biyokütlesinden en yüksek verimle lipit ekstraksiyonunun elde edilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. n-heptan, isopropanol ve n-heptan/isopropanol ile yapılan bir çalışmada ekstraksiyon çalışmaları sonucunda en yüksek lipit ekstraksiyon verimi n-heptan/isopropanol ile elde edilmiş olup biyokütle kuru ağırlığının %30'u kadar lipit elde edilmiştir (Meullemiestre ve ark., 2016). Başka bir araştırmada üç farklı mikroalg türü için hegzan, hegzan/etanol, kloroform/metanol, metanol/kloroform/su, diklorometan/metanol metodları kullanılarak en etkili solvent için araştırmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre üç mikroalg türü için de en yüksek lipit oranları kloroform/metanol ve DCM/metanol ile sağlanmıştır (Soares ve ark., 2014). Yürütülen bir diğer çalışmada ise, *C. pyrenoidosa*'dan lipit ekstraksiyonu için farklı solventlerin lipit ekstraksiyonuna etkisi çalışılmıştır. Kloroform/metanol, metanol, kloroform, etanol ve hegzan kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada en yüksek lipit ekstraksiyon veriminin kloroform/metanol (2:1 v/v) karışımı ile elde edildiği; hegzan kullanılarak ise en düşük ekstraksiyon verimini elde edildiği belirtilmiştir (D'oca ve ark., 2011).

2.3.5. Transesterifikasyon

Biyokütleden lipit ekstrakte edildikten sonra solventin uzaklaştırılmasıyla lipit elde edilmektedir. Biyodizel eldesi için en yaygın yöntem transesterifikasyon yoluyla elde etmektir (Şekil 2.6.). Transesterifikasyon yoluyla elde edilen biyodizel motorlarda saf ya da dizele karıştırılarak kullanılabilir (Suali ve Sarbatly, 2012). Transesterifikasyon, ekstrakte edilen trigliseridlerin asit veya alkali bir katalizör yardımı ile alkolle

(metanol, etanol) reaksiyona girmesi, reaksiyon sonucunda ester ve gliserin ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır (Mata ve ark., 2010).



Şekil 2.6. Transesterifikasyon prosesi (Mata ve ark., 2010)

Transesterifikasyon prosesi asidik katalizörlü veya alkali katalizörlü olarak gerçekleştirilir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda direkt transesterifikasyon adı verilen bir prosesle lipid ekstraksiyonu ve transesterifikasyonu birlikte gerçekleştirilmiştir. Direkt transesterifikasyon ile sulu biyokütlenin kurutulmasına gerek kalmadan esterleştirme prosesi gerçekleştirilmektedir.

Araştırmacılar tarafından çoğunlukla NaOH veya KOH kullanılan alkali katalizörlü transesterifikasyon tercih edilmektedir. Alkali katalizörün kullanılmasıyla gerçekleştirilen transesterifikasyon düşük sıcaklık ve basınçta meydana gelmektedir. Reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleştirilir. Bu reaksiyonun tek dezavantajı serbest yağ asitlerinin sabunlaşma reaksiyonu ile sabun oluşturması ve oluşan metil esterlerin miktarını potansiyel miktara göre azalmasıdır. Sabun oluşumunu önlemek için, sülfürik veya hidroklorik asit gibi asitler kullanarak asit katalizli transesterifikasyon tercih edilmektedir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise kullanılan asidin korozif olması, yüksek miktarda metanole ihtiyaç duyulması, yüksek sıcaklık gerektirmesi ve alkali katalizörlü transesterifikasyona göre çok daha yavaş gerçekleşmesidir (Dickinson ve ark., 2017). Katalizör kullanılmadan transesterifikasyon, metanolün süper kritik koşulları altında meydana gelebilmektedir. Ancak metanolün yüksek

sıcaklık ve hacim gereksinimleri, bu seçeneği ekonomik olarak da elverişsiz kılmaktadır.

Ekstraksiyon ve transesterifikasyon işlemlerinin tek adımda gerçekleştiği doğrudan (in situ) bir transesterifikasyon yöntemi olarak mikroalgal biyokütleyle uygulanmaktadır. Bu işlem, bir katalizör varlığında lipit içeren biyokütle ile genellikle metanol olan kimyasal bir çözücü ile doğrudan reaksiyona girmesidir. Direkt transesterifikasyonun geleneksel biyodizel üretim yöntemine göre avantajı, çözücü ayırma adımını en aza indirmesi, işlem süresini kısaltması ve işlem üretim maliyetini düşürmesidir. Bu işlemin en önemli dezavantajı ise elde edilen toplam lipitin ya da mikroalg biyokütlesinin lipit oranının tespit edilememesidir.

Bunun yanısıra direkt transesterifikasyon ile iki aşamalı transesterifikasyon yöntemlerini kullanarak elde edilen yağ asidi metil esterlerinin kıyaslandığı çalışmalarda daha düşük miktarlarda elde edildiği bildirilmiştir. (D’oca ve ark., 2011; Soares ve ark., 2019). Örneğin bir çalışmada metanol kullanılarak oda sıcaklığında ekstraksiyon ve ardından transesterifikasyon yapılması ile gerçekleştirilen iki aşamalı işlem ile tek aşamada gerçekleştirilen doğrudan transesterifikasyon ile elde edilen yağ asidi metil esterlerinin miktarları kıyaslanmıştır. İki aşamalı gerçekleştirilen lipit ekstraksiyonu ardından asit katalizörlü transesterifikasyon ile daha fazla miktarda yağ asidi metil ester ürettiklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda doğrudan transesterifikasyonun, fazla miktarda asit ve alkolün mikroalgal biyokütleyle eklendiğini, fazla kullanılan bu kimyasalların geri kazanımının enerji maliyeti ve çevreye olabilecek zararın daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (D’oca ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise direkt transesterifikasyonun, yağ ekstraksiyonu ve saflaştırma aşamalarını ortadan kaldırarak ekstraksiyonda kullanılan solvent hacmini, biyodizel üretim süresini ve maliyetini azalttığını belirtmişlerdir. Ancak, direkt transesterifikasyon ile elde edilen FAME veriminin iki aşamalı ekstraksiyon ve transesterifikasyon ile elde edilen FAME veriminden değerlerinden çok daha düşük olduğu belirtilmiştir (Soares ve ark., 2019).

2.3.6. Yağ asidi metil esterleri (FAME)

Mikroalglerden elde edilen biyokütlenin elde edilen biyodizelin uygunluğunun kontrol edilmesi gerekmektedir. Elde edilen biyodizelin bazı özelliklerinin test edilmesi ve EN 14214 (Avrupa Standartlar Komitesi Biyodizel Kalitesi Standardı) gibi uluslararası standartlar ile kıyaslanması gerekmektedir. Bu standartların amacı, alternatif bir ulaşım yakıtı olarak elde edilen biyodizelin ekonomik ve çevre dostu kullanımını sağlamaktır (Deshmukh ve ark., 2019).

Biyodizel, çoğunlukla 16 ila 18 karbon atomundan oluşan yağ asidi esterlerinin karışımından oluşmaktadır. Yağ asidinde bulunan karbon atomlarının sayısı ve türleri (doymuş ve doymamış yağ asitleri), biyodizel özelliklerini kontrol eden başlıca faktörlerdir. Kalorifik değer, viskozite, dizel yakıtların yanma hızının ve ateşleme için gerekli olan basıncın bir göstergesi olan setan sayısı, kaynama noktası gibi özellikler karbon zinciri uzunluğu ile artmaktadır. Çift bağ sayısındaki artış ise bu özelliklerin azalmasına neden olmaktadır. Uzun zincire sahip doymuş yağ asitleri (SFA), yüksek setan sayısı nedeniyle daha iyi yanma özelliklerine sahiptir. Ancak aynı zamanda sahip oldukları yüksek viskozite yakıtın atomizasyonunda sorun oluşturabilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017). Doymamış yağ asitlerinin atmosferik oksijen ile reaksiyona girerek istenmeyen ürünlerin oluşmasına ve bozunmaya duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyodizelde yüksek karbonlu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) varlığı, daha düşük oksidatif stabiliteyi göstermektedir. Soğuk akış özellikleri, yakıtın motorda sorunsuz kullanılabileceği sıcaklık koşullarını belirler. Tek tip yağ asidi metil esterinin oluşturduğu biyodizel açıklanan sebeplerden dolayı tercih edilmemektedir. İdeal olarak kaliteli bir biyodizel uzun zincirli doymuş yağ asitleri (SFA) ve kısa zincirli tekli (MUFA) ve çoklu (PUFA) doymamış yağ asitlerinin karışımından oluşması beklenmektedir (Chisti, 2007; Komolafe ve ark., 2014; Mohd-Sahib ve ark., 2017).

Mikroalglerden elde edilen C16 yağ asidi esas olarak doymuş yağ asidi (Palmitik asit, C16:0) şeklinde bulunmaktadır ve literatürde bazı mikroalg türlerinde Palmitik asit yüzdesi %50'ye kadar çıkmaktadır. Buna ek olarak C18 yağ asitleri esas olarak

doymamış formda bulunmaktadır (C18:1, C18:2 ve C18:3). Birkaç mikroalg türünde, oleik asit (C18:1) bileşimi %60'a kadar ulaşmaktadır (Deshmukh ve ark., 2019). EN 14214 (Avrupa standartlar komitesi biyodizel kalitesi standardı)'da belirtildiği üzere asıl sınırlayıcı faktör, tüm yağ asitleri içerisinde %12 oranını geçmemesi gereken C18:3 linoleik asit olarak belirtilmiştir. Mikroalglerden elde edilen biyodizelin çok yüksek miktarda linolenic asit içermesi standartların getirdiği sınırları karşılamamaktadır. Bu nedenle, mikroalglerin biyodizel yakıtı üretme potansiyeli yüksek olmasına rağmen, elde edilen yakıtın düşük kaliteli olma ihtimali bulunmaktadır. Bu durum elde edilen dizelin motorda kullanılması önünde engel teşkil etmektedir. Ancak belirli oranla dizel yakıtı karıştırılıp kullanılması da mümkün olmaktadır (Mohd-Sahib ve ark., 2017).

2.4. Mikroalg Enzim Aktiviteleri

2.4.1. Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROT)

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi ile hücrelerin enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz ve çeşitli peroksidazlar) ve enzimatik olmayan savunmalarını (E vitamini ve diğer antioksidanlar) kullanarak bunları kolayca detoksifiye etme kapasitesi arasındaki dengesizliğe bağlı durumdur (Bindoli ve Rigobello, 2013). Çeşitli stres faktörleri sebebiyle hücrede meydana gelen oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasına neden olur. Oluşan ROT'lar, lipid peroksidasyonu üzerinde önemli bir role sahiptirler (Kaplan ve ark., 2016). Serbest radikaller; kararsız, moleküler ağırlığı düşük, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan, kısa ömürlü ve çok etkin moleküller olarak tanımlanmaktadır. Oksijenden meydana gelen serbest radikaller, aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal bir sonucu olarak oluşmaktadır. Oksijenden meydana gelen başlıca reaktif oksijen türleri; Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), Singlet Oksijen (1O_2), Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Hidroksil ($OH^{\bullet}$), Hipokloröz Asit ($HOCl$), Peroksil ($ROO^{\bullet}$), Perhidroksil ($H_2O_2^{\bullet-}$) olarak sıralanmaktadır (Zagal, 2008).

2.4.2. Serbest radikallerin lipitlere etkisi

Ortamda bulunan serbest radikallerin etkisi ile yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan hidrojen atomunun kopması sonucu lipit radikali oluşur. Lipit radikali ($L^{\bullet}$) nin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ($LOO^{\bullet}$) meydana gelmektedir. Lipit radikalleri, membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açmaktadır. Ardından açığa çıkan hidrojen atomları ile lipit peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler (Kaplan ve ark., 2016).

Aerobik organizmalarda lipit peroksidasyon ürünleri lipit, DNA ve protein yapısının da zarar görmesine neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonun artışı ve antioksidan görevi gören enzimlerin azalması sonucu lipit peroksitleri; DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu reaksiyonlar öncelikle lipit sonrasında ise hücrenin yıkımına neden olmaktadır (Hamed ve ark., 2017).

2.4.3. Antioksidan enzim aktiviteleri

2.4.3.1. LPO, lipit peroksidaz enzim aktivitesi

Enzimler tarafından etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar hücre membranındaki lipitlerin lipit peroksidasyonuna uğramasına sebebiyet verirler (Kaplan ve ark., 2016). Lipit peroksidasyonundaki artış, $O_2^{\bullet-}$ oluşturmak üzere moleküler oksijenin oksidasyonu yoluyla meydana gelmektedir. Bu reaksiyon aynı zamanda H_2O_2 oksidasyonu yoluyla da meydana gelmektedir. Radikallerin üretimi, membranlarda oluşan doymamış yağ asitlerinin kaynağı olarak bilinmektedir. $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin peroksidasyonun başlaması ile malondialdehit (MDA) seviyelerinde bir artışa neden olmaktadır. Mikroalg hücreesindeki enzimatik savunmanın yeterli olmaması lipit peroksidasyonu artışına sebep olmaktadır (Zagal, 2008).

Lipit peroksidasyon enzim analizi (LPO), malondialdehit (MDA) cinsinden ölçülerek ifade edilmektedir (Ohkawa ve ark., 1979). MDA, lipit peroksidasyonunun son ürünüdür ve hücrelerde oluşan oksidatif hasarın seviyesinin belirlenmesinde

kullanılmaktadır. Yüksek konsantrasyonda tespit edilen MDA, membran deformasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Özkaleli, 2014).

2.4.3.2. SOD, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi

SOD, oksijeni fizyolojik olarak metabolize ederek hücreleri süperoksit radikalının lipit peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktadır (Zagal, 2008). SOD enzimi, süperoksit anyonlarını ($O_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) de etkisiz hale getirmektedir. Süperoksit anyon radikallerini katalizleyerek hücreleri savunan bir enzimdir. Bu reaksiyon sonucunda moleküler oksijen (O_2) açığa çıkmaktadır (Kaplan ve ark., 2016). Mikroalg hücrelerinde oluşan SOD miktarı lipit peroksidasyonuna karşı ne kadar korunma sağlandığının bir göstergesidir. SOD miktarı ne kadar yüksek olursa, lipit peroksidasyonuna o kadar fazla engel olunabilmektedir (Dhindsa ve ark., 1981).

2.4.3.3. APOD, askorbat peroksidaz enzim aktivitesi

Lipit degradasyonuna karşı savunma amacıyla üretilen APOD enzimi hücre içerisinde oluşan reaktif oksijen türlerine karşı savunma amaçlı üretilmektedir. Askorbat, kloroplastlarda hidrojen peroksitin temizlenmesi için elektron verici olarak rol almaktadır (Nakano ve Asada, 1981). APOD, askorbat ile hidrojen peroksitin suya indirgemesini kataliz etmekte rol almaktadır. Aynı zamanda oluşan askorbat-peroksidaz reaksiyonu ile dokularda oluşacak yeni H_2O_2 'in önüne geçmektedir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Mikroalg Kültürünün Yetiştirilmesinde Kullanılan Besin Ortamı

Chlorella vulgaris Beijerick 1890 (IBL-C105) Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği laboratuvarlarında yetiştirilmektedir. *Chlorella vulgaris* (*C.vulgaris*) mavi-yeşil alg türüdür ve sterilize edilmiş BG-11 besin ortamı kullanılarak yetiştirilmektedir. BG-11 besin ortamının 1 litresinde; 1,5g NaNO₃, 0,04 g K₂HPO₄, 0,075 g MgSO₄.7H₂O, 0,036 g CaCl₂.2H₂O, 0,006 g sitrik asit, 0,006 gr demir (II) amonyum sitrat, 0,001 g EDTA (disodyum tuzu), 0,02 g Na₂CO₃ ve 1 mL iz element karışımı bulunmaktadır. İz element karışımının 1 L'si ise 2,86 g H₃BO₃, 1,81 g MnCl₂.4H₂O, 0,222 g ZnSO₄.7H₂O, 0,39 g CuSO₄.5H₂O ve 0,0494 g Co(NO₃)₂.6H₂O içermektedir (Stanier ve ark., 1971; Andersen, 2005).

BG-11 besin ortamında geliştirilen *Chlorella vulgaris* deneysel çalışma için kullanılan biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu içerisine aşılanmaktadır. Kullanılan atıksu, 24 saatlik kompozit numune olup Şen Piliç – Türkiye'nin kanatlı hayvan kesimhane atıksuyu aktif çamurlu biyolojik arıtma tesisinin çıkış kısmından alınmıştır. Biyolojik olarak arıtılmış suyun kompozisyonu Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu (Şen Piliç Atıksu Arıtma Tesisi)

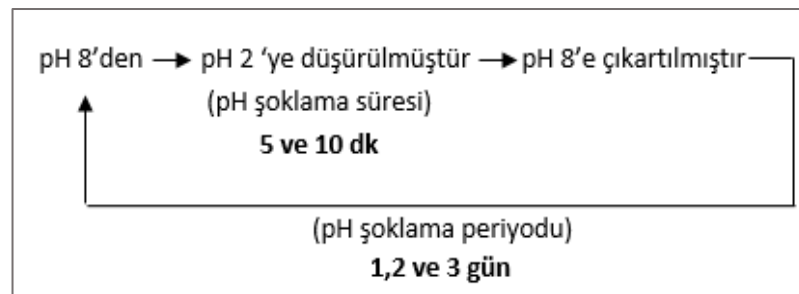
Parametre	Değer	Parametre	Değer
KOİ (mg/L)	200	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	13,2
Yağ&Gres (mg/L)	25	TN (mg/L)	168
NO ₂ ⁻ -N	0,33	TOC (mg/L)	17,3
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	100,6	pH	6,94
PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	3,76		

3.2. Kanatlı Hayvan Kesimhanesi Atıksuyunda Mikroalg Yetiştirilmesi

Kullanılan biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda rotifer ve bakteriler bulunmaktadır. Özellikle rotiferler mikroalgleri tüketmektedirler ve bu sebeple kültür ortamına herhangi bir müdahale edilmemesi sonucunda kısa süre içerisinde alg ölümü gerçekleşmektedir. Bu nedenle ortam pH'ına müdahale ederek farklı yöntemler ve ışık yoğunluklarında optimum *Chlorella vulgaris* yetiştirilmesi amaçlanmıştır.

3.2.1. pH şoklama çalışması

Chlorella vulgaris mikroalg kültürü içeren numuneler ile ışık yoğunluğu ve karıştırma hızı sabit tutularak, 150 rpm karıştırma hızı ile sağlanacak havalandırma ile, her bir kültür ortamı 800 mL olmak üzere 1 L'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Işık yoğunluğu $60 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ olarak belirlenmiştir. Ortam pH'ı belirli (5 ve 10 dk) sürelerle 2'ye düşürülüp tekrar 8'e yükseltilmiştir. Bu değişim belirli periyodlarla (1, 2 ve 3 gün) tekrarlanmıştır ve alg gelişimi için en uygun şartlar belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. pH şoklama çalışmasındaki pH değiştirme süresi ve periyodu

3.2.2. Alkali pH'ta *Chlorella vulgaris* kültürü geliştirme çalışmaları

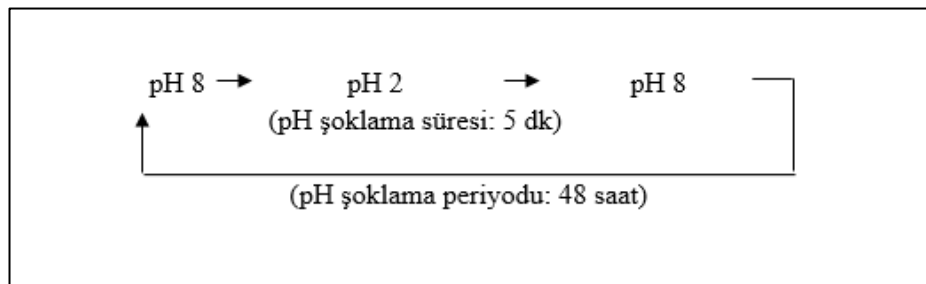
Chlorella vulgaris mikroalg kültürü içeren numuneler ile $100 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda, 150 rpm karıştırma hızı ile sağlanacak havalandırma ile, her bir kültür ortamı 800 ml olmak üzere 1 L'lik erlenlerin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Mikroalg

hücrelerine zarar vermeden rotifer ve bakterileri yok etmek amacıyla alkali pH'larda çalışılmıştır. Atıksu içeren kültür ortamı için 5 farklı numune hazırlanıp pH'ları sırasıyla; pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11 ve pH 11,5'da sabit tutulmuştur.

3.2.3. Optimum şartlarda ışık yoğunluğunun etkisinin incelenmesi

20, 60, 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında 12 gün boyunca BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde *Chlorella vulgaris* kültürü geliştirilmiştir. 150 rpm karıştırma hızı ile sağlanacak havalandırma ile, her bir kültür ortamı 800 mL olmak üzere 1 L'lik erlenlerin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir ışık yoğunluğu için 4 farklı numune hazırlanmıştır. Bu numuneler BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 olarak isimlendirilmiştir. Numunelerden iki tanesi besin ortamı olarak BG11 içerirken, iki tanesi ise biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunu içermektedir.

- BG11, kontrol numunesi olup hiçbir şekilde pH'ına müdahale edilmemiştir.
- C5,2 numunesinin pH'ı, atıksu içerisindeki zararlı mikroorganizmaları öldürmek amacıyla, 2 günde bir 5 dakika boyunca pH 2'de tutulup 5. dakika sonunda pH 8'e ayarlanmıştır (Şekil 3.2.).
- BG11pH numunesi atıksu için yapılan pH şoklama işleminin BG-11 içeren besin ortamında yetişen mikroalgleri nasıl etkilediğinin incelenmesi amacıyla hazırlanmıştır. pH şoklama işlemi C5,2 numunesi ile aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir.
- pH 10,5 numunesi ise mikroalglerin alkali ortamda atıksu içerisinde gelişimlerinin belirlenmesi ve pH şoklama şartları (C5,2 numunesi ile) kıyaslanması için hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Optimum ışık yoğunluğunu belirlenme çalışmasındaki pH şoklama süresi ve periyodu

3.2.4. Optimum şartlarda CO₂ ilavesinin etkisinin incelenmesi

Optimum şartlarda mikroalg gelişim ortamına CO₂ ilavesinin alg kültür gelişimine ve lipid miktarına etkisinin incelenmesi amacıyla ışık yoğunluğu ve karıştırma hızı sabit tutularak BG11, BG11-C, C5,2 ve C5,2-C olarak isimlendirilmiş 4 farklı numune ile çalışılmıştır. 8. gün sonunda deney sonlandırılmıştır.

- BG11, kontrol numunesi olup hiçbir şekilde pH'ına müdahale edilmemiştir.
- BG11-C numunesi içerisine deney başlangıcında ve 4. günde 10'ar saniye 5 L/dk debi ile CO₂ ilave edilmiştir.
- C5,2 numunesinin pH'ı, 2 günde bir 5 dakika boyunca pH 2'de tutulup 5. dakika sonunda pH8'e ayarlanmıştır.
- C5,2-C numunesinin pH'ı, 2 günde bir 5 dakika boyunca pH 2'de tutulup 5. dakika sonunda pH 8'e ayarlanmıştır. İçerisine deney başlangıcında ve 4. günde 10'ar saniye 5 L/dk debi ile CO₂ ilave edilmiştir.

3.2.5. Optimum şartlarda kültür ortamına nanopartikül ilavesi ile *Chlorella vulgaris*'in enzim aktiviteleri ve toplam lipid miktarları üzerine etkisinin belirlenmesi

Optimum şartlarda mikroalg gelişim ortamına nanopartikül ilavesinin alg kültür gelişimine ve lipid miktarına etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Işık yoğunluğu ve karıştırma hızı sabit tutularak, belirlenen pH şoklama şartlarında atıksulu kültür ortamına 8 farklı nanopartikül ilave edilmiş ve kontrol numunesi olarak nanopartikül eklenmemiş C5,2 numunesi olmak üzere toplam 9 farklı numune ile çalışılmıştır. Kullanılan nanopartiküller; CeO₂<25 nm, CeO₂<50 nm, TiO₂<25 nm, CeO₂<100 nm, ZnO<50 nm, ZnO<100 nm, Al₂O₃<13 nm ve Al₂O₃<50 nm'dir ve 10 mg/L konsantrasyonunda mikroalg gelişim ortamına eklenmiştir.

3.3. Atıksu Analizleri

Mikroalglerin gelişimi için kullanmış olduğu nütrientlerin belirlenmesi amacıyla dört günde bir alg gelişim ortamlarından örnekler alınmıştır. Numuneler öncelikle 14000 rpm'de 20 dakika süresince +4°C'de santrifüj edilmiştir. Böylece mikroalg ve besin ortamları birbirinden ayrılmıştır. Analizler sıvı kısım ile yapılmıştır. Spektrofotometrik analizler için MERCK marka Pharo 3600 spektrofotometre kullanılmıştır. Numunelerdeki besin giderimlerini belirlemek için, APHA 4500-NH₄F yöntemi ile amonyum (N-NH₄⁺), APHA 4500-NO₃ yöntemine ile nitrat (N-NO₃⁻), APHA 4500-PC yöntemi ile fosfat (P-PO₄³⁻) eşdeğer analizleri spektrofotometrik yöntemler ile yapılmıştır (APHA, 2017).

3.4. Yetiştirilen Biyokütlenin Analizleri

Mikroalg gelişimi pH, sıcaklık (°C), toplam askıda katı madde (mg/L) ve klorofil-a analizleri ile izlenmiştir. Biyokütle gelişim süresi sonunda ise susuzlaştırarak biyokütle hasat edilmiş, lipit ekstraksiyonu ve transesterifikasyon prosesleri ile üretilen biyokütlenin biyodizel üretimi için uygunluğu araştırılmıştır.

3.4.1. Toplam biyokütle analizi

Kültür ortamında gelişen *Chlorella vulgaris* kütlelerinin tespiti için toplam biyokütle için Askıda katı madde (AKM) ve canlı *Chlorella vulgaris* kütlelerinin takibi için klorofil a tayinlerinden faydalanılmıştır. Deney başlangıcından itibaren dört günde bir numune alınarak alg gelişimi takip edilmiştir. Toplam biyokütle için yapılan AKM tayini standart metotlar yöntem: APHA 2540-D kullanılmıştır. Sabit tartıma getirilmiş standard cam elyaf 0,45µm gözenek çaplı filtre kâğıdından süzülerek 103-105°C'de kurutulup sabit tartım şartlarında tekrar tartılması ile belirlenip (Denklem 3.1) ile hesaplanmıştır (APHA, 2017).

$$AKM (mg/L) = \frac{(A-B)*1000}{V} \quad (3.1)$$

A= Filtre kağıdı + kuru kalıntının tartımı (mg), B= Filtre kağıdının tartımı (mg), ve V= Numune hacmi (ml)'ni ifade etmektedir.

3.4.2. Klorofil-a analizi

Karakteristik bir alg pigmenti olan klorofil a, planktonik alg biyokütlesinin kuru ağırlığının yaklaşık %1-2 oluşturur (EPA, 1991). Bu nedenle biyokütle takibi için klorofil-a tayini oldukça önemlidir. Klorofil-a analizi için, toplam biyokütle analizinden elde edilen filtre kağıdı üzerindeki alg kütlesi ile ESS Method 150.1: Chlorophyll – Spectrophotometric yöntem ile klorofil-a tayini yapılmıştır (EPA, 1991). Filtre kağıdı makas yardımıyla küçük parçalara kesilmiş ve üzerine 5 mL aseton eklenmiştir. 5 gün süre sonunda spektrofotometrik analiz ile 663, 665, 630 ve bulanıklık kontrolü için 750 nm dalga boylarında ölçüm alınmıştır. Elde edilen absorbans değerleri (Denklem 3.2) ile klorofil a miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil a } \mu\text{g/L} = \frac{[11.64 (\text{Abs}_{663}) - 2.16 (\text{Abs}_{645}) + 0.10 (\text{Abs}_{630})] E(F)}{V(L)} \quad (3.2)$$

F = Seyreltme faktörü, E = Ekstraksiyon için kullanılan aseton (mL), V = Filtre edilen suyun hacmi (L), L = Quartz küvet uzunluğu (cm)'i ifade etmektedir.

3.4.3. Yetiştirilen biyokütlenin hasat edilmesi

Yetiştirilen biyokütle 50 ml santifüj tüplerinin yardımı ile 4000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Üzerindeki sıvı kısım alınarak lipit ekstraksiyonu öncesinde hücre parçalanması için hazır hale getirilmiştir.

3.4.4. Hasat edilen biyokütlenin hücre parçalanması için uygulanan ön işlem

Lee ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmadaki yöntem örnek alınarak otoklav ve nitrik asit beraber kullanılmıştır. Hücre parçalama için toplam kuru biyokütle %0,5 nitrik asit içeren 100 ml distile su ile 121°C'de 30 dk otoklavlanmıştır. Sıvı kısım 35°C'de vakumlu etüvde tamamen kurutulmuş ve lipit ekstraksiyonuna hazırlanmıştır.

3.4.5. Lipit ekstraksiyonu ve toplam lipit miktarlarının hesaplanması

Ekstrakte edilen toplam lipit miktarı kloroform-metanol karışımı ile ekstaksiyonu sonrasında gravimetik olarak ölçülmüştür (Bligh ve Dyer, 1959; Soares ve ark., 2014). Soares vd. (2014). tarafından yapılan çalışmadaki ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Otoklavda parçalanmış alg biyokütlesi lipit ekstraksiyonu için 15 mL kloroform/metanol (2:1 v/v) ile orbital karıştırıcıda 150 rpm'de 2 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Lipit ekstraksiyonundan sonra solvent 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir ve sıvı faz önceden sabit tartımı alınmış bir vial aktarılmıştır. Katı kısmı ise tekrar 15 mL kloroform/metanol (2:1 v/v) karışımı ile 1 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir ve aynı vial içerisine aktarılmıştır. 35°C de vakumlu etüvde kuruyana kadar bekletilmiştir. Sabit tartım şartlarında tekrar tartılarak gravimetrik olarak toplam lipit miktarı hesaplanmıştır.

3.4.6. Transesterifikasyon işlemleri

Elde edilen trigliserit içeren yağ, transesterifikasyon olarak adlandırılan bir reaksiyonda metanol ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda yağ asitlerinin (biyodizel) ve gliserolün metil esterleri üretilir (Chisti, 2008). Kullanılan transesterifikasyon yöntemi Soares ve ark. (2014)'den modifiye edilmiştir. Transesterifikasyon işlemine başlamadan önce esterifikasyon çözeltisi hazırlanmış ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Esterleştirme çözeltisi, 3 g NH_4Cl , 90 ml metanol ve 4,5 mL %98'lik H_2SO_4 'ün bir geri soğutuculu sistem ile 15 dakika ısıtılmasıyla elde edilmiştir.

Numunelerden elde edilen toplam lipitlerin tamamı, transesterifikasyon için kullanılmıştır. Toplam lipit içeren vial 5 mL metanol eklenmiştir. Eklenen metanol içinde tamamen çözünen toplam lipitlere 0,5 mL 0,5 M NaOH ilave edilmiştir. Şişe kapatılıp 90°C'de bir su banyosunda 10 dakika boyunca ısıtılmış, ardından buz banyosunda soğutulmuştur. 1,5 mL esterleştirme karışımı eklenen vial tekrar 10 dakika su banyosunda 90°C'de ısıtılmış ve ardından buz banyosunda soğutulmuştur.

Viale 2,5 mL n-heptan ve 5 mL distile su ilave edilmiştir ve vorteks çalkalayıcıda 30 saniye çalkalanmıştır. Fazların ayrılması için bir süre bekledikten sonra ayrılan fazların üst kısmı alınarak başka bir vialle aktarılmıştır. Üst faz, n-heptan içinde yağ asidi metil esterlerini (FAME) içermektedir.

3.4.7. GC ile yağ asidi metil ester profilinin belirlenmesi

Yağ aside metil esterlerinin profili, bir GC/MS detektörü ve yüksek polar bir Rt2560 kapiler kolonu (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm) ile donatılmış bir gaz kromatografi (Shimadzu - QP 2010 GC/MS) üzerinde belirlenmiştir. Gaz kromatografinin ilk fırın sıcaklığı 100°C'dir, 3°C/dk ile 220°C'ye yükselmeye programlanmıştır ve 36 dakika boyunca tutulmuştur. Enjeksiyon sıcaklığı 225°C, split oranı 1:50, dedektör sıcaklığı 175°C'dir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz hızı 18 cm/s ve akış hızı 0,33 mL/dk'dır (Tanattı ve ark., 2018).

3.5. Optimum Şartlarda Mikroalg Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Optimum şartlarda geliştirilen mikroalglerin stres şartlarının oluşturması ve lipit miktarını arttırmak amacıyla nanopartikül ilavesi yapılmıştır. CeO₂<25 nm, CeO₂<50 nm, TiO₂<25 nm, CeO₂<100 nm, ZnO<50 nm, ZnO<100 nm, Al₂O₃<13 nm ve Al₂O₃<50 nm olmak üzere 8 farklı nanopartikül içeren ve kontrol numunesi olarak nanopartikül eklenmemiş C5,2 numunesi olmak üzere toplam 9 farklı numune ile çalışılmıştır. Alg gelişim ortamlarında oluşan H₂O₂ miktarı, MDA cinsinden ölçülen lipit peroksidasyon miktarı, APOD enzimi ve SOD enzimleri ölçülmüştür. Eklenen nanopartiküllerin lipit üzerine etkisi ve lipit yıkımına karşı savunma amacıyla üretilen enzimlerin oluşumları incelenmiştir.

3.5.1. H₂O₂ miktar analizi

Stres şartlarında H₂O₂ değişiminin saptanması için yapılan analizde Yun ve ark. (2019) yöntemi kullanılmıştır. H₂O₂ analizi için alg kültür ortamından alınan 15 mL numune 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenir. Elde edilen pelet 5 mL %0,1

triklorikasit (TCA) yardımıyla 4°C’de homojenize edilir. Homojenize edilen çözelti 4500 rpm’de 15 dakika boyunca tekrar santrifüjlenir. Bir cam tüp içerisine santrifüjlenmiş olan 0,5 mL supernatant, 1 mL 1 M potasyum iyodür (KI) ve 0,5 mL 0,1 M Tris çözeltisi (pH 7,6) eklenir. Çözeltinin absorbans değeri spektrofotometrede 390 nm dalga boyunda ölçülür. Hazırlanan standart grafikten H₂O₂ miktarı nmol/g olarak hesaplanır.

3.5.2. Lipit peroksidasyon analizi (LPO)

Lipit peroksidasyon enzim analizi (LPO) için malondialdehit (MDA) yöntemi kullanılmıştır (Heath ve Packer, 1968). Alg kültür ortamından alınan 15 mL örnek 4500 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenir. Ardından sıvı kısım bir pipet yardımıyla alınarak kalan alg kütlesi ve santrifüj tüpü birlikte tartılır. Santrifüj tüplerinin arasından faydalanılarak alg kütlesinin yaş ağırlığı hesaplanır. Elde edilen pellet hazırlanmış olan 5 mL %0,1 triklorikasit (TCA) yardımıyla 4°C’de homojenize edilir. Homojenize edilen çözelti 4500 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenir. Bir cam tüp içerisine santrifüjlenmiş olan 0,5 mL supernatant, 1 mL %20 triklorikasit - %0,1 tiyobarbitürikasit (TCA-TBA) çözeltisi ve 0,5 mL 0,1 M tris çözeltisi (pH 7,6) eklenir. Elde edilen çözelti 1 saat boyunca 95 °C su banyosunda bekletilir. Soğuduktan sonra çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında ölçülür.

$$\text{Abs} = \epsilon.C.L \quad (3.3)$$

MDA konsantrasyonu Denklem 3.3’ten hesaplanır ve 1 gr mikroalg dokusundaki MDA konsantrasyonu tespit edilir. MDA ekstinksiyon katsayısı 155 mM cm⁻¹ olarak alınmıştır ve MDA miktarları (nmol/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Kaplan ve ark., 2016).

3.5.3. Toplam askorbat peroksidaz analizi (APOD)

Toplam askorbat peroksidaz (APOD) enzim aktivitesini ölçmek için Nakano ve ark. (1981) metodu kullanılmıştır. Alg kültür ortamından alınan 2 mL örnek +4°C 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir. Sıvı kısımdan ayrılarak alg kültesi pH 7,2 ayarlanan 2 mL APOD homojenizasyon çözeltisi ile (0,2 M Tris, 2 mM EDTA ve 4 mM askorbik asit) +4°C'de homojenize edilir. Tekrar +4°C 14000 rpm'de 20 dakika tekrar santrifüjlenir. 0,8 mL 50 mM K₂HPO₄ (pH 6,6), 0,1 mL 2,5 mM ASC çözeltisi, 0,1 mL supernatant ve ölçümden hemen önce 0,1 mL 10mM H₂O₂ çözeltisi ilave edilir. Spektrofotometrede 290 nm dalgaboyunda ölçüm alınır. 3 dakika sonrasında 290 nm'de tekrar ölçüm alınır. Enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı 2,8 mM/cm ile hesaplanır.

3.5.4. Toplam süperoksit dismutaz analizi (SOD)

Toplam süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini ölçmek için Dhindsa ve ark. (1981) metodu kullanılmıştır. Alg kültür ortamından 2 mL numune alınır ve +4°C 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir. Sıvı kısımdan ayrılarak alg kültesi 2 mL SOD ezme çözeltisi ile homojenize edilir. SOD ezme çözeltisi; 100 mM K₂HPO₄ çözeltisi (pH 7,2) içermektedir. Homojenize edilen alg kültesi +4°C 14000 rpm'de yeniden 20 dakika santrifüjlenir. SOD reaksiyon çözeltisi; % 1'lik triton, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 5,7x10⁻⁵ nitroblue tetrazolium (NBT), 9,9x10⁻³ M metionin içermektedir. Cam tüp içerisine; 1 ml reaksiyon çözeltisi üzerine 0,01 mL santrifüjlenen sıvı fazı ve 0,01 mL riboflavin çözeltisi ilave edilerek karıştırılır. Cam tüp 15 dakika boyunca 1000 Watt'lık ışığa maruz bırakılır. Daha sonra 560 nm'de spektrofotometreden ölçüm alınır. Hazırlanan standart grafikten toplam SOD enzim miktarı (U/mg protein) cinsinden hesaplanmaktadır.

3.6. Kinetik Hesaplamalar

Reaksiyon süresi ve reaksiyon hız sabitine göre kinetik model hesaplamaları yapılmıştır. Yapılan kinetik model hesaplamalara göre regresyon katsayı değerleri

hesaplanmıştır. Mikroalglerin gelişimi için biyokütle ve klorofil-a artışları için yapılan kinetik hesaplamalarda birinci derece ve ikinci derece kinetik modeller incelenmiştir. İncelenen kinetik modeller için k ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

Kinetik denklemler (Denklem 3.4.) ve (Denklem 3.5.) aşağıda verildiği gibidir, (Lam ve ark., 2017):

$$1. \text{ mertebe kinetik} \quad : \ln \frac{C_0}{C} = k \cdot t \quad (3.4)$$

$$2. \text{ mertebe kinetik} \quad : \frac{1}{C} - \frac{1}{C_0} = k \cdot t \quad (3.5)$$

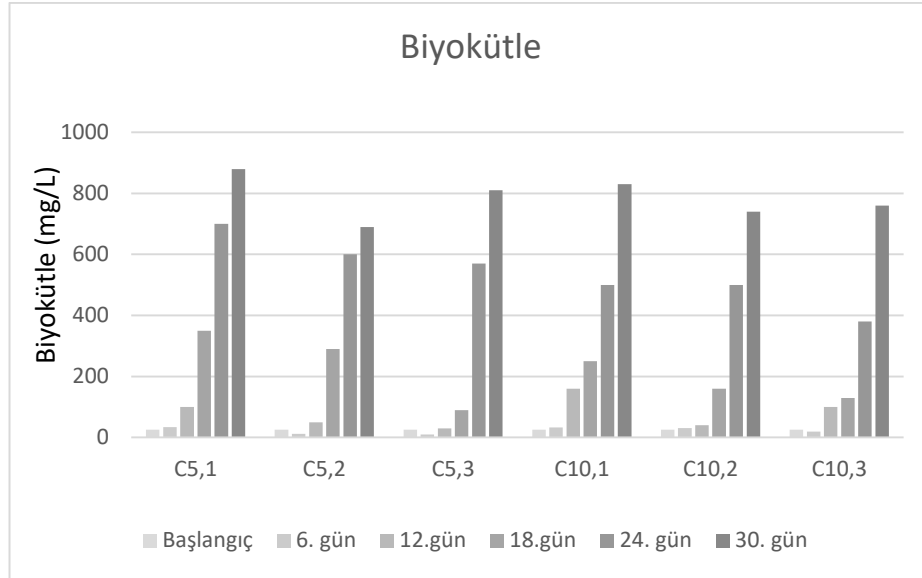
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. pH Şoklama Çalışmaları

Kullanılan biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda rotifer ve bakteriler bulunmaktadır. Rotiferlerin mikroalgleri tüketmesi sebebiyle mikroalg ölümleri gerçekleşmektedir. Bu nedenle ortam pH'ına müdahale ederek pH şoklama yöntemi ile *Chlorella vulgaris* yetiştirilmesi amaçlanmıştır. En uygun pH şoklama süresinin ve periyodunun belirlenmesi amacıyla *Chlorella vulgaris* kültürü içeren numuneler ile 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda ve 150 rpm karıştırma hızında her bir kültür ortamı 800 ml olmak üzere 1 L'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. 30 gün boyunca mikroalg gelişimi takip edilmiştir.

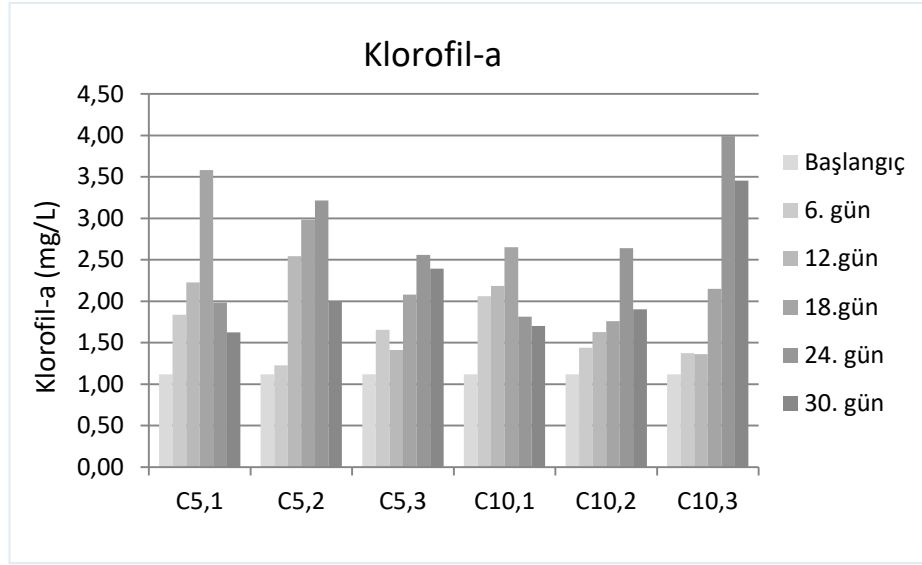
4.1.1. pH şoklama çalışmalarının biyokütle artışına etkisi

Deney başlangıcından itibaren 30 gün boyunca 6 günde bir olmak üzere biyokütle takibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1.'de verildiği üzere; başlangıçta 26 mg/L mikroalg içeren numunelerde biyokütle, zamana bağlı olarak tüm numunelerde artış göstermiştir. pH şoklamanın rotiferler üzerine olan olumsuz etkisinin azalması ile zaman içerisinde mikroalg artışının hız kazanmıştır. Biyokütle artışı açısından her gün pH'ı 2'de 5 ve 10 dakikalık sürelerde tutulan C5,1 ve C10,1 numunelerinde deney sonunda daha fazla miktarda mikroalg biyokütleleri elde edilmiştir. pH'ı üç günde bir pH 2'ye getirilen C5,3 ve C10,3 numunelerinde rotiferlerin yok olması uzun zaman aldığı için daha uzun süre sonra belirgin biyokütle artışları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. pH şoklama çalışmasında zamana bağlı biyokütle grafiği. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Biyokütle miktarı hem canlı, hem ölü ancak parçalanmamış hücreleri içermektedir. Klorofil-a miktarı ise canlı ve sağlıklı mikroalg hücrelerinde bulunan klorofil pigmentini temsil etmektedir. pH şoklama deneyinde zamana bağlı klorofil-a miktarının değişim grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir. Başlangıçta 1,12 mg/L olan ölçülen klorofil-a miktarı zamanla genel olarak tüm numunelerde artış göstermiştir. Klorofil-a miktarları incelendiğinde zamanla meydana gelen artışın besin azalması, pH şoklamanın alg üzerine olan olumsuz etkileri, kültür ortamı içerisindeki yaşlı alg hücrelerinin artması gibi sebepler ile azalma eğilimine girdiği anlaşılmaktadır. pH şoklama deneylerinde, deney başlangıcında eklenen biyolojik olarak arıtılmış atıksu dışında deney süresi içerisinde herhangi bir besin ilavesi yapılmamıştır. Besin azalmasının etkisi ile de mikroalg gelişimi bir süre sonunda durgunluk fazına ve ardından ölüm fazına geçmiştir. Zamanla ölü mikroalg hücrelerin sayısının yükselmesiyle sabit kalan hücre konsantrasyonunda azalış başlamıştır ve “ölüm fazı” adı verilen son evreye ulaşılmıştır (Çirik ve Gökpınar, 2008).



Şekil 4.2. pH şoklama çalışmasında zamana bağlı klorofil-a grafiği. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Özellikle klorofil-a sonuçlarına göre deney süresinin 30 günden daha kısa süreli olması gerektiğine karar verilmiştir. Tüm pH şoklama numunelerinin rotifer ölümü ve mikroalg artışı üzerinde etkili olduğu Şekil 4.1.'den ve Şekil 4.2.'ten anlaşılmaktadır. Biyokütle artışı ve klorofil-a miktarının artışının yanısıra optimum pH şoklama süresi ve periyodunun belirlenmesi için biyodizel üretiminde önemli olan toplam lipid miktarı ve yağ asidi metil ester içerikleri açısından da incelenmesi ve yorumlanması gerekmektedir.

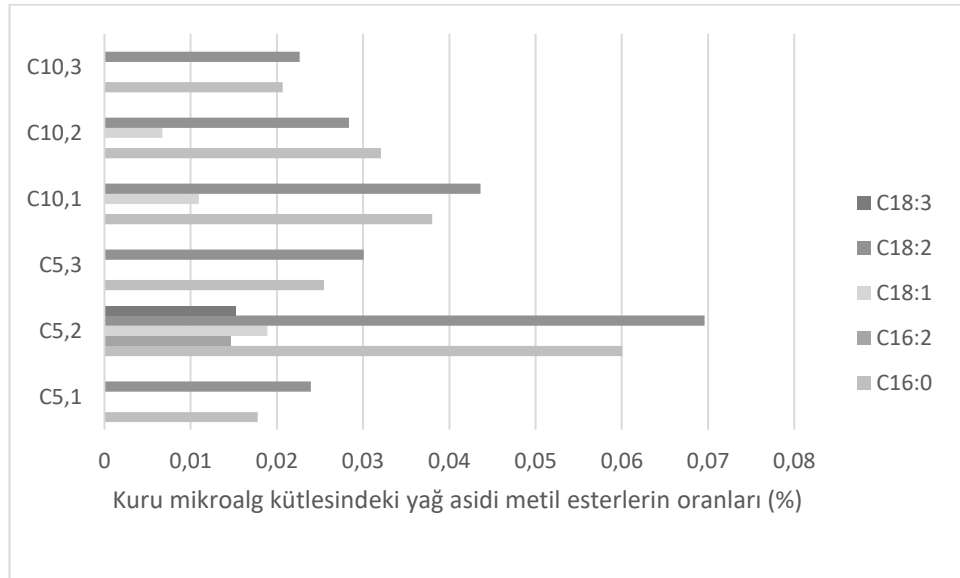
4.1.2. pH şoklama çalışmalarının toplam lipid ve yağ asidi oluşumuna etkisi

pH şoklama yapılan numunelerin toplam lipid miktarına ve kuru biyokütlerdeki lipid oranına etkisi Tablo 4.1.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla lipid C5,2 numunesinde, en az lipid miktarı ise C10,3 numunesinde oluşmuştur. C5,2 numunesinin toplam lipiti 0,118 gr olarak hesaplanmıştır. Kuru biyokütlerdeki lipid oranı ise en fazla C5,2 numunesinde %17,35 ile; en düşük ise C5,3 numunesinde %12 ile elde edilmiştir. pH değerinin 2'de kaldığı sürenin uzunluğu oluşan toplam lipid miktarını olumsuz etkilemiştir.

Tablo 4.1. pH şoklama çalışmasında elde edilen toplam lipit miktarı ve kuru biyokütlerdeki lipit oranı. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

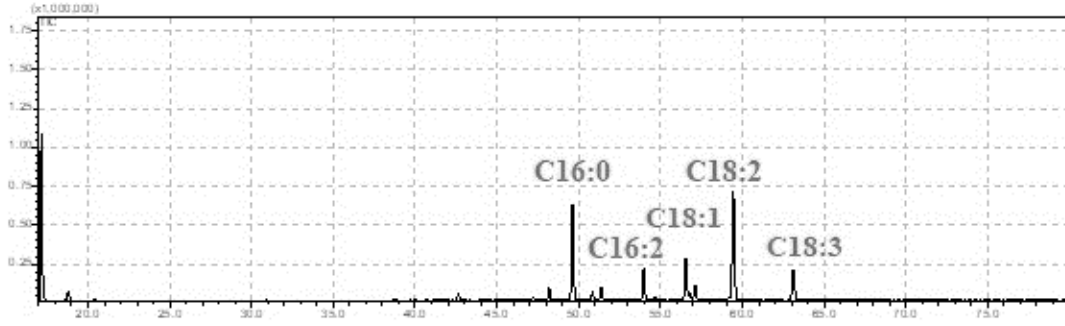
Numune	Toplam lipit (gr)	Kuru biyokütlerdeki lipit oranı (%)
C5,1	0,072	15,00
C5,2	0,118	17,35
C5,3	0,066	12,22
C10,1	0,083	14,72
C10,2	0,076	14,62
C10,3	0,062	15,12

Elde edilen toplam lipitlerden transesterifikasyon prosesi ile yağ asidi metil esterleri (FAME) oluşturulmuştur. Elde edilen FAME tür ve toplam gelişen mikroalgdeki oranları Şekil 4.3.'te verilmiştir. Oluşan tür ve miktar olarak C5,2 numunesi toplam lipitte de olduğu gibi en yüksek FAME içeriğini vermiştir. Mikroalg biyokütlesinden elde edilen yağ asidi metil ester içeriği, mikroalglerin biyodizel üretimi için uygunluğunu değerlendirmek için önemli bir parametredir. C16 ve C18 yağ asidi metil esterlerinin varlığı, kaliteli biyodizelin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017; Deshmukh ve ark., 2019; Gao ve ark., 2019).



Şekil 4.3. pH şoklama çalışmasında elde edilen yağ asidi metil esterlerinin toplam biyokütlerdeki oranları. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

Elde edilen yağ asidi metil esterlerinin miktar ve türleri açısından değerlendirildiğinde, ışık yoğunluğunun etkisinin belirlenmesi çalışmalarında C5,2 numunesine uygulanan pH şoklama şartlarının kullanılmasına karar verilmiştir. C5,2 numunesinin yağ asidi metil esterlerinin içeriği GC-MS ile belirlenenmiştir. Elde edilen FAME türlerine ilişkin kromotogram Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. C5,2'nin içerdiği yağ asidi metil esterlerinin kromotogramı. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

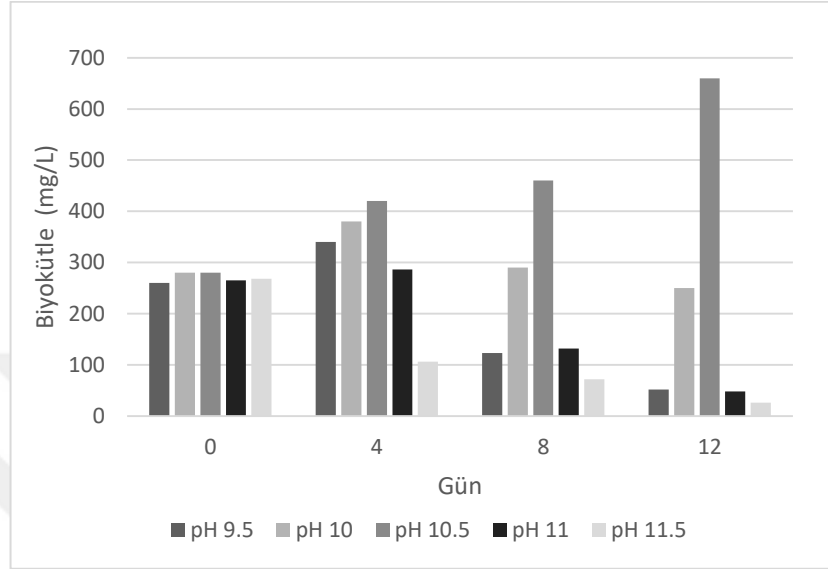
4.2. Alkali pH'ta Mikroalg Kültürü Geliştirme Çalışmaları

Kullanılan biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda bulunan rotifer ve bakterilerin öldürülmesi için ortam pH'ının alkali bir değerde sabit tutulmasının mikroalg gelişimine olan etkisinin incelenmesi için bir deney seti yürütülmüştür. Alkali şartlarda gelişen mikroalglerin biyolojik olarak arıtılmış suyun azot ve fosfor içeriğinin ileri arıtımına olan etkisi de incelenmiştir. En uygun alkali pH'ın belirlenmesi amacıyla *Chlorella vulgaris* kültürü içeren numuneler ile 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda ve 150 rpm karıştırma hızında her bir kültür ortamı 800 ml olmak üzere 1 L'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. 12 gün boyunca mikroalg gelişimi ve kültür ortamındaki nutrient içeriği takip edilmiştir.

4.2.1. Alkali pH'ın biyokütle artışına etkisi

Farklı pH değerine sahip örneklerin zamana bağlı biyokütle artışları Şekil 4.5.'te verilmiştir. Başlangıçta 280 mg/L biyokütleyi sahip numunelerden en yüksek biyokütle artışı 660 mg/L ile pH 10,5'te meydana gelmiştir. *Chlorella vulgaris*'in

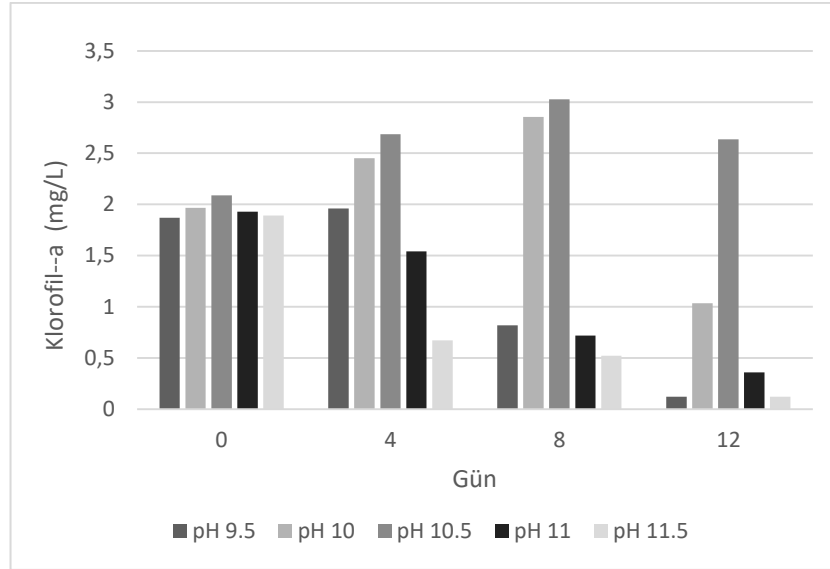
gelişimi için pH 11 ve pH 11,5 numunelerinin pH'ı alg ölümlerine neden olduğu için uygun olmamıştır. pH 11,5'ta hızlı bir şekilde alg ölümü gerçekleşirken, pH 11 de daha yavaş bir ivmede mikroalg biyokütlesi azalmaya başlamıştır.



Şekil 4.5. Alkali pH'ta zamana bağlı biyokütle miktarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$

Ayrıca pH 9,5 ve pH 10 numuneleri mikroalg gelişimi için uygun pH değerlerine sahipken, aynı zamanda mikroalg tüketen rotiferler ve zararlı mikroorganizmalar için de uygun bir gelişim ortamı sağlamaktadır. Bu nedenle pH 9,5 ve pH 10 numunelerinde üreme fırsatı bulan zararlı organizmalar bu numunelerde *Chlorella vulgaris* ölümlerine neden olmuştur. Bununla birlikte, mikroalgler, pH 10'da az miktarlarda da olsa deney süresinin sonunda yaşamaya devam etmiştir.

pH 9,5'te, 4. günden sonra biyokütle miktarları (Şekil 4.5.) ve klorofil-a (Şekil 4.6.) sonuçlarına göre mikroalg ölümleri gözlenmiştir. Klorofil-a miktarlarının değişimi incelendiğinde; başlangıçtan itibaren, mikroalgler biyokütlelerini artırmaya devam etmişlerdir. Öte yandan alg gelişim ortamı, zararlı mikroorganizmaların yaşaması ve büyümesi için de uygun olduğundan pH 9,5'ta 4. günden itibaren çoğalan rekabetçi mikroorganizmalar mikroalg ölümlerine neden olmuştur.



Şekil 4.6. Alkali pH'ta zamana bağlı klorofil-a miktarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$

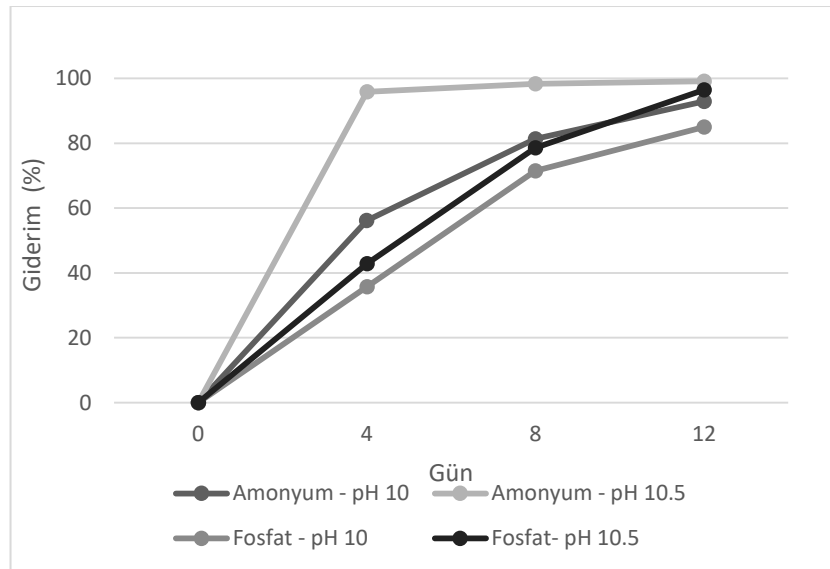
pH 10'da, örneğin pH'ı zararlı mikroorganizmaların büyüme ve mikroalg tüketme hızını azaltsa da, uygun mikroalg kültürü yetiştirmek için yeterli olmamıştır. Biyokütle ve klorofil-a analizlerinin sonuçlarına göre, pH 10,5 optimum biyokütle gelişim değerlerini göstermiştir. Mikroalg biyokütlesi pH 10,5'te 12 günde 262 mg/L'den 660 mg/L'ye yükselmiştir. Benzer şekilde, pH 10,5 numunesindeki klorofil-a miktarı 12 gün sonra 1,92 mg/L'den 2,6 mg/L'ye çıkmıştır. pH kontrol edilmediğinde, başlangıçtaki pH değerinden bağımsız olarak, mikroalgler geliştikçe pH hızla yükselmekte ve 10 civarında sabitlenme eğilimi göstermektedir. Alg kültür ortamının pH değerini aynı seviyelerde tutmak hücre büyümesi için daha iyidir (Gong ve ark., 2014). Benzer şekilde, alkali şartlarda da pH 10,5'te optimum mikroalg büyümesi elde edilmiştir. pH 10,5'e kıyasla pH 10'da daha az mikroalg büyümesinin nedeni, zararlı mikroorganizmaların tamamen yok olmamasıdır.

Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, *Chlorella pyrenoidosa* mikroalg kültürü, otoklavlanmış kümes hayvanı mezbaha atıksuyu ile pH 10,16'da geliştirilmiştir. Otoklavlanmış ve arıtılmamış mezbaha atık suyu, mikroorganizmalardan arınmış bir besin ortamı sağlamıştır. 15. günün sonunda ölçülen en yüksek mikroalg biyokütlesi 430 mg/L, klorofil-a miktarı ise 15,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir (Azam ve ark., 2020). Benzer özelliklere sahip atıksular kullanılsa da, geliştirilen mikroalg biyokütle miktarı ve bunların lipid, klorofil-a

içerikleri gibi yapısal özellikleri mikroorganizmaların varlığına, mikroalg türlerine ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak farklı sonuçlar vermektedir. Ek olarak, mikroorganizmalar-mikroalg konsorsiyumu veya atık sudaki rekabet büyük ölçüde önemlidir ve mikroalg büyümesini doğrudan etkileyen parametrelerdir (Cho ve ark., 2011; Kim ve ark., 2017; Ji ve ark., 2018).

4.2.2. Alkali pH'nın nütrient giderimine etkisi

pH 9,5'te numunede zararlı mikroorganizmaların çoğalması nedeniyle, deney sırasında mikroalg ölümleri meydana gelmiştir. Benzer şekilde hem *Chlorella vulgaris*'in hem de zararlı mikroorganizmaların yaşayamayacağı kadar yüksek pH değerlerine sahip olan pH 11 ve 11,5'te mikroalg ölümleri meydana gelmiştir. Bu sebeplerden dolayı mikroalg kültürünün gelişebildiği pH 10 ve pH 10,5 örneklerinin atıksularından *Chlorella vulgaris*'in kullandığı azot ve fosfor miktarları araştırılmıştır. *Chlorella vulgaris*, kanatlı mezbaha atık suyunda yüksek amonyum giderme kapasitesine sahiptir (Şekil 4.7.). Başlangıç ve 12. gün NH_4^+ miktarları karşılaştırıldığında, amonyum giderimi pH 10'da yaklaşık %92 ve pH 10,5'te yaklaşık %99'dur.



Şekil 4.7. NH_4^+ ve PO_4^{3-} konsantrasyonlarının zamana bağlı giderimleri. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Mikroalglerin zamana bağlı olarak nitrat kullanımları incelendiğinde nitrat miktarlarında giderim yerine azalma ve artışlardan dolayı dalgalanmalar görülmektedir (Tablo 4.2.). Bu durumun nedeni, amonyumun bir kısmının mikroalgler tarafından kullanılmasının yanı sıra nitrifikasyon yoluyla amonyumun nitrate dönüştürülmesidir. Mikroalgler, nitrojen kaynağı olarak öncelikle amonyağı tercih etmektedirler (Zhang, 2015). Ancak bu duruma ek olarak mikroalglerin nitrat formunda da nitrojen kullandığı bilinmektedir (Cabanelas ve ark., 2013).

Tablo 4.2. NH_4^+ , NO_3^- ve PO_4^{3-} konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Gün	NH_4^+ (mg/L)		NO_3^- (mg/L)		PO_4^{3-} (mg/L)	
	pH 10	pH 10.5	pH 10	pH 10.5	pH 10	pH 10.5
0	13	13	100	100	1,4	1,4
4	5,7	0.54	100	104	0,9	0,8
8	2,42	0.22	110	102	0,4	0,3
12	0,92	0.12	120	100	0,21	0,05

pH'ı daha yüksek pH10,5 numunesinin daha yüksek PO_4^{3-} giderim oranlarına sahip olduğu Tablo 4.2.'den anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, pH 10 ve pH 10,5'te %85 ile %96,43 arasında, *Chlorella vulgaris* tarafından PO_4^{3-} giderilmiştir. Mikroalgler, azotlu bileşiklerden daha az fosfora ihtiyaç duymaktadırlar. Mikroalglerin ihtiyaç duyduğu N/P oranı 16/1 olarak kabul edilmesi sebebiyle, *Chlorella vulgaris* tarafından PO_4^{3-} 'ün NH_4^+ 'ten daha az konsantrasyonlarda tüketilmesi oldukça doğaldır. Benzer çalışmalarda da yüksek oranda NH_4^+ ve PO_4^{3-} giderimi elde edilmiştir. İkincil arıtma atık suyunda *Chlorella vulgaris* kültürü ile yapılan bir çalışmada %95'e varan NH_4^+ giderimi ve %86'ya varan PO_4^{3-} giderimi sağlanmıştır (Gao ve ark., 2015). *Chlorella vulgaris* ve *Botryococcus terribilis* kullanılarak ön arıtılmış evsel atıksu ile yapılan bir çalışmada, her parametre için yüksek giderim veriminin elde edildiği bulunmuştur (Cabanelas ve ark., 2013). Benzer şekilde *C.protothecoides*, *C.vulgaris* ve *S.obliquus* ile beş gün boyunca kesimhane atıksularında yapılan deney sonucunda %67 TN ve %69 PO_4^{3-} giderimi elde edilmiştir (Hu ve ark., 2019).

4.2.3. Alkali pH'ın toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi

Biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda alkali şartlarda yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'in biyodizel üretimine uygun olup olmadığını belirlemek için toplam lipit ve yağ asidi metil ester miktarları araştırılmıştır. Atıksu besin ortamında ve BG11 yapay besin ortamında geliştirilen *Chlorella vulgaris* kültürünün yağ oranları ve toplam biyokütlesi karşılaştırılmıştır. Biyolojik olarak arıtılmış kanatlı mezbaha atık suyunda, pH 10,5'te yetiştirilen mikroalg biyokütlesi 0,462 mg ve sentetik besin ortamı olan BG11 içerisinde yetiştirilen mikroalg biyokütlesi ise 0,501 mg'dır. Bununla birlikte, pH 10'da geliştirilen *Chlorella vulgaris* miktarı nispeten daha düşüktür (Tablo 4.3.).

Chlorella vulgaris kuru biyokütlesinin yağ içeriği %5-58 arasında değişmektedir (Safi ve ark., 2014; Schnurr ve Allen, 2015; Ru ve ark., 2020). Mikroalglerin ürettiği yağ miktarı, mikroalg türlerine, miksotrofik koşullara (Ru ve ark., 2020) azot sınırlamasına (Chinnasamy ve ark., 2010), fosfat tükenmesine (Mandal ve Mallick, 2009) ve besin açlığına bağlı olarak değişmektedir. Tablo 4.3.'te verildiği üzere, toplam yağ oranları kuru biyokütle ile karşılaştırıldığında, pH 10,5'te atık su örneğinde % 17,403, BG11 besin ortamında ise % 17,283 toplam lipit yüzdesi elde edilmiştir. pH 10'daki atık su örneğinde ise kuru biyokütledeki lipit oranı % 14,857 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. Alkali şartlarda geliştirilen mikroalg kuru biyokütlerindeki toplam lipit ve FAME oranı. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

	Toplam lipit (mg)	Toplam lipit (%)	Kuru biyokütledeki FAME oranı (%)					Doymuş ve doymamış FAME (%)		
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA	MUFA	PUFA
pH 10	156	14,857	0,086	-	0,010	0,016	0,014	68,20	7,95	23,86
pH 10,5	804	17,403	0,093	-	0,080	0,032	0,011	42,98	37,05	19,95
BG11	865	17,283	0,228	0,02	0,011	0,076	0,034	67,23	3,02	29,75

Palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) pH 10,5'te ve BG11 örneğinde oluşmuştur. pH 10'da palmitik asit baskın olarak oluşmuştur ve kuru biyokütledeki oranı %0,086'dır. Palmitik asit, pH 10,5'te BG11'de

kuru alg biyokütlesinin %0,228'i ve atıksuda %0,093'ü olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.3.).

Chlorella vulgaris'in FAME sonuçları incelenmiş; doymuş ve doymamış yağ asitlerinin oluşum miktarları hesaplanmıştır. BG11'de doymuş yağ asitleri (SFA) C16:0 (palmitik asit) ve C18:1 (oleik asit) %67 oranında oluşturulmuştur. Tekli doymamış yağ asidi C18:1 (oleik asit), atık su örneklerinde BG11 örneğinde %3,02 oranında, pH 10'da %7,95 oranında ve pH 10,5'da %37,05 oranında oluşmuştur. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olan C18:2 (linoleik asit) ve C18:3 (linolenik asit); BG11'de %23,86 oranında, C5,2 numunesinde %19,95 oranında ve pH 10,5'ta %29,75 oranında oluşmuştur. Yağ asidi metil ester profili mikroalglerin büyüme koşullarına göre değişmektedir (Safi ve ark., 2014). Mikroalg biyokütlesinden elde edilen yağ asidi metil ester içeriği, mikroalglerin biyodizel üretimi için uygunluğunu değerlendirmek için önemli bir parametredir. C16 ve C18 yağ asidi metil esterlerinin varlığı, kaliteli biyodizelin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017; Gao ve ark., 2019).

4.3. Optimum Şartlarda Işık Yoğunluğunun Etkisinin Belirlenmesi

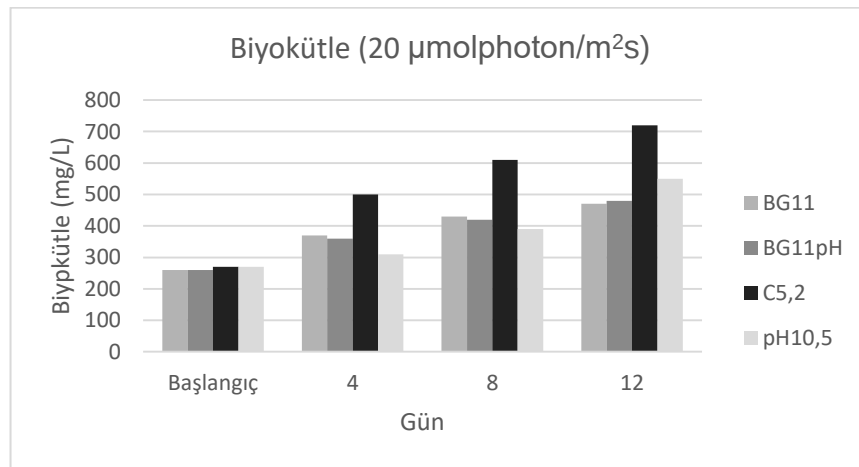
20, 60, 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında 12 gün boyunca BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde *Chlorella vulgaris* kültürü geliştirilmiştir. 150 rpm karıştırma hızı ile, her bir kültür ortamı 800 ml olmak üzere 1 L'lik erlenlerin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir ışık yoğunluğu için 4 farklı numune hazırlanmıştır. Bu numuneler BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 olarak isimlendirilmiştir. Numunelerden iki tanesi besin ortamı olarak BG11 içerirken, iki tanesi ise biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunu içermektedir. 12 gün boyunca zaman bağlı olarak biyokütle ve klorofil-a miktarlarının değişimleri takip edilmiştir.

4.3.1. Işık yoğunluğunu çalışmalarının biyokütle artışına etkisi

Işık yoğunluğunun değişimi ile mikroalg gelişiminin takibi için 4 farklı ışık yoğunluğunda diğer tüm parametreler sabit tutularak çalışılmıştır. 20, 60, 100 ve 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de 12 gün süre ile deneyler yürütülmüştür. Başlangıçta eklenen BG11 ve atıksu numuneleri dışında herhangi bir besin ilavesi yapılmamıştır. Mikroalg gelişiminin besin eksikliğine bağlı olarak gelişiminin etkilenmesini azaltmak amacıyla 12 gün ile sınırlandırılmıştır. Aynı zamanda fazla ışık yoğunluğunun kültür ortamı üzerinde olacak olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla da en yüksek ışık yoğunluğu 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ olarak belirlenmiştir.

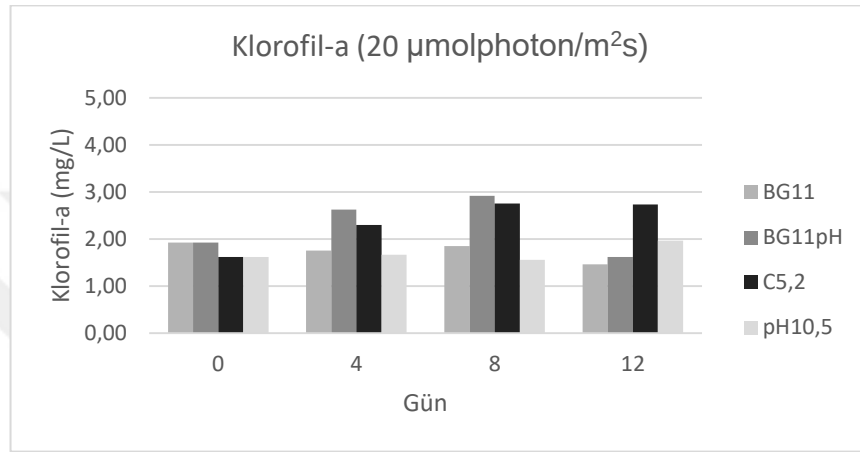
4.3.1.1. 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

Işık yoğunluğu en düşük seviye olan 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ olarak ayarlanmıştır. Karıştırma hızı ve atıksu alg miktarları sabit tutularak 4 numune olarak deney yürütülmüştür. Zamana bağlı olarak düzenli alınan örneklerle biyokütle tayini, klorofil-a tayini, NH_4^+ tayini ve PO_4^{3-} tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.8.'de verildiği üzere, kültür ortamı içerisindeki biyokütle miktarı başlangıçta 215 mg/L iken, 12. gün sonunda 470-720 mg/L arasında artmıştır. En yüksek biyokütle 720 mg/L ile atıksu numunesi olan C5,2 içerisinde oluşurken, en az biyokütle artışını 470 mg/L ile BG11 numunesi göstermiştir.



Şekil 4.8. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda C5,2 numunesi 1,72 mg/L'den 12. Gün sonunda 2,73 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9.). 8. Gün sonunda 2,75 mg/L olarak ölçülen klorofil-a miktarı ışık yetersizliği sebebiyle başlayan mikroalg ölümlerinin sonucu olarak azalma eğilimine girmiştir. Benzer şekilde diğer numuneler de öncelikli olarak artmış daha sonra ışık yoğunluğunun az olması sebebiyle sabit miktarlarda kalmış ya da azalma eğilimine girmiştir.



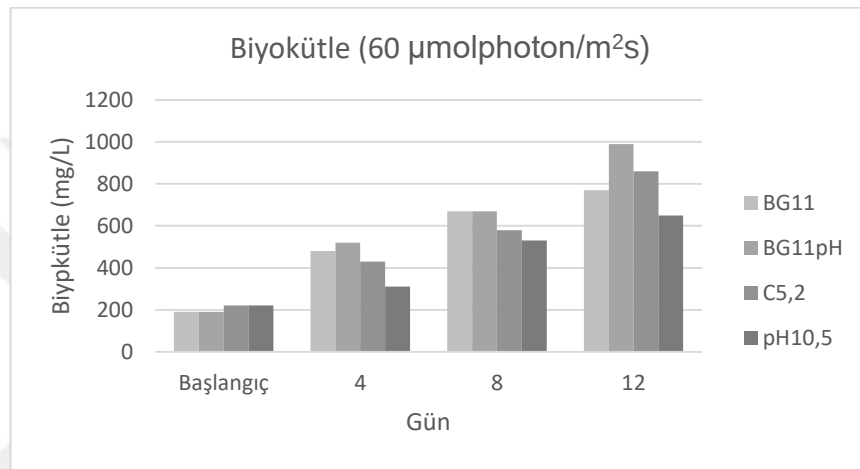
Şekil 4.9. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Biyokütle miktarı tüm canlı ya da parçalanamamış ölü mikroalg hücrelerini içermektedir. Klorofil-a miktarı ise canlı ve sağlıklı hücre içerisinde bulunan klorofil pigmentini temsil etmektedir (Andersen, 2005). Bu sebeple kültür ortamında gerçekleşen alg ölümlerinin hızının artış noktasının yorumlanması zamana bağlı takip edilen klorofil-a miktarı ile mümkün olmaktadır.

4.3.1.2. 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

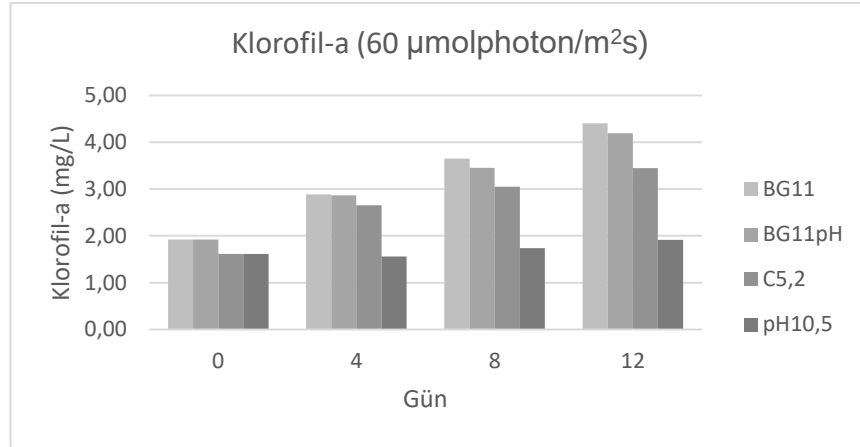
60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda zamana bağlı olarak düzenli alınan örneklerle mikroalg gelişiminin takibi için biyokütle ve klorofil-a tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.10.'da verildiği üzere, kültür ortamı içerisindeki biyokütle miktarı başlangıçta 220 mg/L iken. 12. gün sonunda 650-990 mg/L arasında artmıştır. En yüksek biyokütle 990 mg/L ile BG11 besin ortamını içeren ve pH şoklama yapılmış BG11pH atıksu numunesinde oluşurken, en az biyokütle artışını 650 mg/L ile pH10,5 numunesinde ölçülmüştür. pH şoklama yapılan kanatlı hayvan kesimhanesinin biyolojik olarak

arıtılmış suyunu içeren C5,2 numunesinde ise 12. gün sonunda 860 mg/L biyokütle oluşmuştur. pH şoklama yapılan numunelerde daha yüksek biyokütle artışının görülmesi mikroalglerin ortam stres şartlarına verdikleri yanıt olarak yorumlanabilmektedir. Canlı organizma olan mikroalgler ortam şartlarına adapte olmak amacıyla oluşan strese yanıt olarak farklı tepkiler vermektedirler. Hızlı üreme ya da küçük hücreler oluşturarak pigment, lipit, karbonhidrat ve protein oranlarını değiştirmektedirler (Cabanelas ve ark., 2013).



Şekil 4.10. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: $60 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

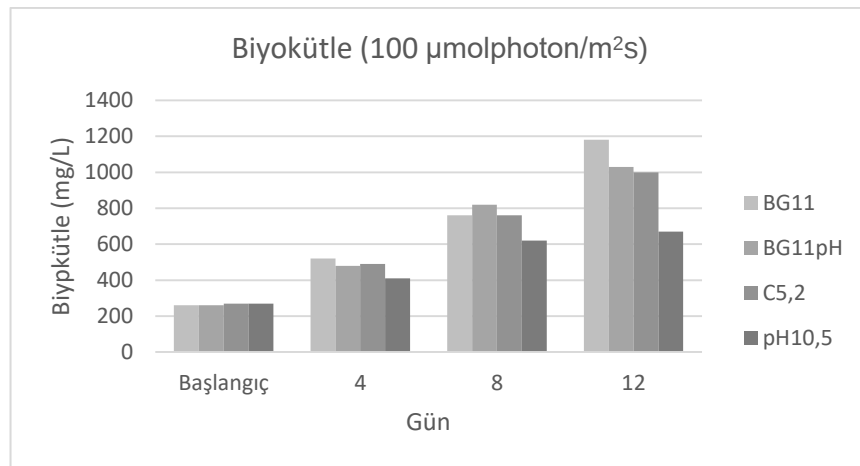
$60 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda C5,2 numunesi $1,72 \text{ mg/L}$ 'den 12. Gün sonunda $3,45 \text{ mg/L}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11.). pH 10,5 numunesinde ise mikroalg gelişimi hemen hemen sabit kalmıştır ve az miktarda bir pigment artışı olmuştur. 12. Gün sonunda pH10,5 numunesinde $1,91 \text{ mg/L}$ klorofil-a miktarı tespit edilmiştir. BG11 içeren numunelerdeki klorofil-a artışı atıksulu numunelerden fazla miktarda ve 4 mg/L 'nin üzerinde klorofil-a miktarına sahiptirler.



Şekil 4.11. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: $60 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

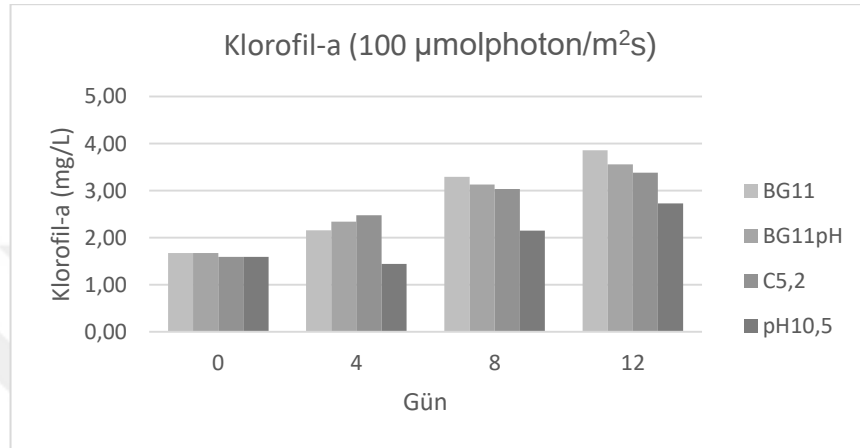
4.3.1.3. $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

$100 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda zamana bağlı olarak düzenli alınan örneklerle mikroalg gelişiminin takibi için biyokütle ve klorofil-a tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.12.'de verildiği üzere, kültür ortamı içerisindeki biyokütle miktarı başlangıçta 270 mg/L iken, 12. gün sonunda $670\text{--}1180 \text{ mg/L}$ arasında artmıştır. En yüksek biyokütle 1180 mg/L ile BG11 numunesinde oluşurken, en az biyokütle artışını 670 mg/L ile pH 10,5 numunesinde ölçülmüştür. C5,2 numunesinde ise 12. gün sonunda 1000 mg/L biyokütle oluşmuştur.



Şekil 4.12. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

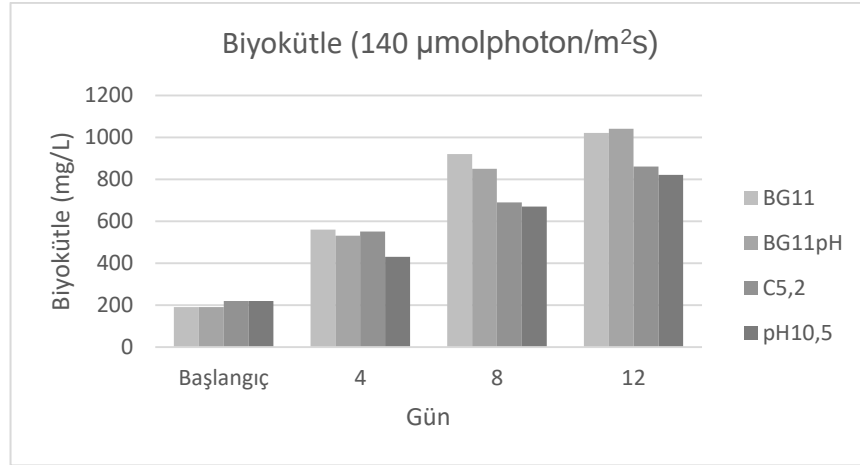
100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda C5,2 numunesi 1,60 mg/L'den 12. Gün sonunda 3,38 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 4.13.). 12. gün sonunda pH 10,5 numunesinde 2,73 mg/L klorofil-a miktarı tespit edilmiştir. BG11 ve BG11pH numunelerinin klorofil-a miktarları sırasıyla 3,86 ve 3,56 olarak ölçülmüştür. C5,2 numunelerinin klorofil-a miktarları sırasıyla 3,86 ve 3,56 olarak ölçülmüştür. C5,2 numunesi BG11 içeren numuneler ile yakın miktarda klorofil-a pigmenti içermektedir.



Şekil 4.13. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

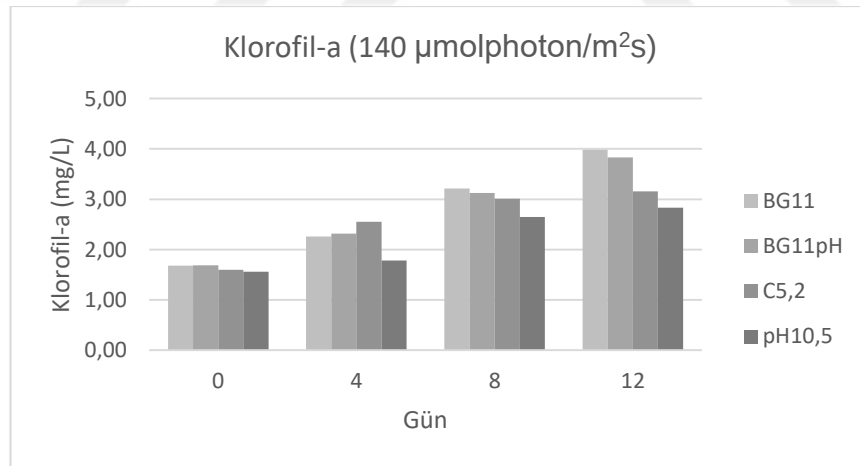
4.3.1.4. 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda zamana bağlı olarak düzenli alınan örneklerle mikroalg gelişiminin takibi için biyokütle ve klorofil-a tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.14.'te verildiği üzere, kültür ortamı içerisindeki biyokütle miktarı başlangıçta 220 mg/L iken, 12. gün sonunda 820-1020 mg/L arasında artmıştır. En yüksek biyokütle 1020 mg/L ile BG11 numunesinde oluşurken, en az biyokütle artışı 820 mg/L ile pH 10,5 numunesinde ölçülmüştür. C5,2 numunesinde ise 12. gün sonunda 860 mg/L biyokütle oluşmuştur.



Şekil 4.14. Zamana bağlı biyokütle oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: $140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

$140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda C5,2 numunesi $1,60 \text{ mg/L}$ 'den 12. Gün sonunda $3,16 \text{ mg/L}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.15.). 12. gün sonunda pH 10,5 numunesinde $2,83 \text{ mg/L}$ klorofil-a miktarı tespit edilmiştir. BG11 ve BG11pH numunelerinin klorofil-a miktarları sırasıyla $3,99 \text{ mg/L}$ ve $3,83 \text{ mg/L}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.15. Zamana bağlı klorofil-a oluşumu mg.L^{-1} . Işık yoğunluğu: $140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

4.3.1.5. Işık yoğunluğu değişiminin biyokütle artışına etkisi

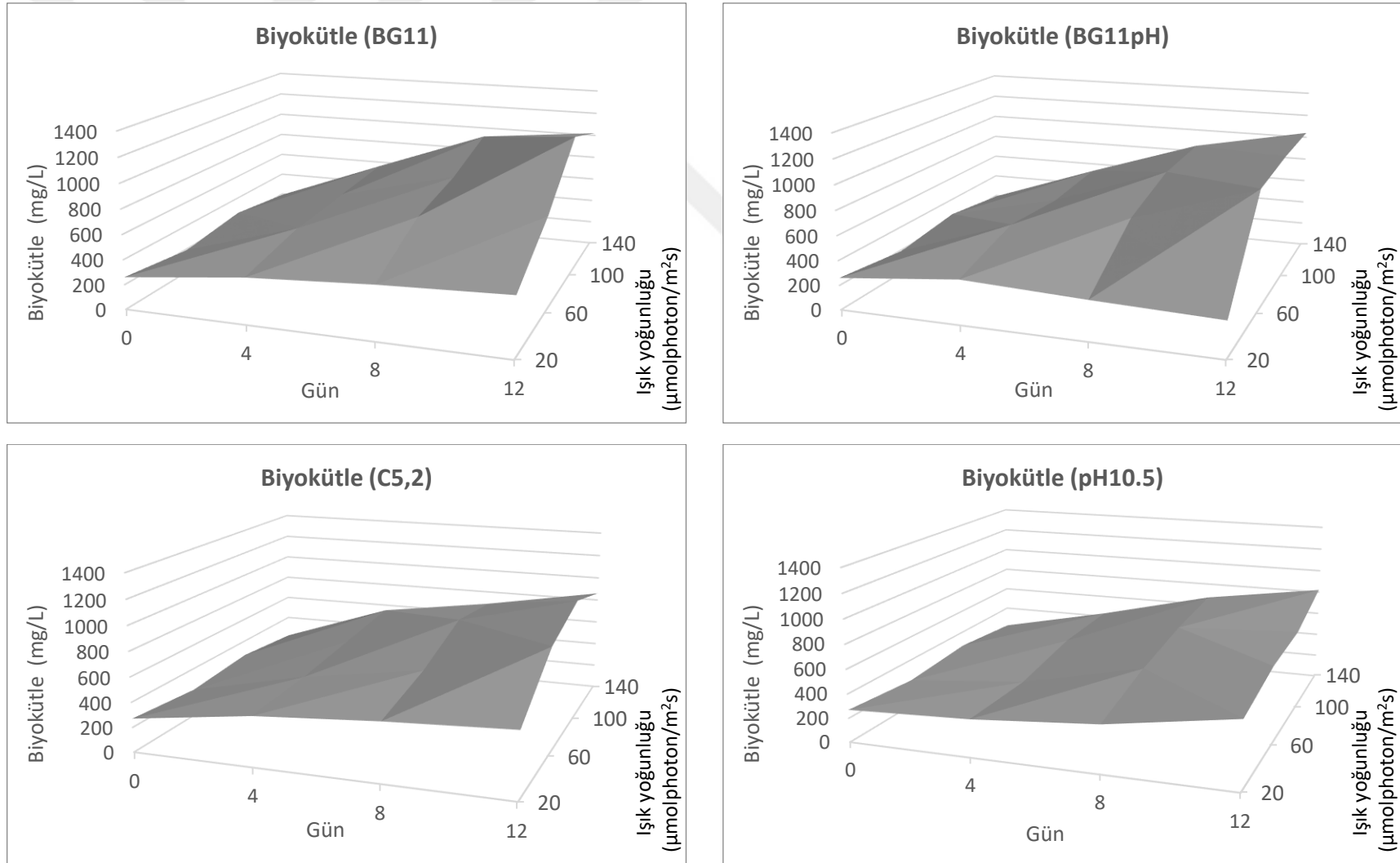
Mikroalg gelişimi için farklı ışık yoğunluklarında (20 , 60 , 100 ve $140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$) yürütülen deneylerde BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5

numunelerinde gelişen *Chlorella vulgaris* biyokütleleri ve bu numunelerin klorofil-a pigment içerikleri kıyaslanmıştır. Zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı olarak tüm numuneler için biyokütle grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.16.'da verilmiştir. Tüm numunelerde ışık yoğunluğu arttıkça biyokütle miktarları da 12 gün boyunca sürekli artış göstermiştir. C5,2 numunesinde kontrol numunesi olan BG11'e kıyasla daha az miktarda biyokütle artışı olmuştur. BG11pH'nın biyokütle artışının BG11'e kıyasla daha yavaş gerçekleşmesi pH şoklamanın mikroalgler üzerine olan etkisi olarak açıklanabilmektedir ve mikroalglerin ortama adaptasyonu ile BG11 içeren numunelerde sonuç itibarıyla yakın miktarlarda biyokütle artışı olmuştur. pH 10,5 tüm numuneler içerisinde en az ve yavaş mikroalg gelişiminin tespit edildiği numune, 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ise mikroalg gelişimi için yetersiz kalan ışık yoğunluğudur. BG11 içeren numuneler 12. gün sonunda 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında 200 mg/L civarından biyokütlelerini 1000 mg/L'nin üzerine çıkartmışlardır. C5,2 numunesi ise 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de 1000 mg/L biyokütle miktarına ulaşırken, pH 10,5 numunesi 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de 800 mg/L biyokütle içermektedir. Bunun sebebi numunelerin atıksu ya da yapay besin ortamı ile beslenmesi, bu ortamların besin içeriği, ortamdaki yarışıl mikroorganizma varlığının etkisidir. Bu çalışmada olduğu gibi literatürdeki çalışmalarda da yüksek ışık yoğunluğunun alg gelişimi üzerine bir noktadan sonra etkisi azalmakta olduğu ve neredeyse sabitlendiği belirtilmiştir (Yan ve ark., 2013; Ananthi ve ark., 2021).

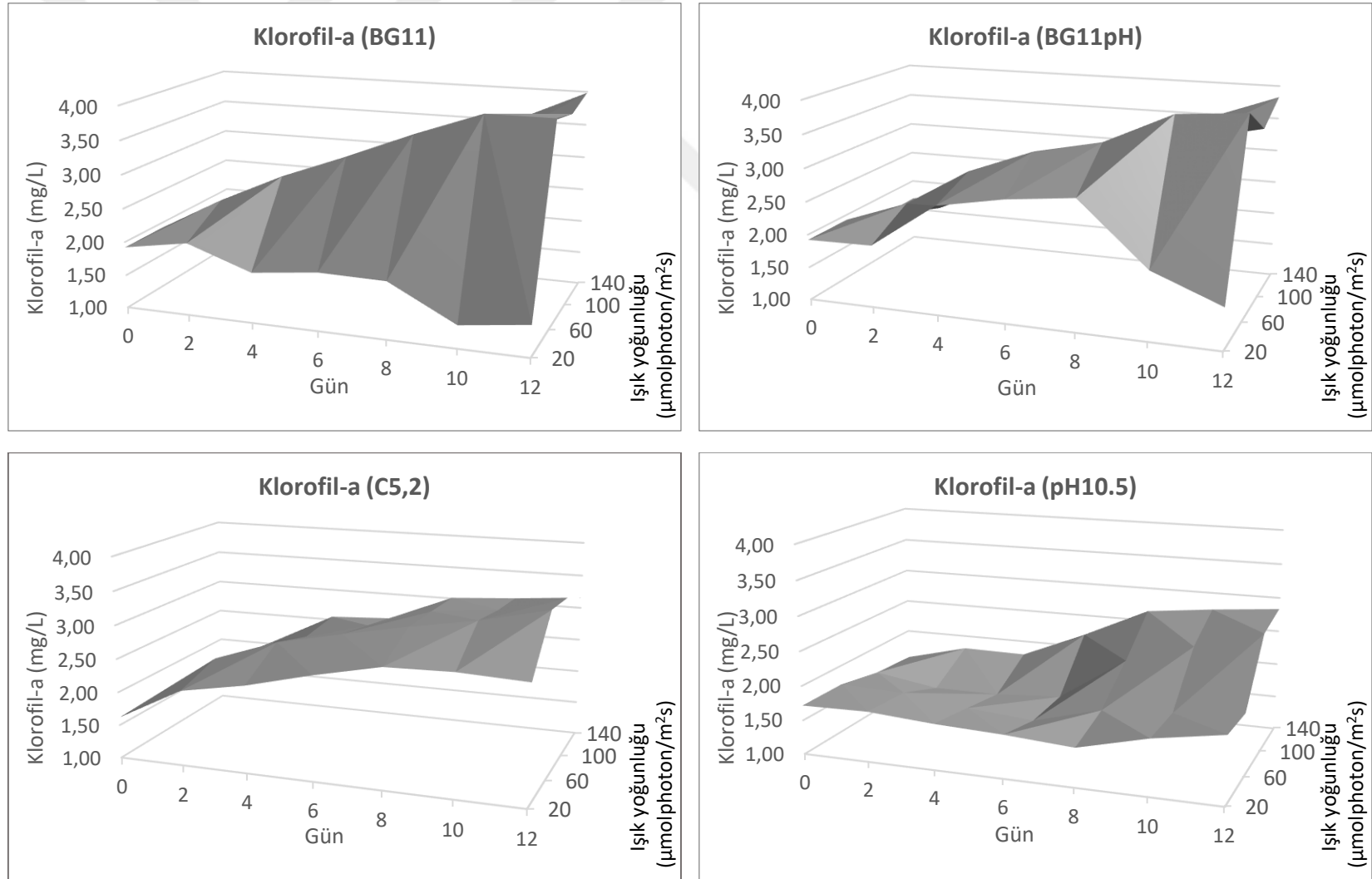
Klorofil-a miktarının zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı olarak ölçümü numunelerdeki mikroalg gelişiminin takibi için önemli bir parametredir. 12 gün boyunca 4 farklı ışık yoğunluğunda ölçülen klorofil-a miktarları Şekil 4.17.'te gösterilmiştir. En yüksek klorofil-a miktarı kontrol numunesi olan BG11 ile elde edilmiştir. 12 gün sonunda klorofil-a miktarı BG11 ve BG11 pH için sırasıyla 4,40 ve 4,19 mg/L olarak ölçülmüştür. BG11pH ve C5,2 numunelerindeki klorofil-a miktarlarındaki artış ve azalışlar pH şoklamanın etkisi ve alg adaptasyonunu işaret etmektedir. Atıksu içeren numunelerde ise 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de C5,2 için en yüksek klorofil-a 3,32 mg/L; pH 10,5 için ise 2,83 mg/L olarak ölçülmüştür. 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de tüm numunelerde mikroalg ölümüne bağlı klorofil-a miktarları azalmıştır ve gerçekleştirilen bu deney şartlarında mikroalg gelişimi için yetersiz kalmıştır.

Klorofil-a miktarı canlı ve sağlıklı alg hücrelerini temsil etmektedir. Bu sebeple toplam biyokütle miktarından farklı ve az miktarda artış gösterdiği sonuçların kıyaslanması ile anlaşılmaktadır. Işık yoğunluğunun artması mikroalg hücrelerinde klorofil-a sentezini önemli ölçüde artırmaktadır (Gim ve ark., 2016). Işık yoğunluğunun etkisinin incelendiği bir çalışmada yüksek ışık yoğunluklarında klorofilin bozulmaya başladığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada *Chlorella sp.* için sürekli ışıktaki orta yoğunlukta ışığın ($200 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$) biyokütle artışı için en iyisi olduğu belirtilmiştir (He ve ark., 2015).





Şekil 4.16. Zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı biyokütle değişim grafikleri (BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için)



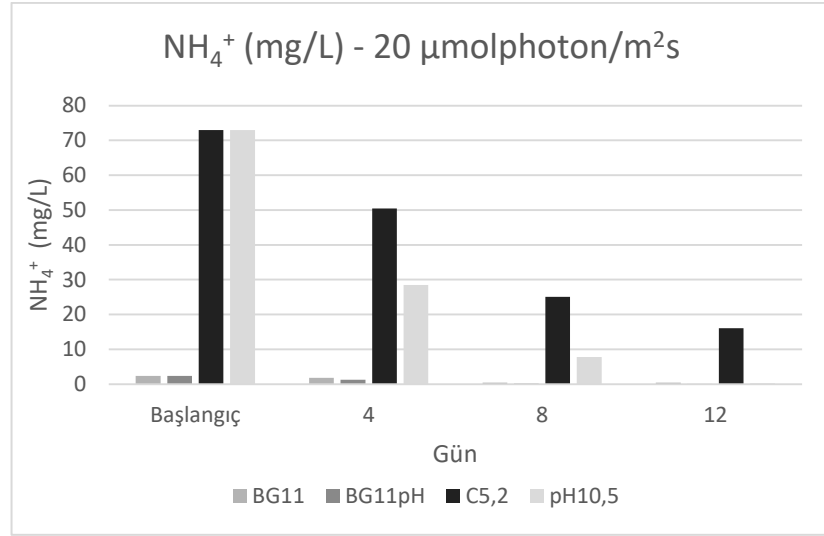
Şekil 4.17. Zamana ve ışık yoğunluğuna bağlı klorofil-a değişim grafikleri (BG11, BG11pH, C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için)

4.3.2. Işık yoğunluğunu çalışmalarının nütrient giderimine etkisi

Işık yoğunluğunun değişiminin atıksu arıtımına olan etkisinin takibi için yürütülen biyokütle artışının etkisinin izlendiği deney setleri ile eş zamanlı olarak ışık yoğunluğunun nutrient giderimine etkisi de incelenmiştir. Başlangıçta eklenen BG11 ve atıksu numuneleri dışında herhangi bir besin ilavesi yapılmamıştır. Mikroalg gelişiminin besin eksikliğine bağlı olarak gelişiminin etkilenmesini azaltmak amacıyla 12 gün ile sınırlandırılmıştır. Aynı zamanda fazla ışık yoğunluğunun kültür ortamı üzerinde olacak olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla da en yüksek ışık yoğunluğu 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ olarak belirlenmiştir.

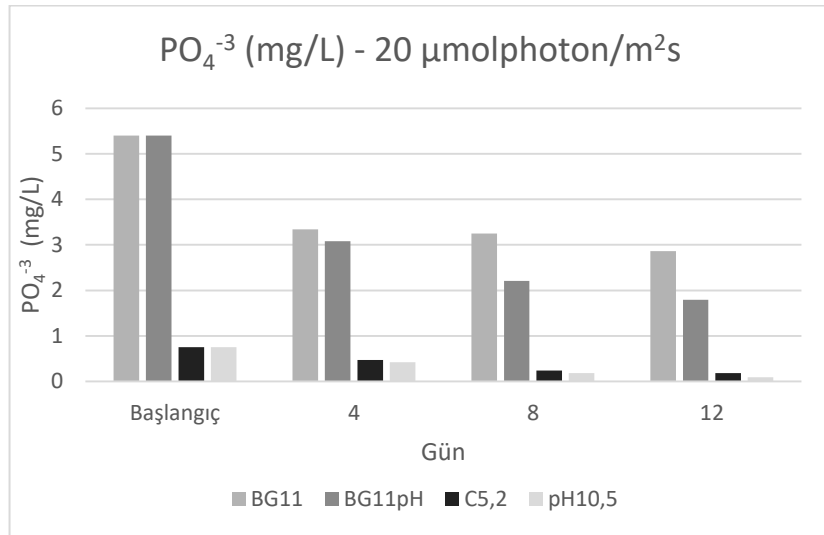
4.3.2.1. 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

Kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda bulunan amonyumun besin ortamı içerisinde Mikroalgler tarafından kullanımı zamana bağlı olarak takip edilmiştir. BG11 besin ortamı içerisinde az miktarda bulunan NH_4^+ mikroalgler tarafından kısa sürede tüketilmiş ve azot ihtiyacını BG11 içerisinde bulunan NaNO_3 formu ile karşılamıştır. Atıksulu numunelerde ise NH_4^+ içeriği C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda azalmıştır. Şekil 4.18.'te gösterildiği üzere, 12. gün sonunda atıksulu kültür ortamlarından C5,2 numunesi 16,1 mg/L NH_4^+ içerirken, pH 10,5 numunesinde neredeyse NH_4^+ 'ün tamamı tüketilmiştir. Başlangıç NH_4^+ miktarları BG11 ve BG11pH'ta 2,4 mg/L; C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde 73 mg/L olarak ölçülmüştür. Bu çalışmanın asıl amacı kanatlı hayvan kesimhanesi biyolojik arıtma suyunda mikroalg kültürü geliştirilmesi olduğu ve mevcut şartlarda mikroalglerin kullandığı nütrientler ile NH_4^+ ve PO_4^{3-} açısından ileri arıtım sağlandığı için mevcut şartların nutrient giderimleri incelenmiştir.



Şekil 4.18. Zamana bağlı NH₄⁺ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 20 μ molphoton/m²s

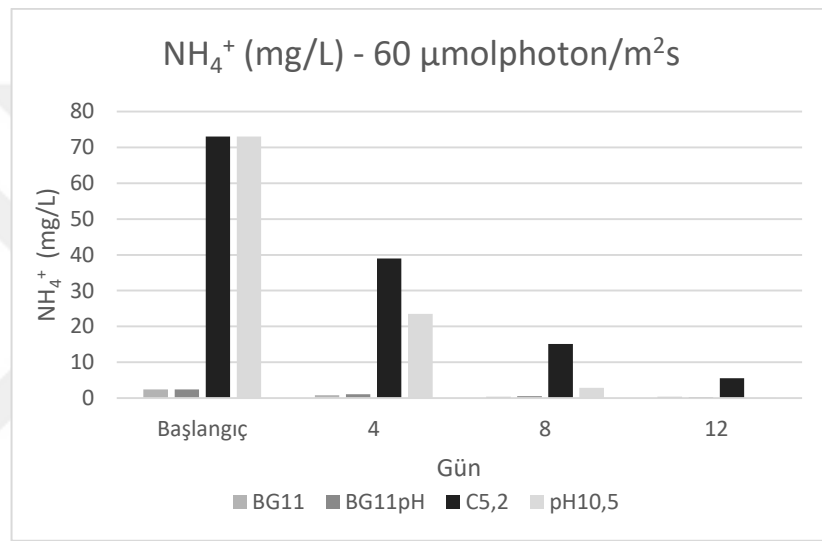
Başlangıçta BG11’li besin ortamında atıksudan fazla miktarda PO₄⁻³ bulunmaktadır. Mikroalg gelişimi ile birlikte tüm numunelerdeki PO₄⁻³ miktarları azalmıştır (Şekil 4.19.). Ancak mikroalglerin fosforlu bileşiklere azotlu bileşiklere nazaran daha az ihtiyaç duymaları sebebiyle (Chisti, 2008), daha az PO₄⁻³ kullanmışlardır. 20 μ mol photon/m²s ışık yoğunluğunda başlangıçta 0,75 mg/L olarak ölçülen C5,2 numunesinin PO₄⁻³ değeri 12. gün sonunda 0,18 mg/L’ye düşmüştür. pH 10,5’ta da benzer şekilde 0,09 mg/L’ye düşmüştür.



Şekil 4.19. Zamana bağlı PO₄⁻³ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 20 μ molphoton/m²s

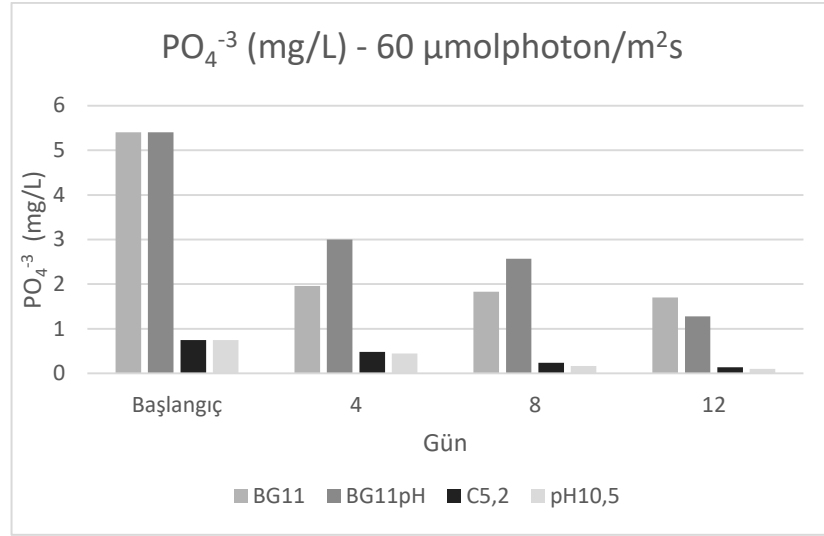
4.3.2.2. 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda, başlangıç NH_4^+ miktarları BG11 ve BG11pH'ta 2,4 mg/L; C5,2 ve pH10,5 numunelerinde 73 mg/L olarak ölçülmüştür. Şekil 4.20.'de gösterildiği üzere, 12. Gün sonunda atıksulu kültür ortamlarından C5,2 numunesi 5,55 mg/L NH_4^+ içerirken, pH 10,5 numunesinde neredeyse NH_4^+ 'ün tamamı tüketilmiştir. Işık yoğunluğunun 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'den 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'ye çıkartılması ile NH_4^+ giderimi de artmıştır.



Şekil 4.20. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

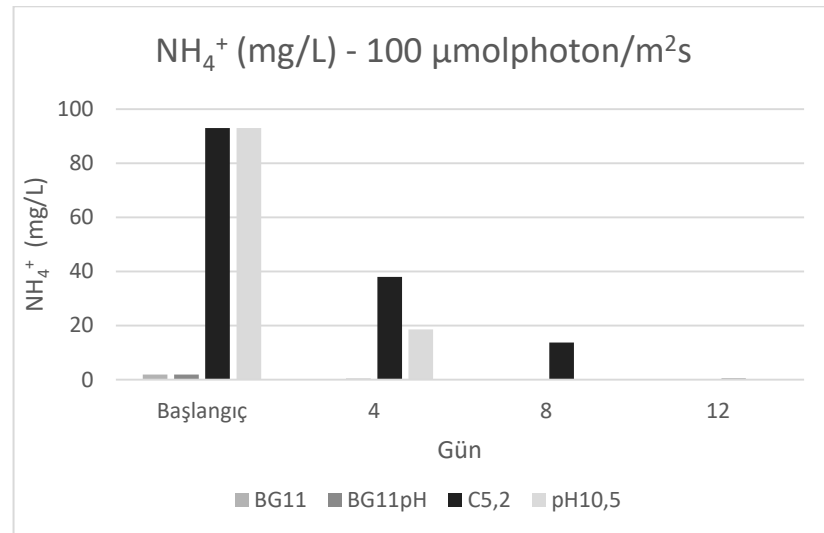
60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda başlangıçta 0,75 mg/L olarak ölçülen C5,2 numunesinin PO_4^{3-} değeri 12. gün sonunda 0,14 mg/L'ye düşmüştür (Şekil 4.21.). pH 10,5'ta da ölçülen PO_4^{3-} miktarı 0,1 mg/L'ye düşmüştür. BG11 ve BG11pH numunelerinde de aynı şekilde PO_4^{3-} miktarları azalmıştır. Işık yoğunluğunun 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'den 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'ye çıkartılması ile tüm numunelerde PO_4^{3-} giderimlerini arttırmıştır.



Şekil 4.21. Zamana bağlı PO₄³⁻ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 60 μ molphoton/m²s

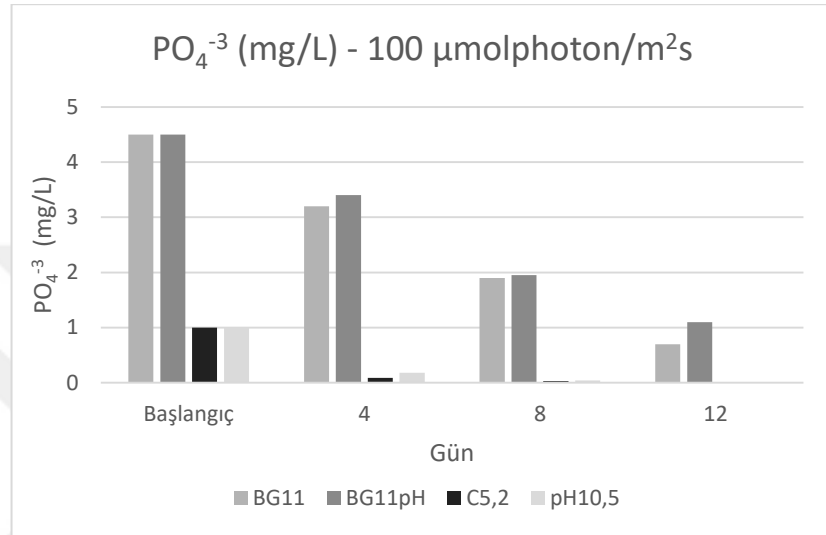
4.3.2.3. 100 μ molphoton/m²s

100 μ mol photon/m²s ışık yoğunluğunda, başlangıç NH₄⁺ miktarları C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde 93 mg/L olarak ölçülmüştür. Şekil 4.22.'te gösterildiği üzere, 12. gün sonunda C5,2 numunesinde, 8. Gün sonunda ise pH10.5 numunelerinde NH₄⁺ tamamıyla tükenmiştir. Işık yoğunluğunun 60 μ mol photon/m²s'den 100 μ mol photon/m²s'ye çıkartılması ile NH₄⁺ giderimi de artmıştır.



Şekil 4.22. Zamana bağlı NH₄⁺ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 μ molphoton/m²s

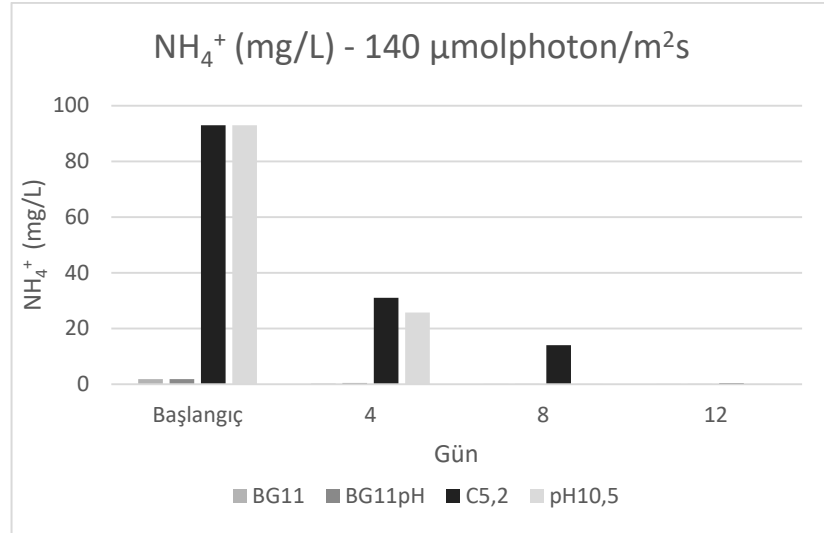
100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda PO_4^{-3} miktarları C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için başlangıçta 1 mg/L olarak ölçülmüştür. Şekil 4.23.'te gösterildiği üzere, 12. gün sonunda C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde PO_4^{-3} tamamıyla tükenmiştir. Bu durum ışık yoğunluğunun 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'den 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'ye çıkartılması ile tüm numunelerde PO_4^{-3} giderimleri arttığını göstermektedir.



Şekil 4.23. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

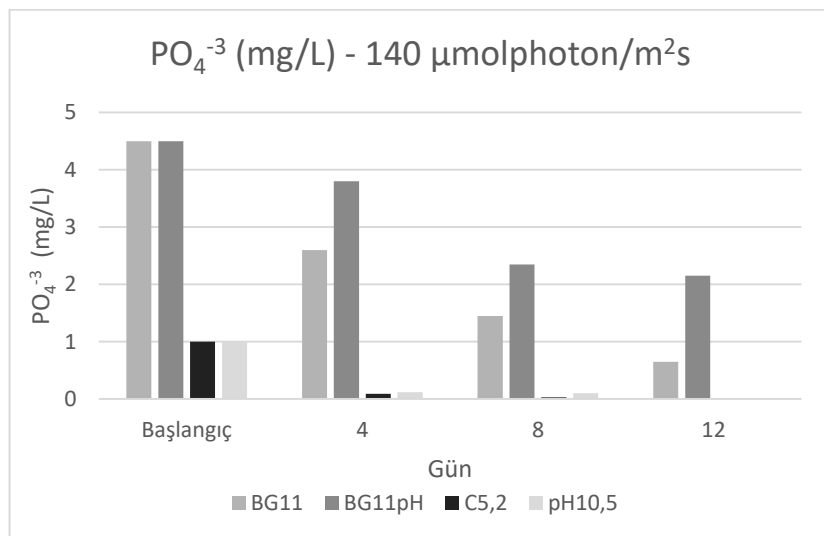
4.3.2.4. 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda, başlangıç NH_4^+ miktarları C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde 93 mg/L olarak ölçülmüştür. Şekil 4.24.'te gösterildiği üzere; 12. gün sonunda C5,2 numunesinde, 8. Gün sonunda ise pH 10,5 numunelerinde NH_4^+ tamamıyla tükenmiştir. 8. gün C5,2 numunesinin NH_4^+ miktarı incelendiğinde ve 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ile kıyaslandığında hemen hemen aynı konsantrasyonda oldukları tespit edilmiştir. Işık yoğunluğunun 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'den 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'ye çıkartılması ile NH_4^+ giderimi değişiklik göstermemiştir. Bu durum ışık yoğunluğu artışının mikroalg gelişimi üzerine bir noktadan sonra sabit etkisi olduğunu göstermektedir (Ogbonna ve Tanaka, 2000).



Şekil 4.24. Zamana bağlı NH_4^+ konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: $140 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

$140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda PO_4^{-3} miktarları C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için başlangıçta 1 mg/L olarak ölçülmüştür. Şekil 4.25.'te gösterildiği üzere, 8. gün sonunda C5,2 numunesinde ve 12. gün sonunda pH 10,5 numunesinde PO_4^{-3} tamamıyla tükenmiştir. $100 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'deki 8. gün C5,2 numunesinin PO_4^{-3} miktarı ise $0,03 \text{ mg/L}$ olarak ölçülmüştür. Bu durumda ışık yoğunlunun $100 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'den $140 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'ye çıkartılması ile PO_4^{-3} giderimi üzerinde fazla değişiklik göstermediği ancak az miktarda da olsa PO_4^{-3} giderimini arttırmış olduğu gözlemlenmiştir.

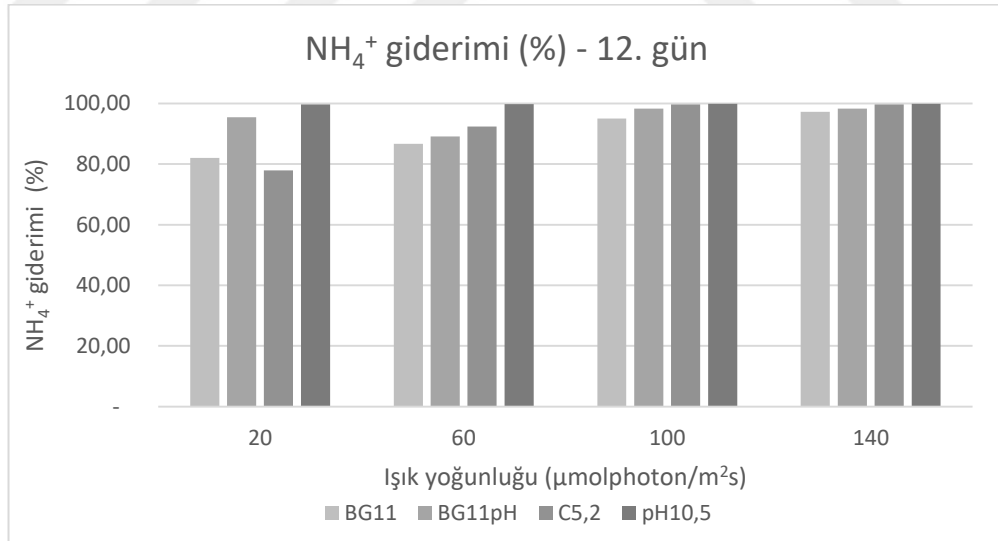


Şekil 4.25. Zamana bağlı PO_4^{-3} konsantrasyonlarının değişimi. Işık yoğunluğu: $140 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Işık yoğunluğu artışının mikroalg gelişimi ve aynı şekilde nutrient giderimi üzerine belli bir ışık yoğunluğundan sonra sabit fazda devam ettiğini göstermektedir (Bazdar ve ark., 2018). Daha yüksek ışık yoğunluklarında ise “fazla ışık yoğunluğunun mikroalg gelişimini inhibe etme özelliği” ile NH_4^+ ve PO_4^{3-} giderimleri olumsuz etkilenmesi beklenmektedir (Ogbonna ve Tanaka, 2000).

4.3.2.5. Işık yoğunluğunun nütrient giderimine etkisi

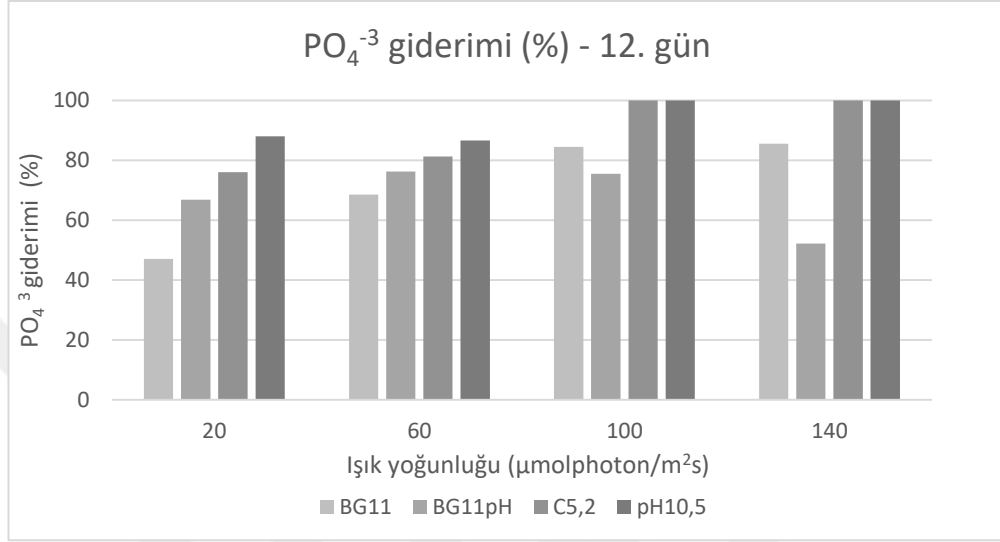
Tüm ışık yoğunluklarında 12. gün sonundaki NH_4^+ ve PO_4^{3-} giderimleri incelenmiştir. Alg gelişimin sınırlı olduğu ve çalışılan en düşük ışık yoğunluğuna sahip 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de en düşük NH_4^+ giderimine sahiptir. Ancak bu duruma rağmen atıksu içeren numunelerde %77,95 oranında C5,2 numunesinde NH_4^+ giderimi sağlanmıştır (Şekil 4.26.). pH 10,5 numunesinde tüm ışık yoğunluklarında NH_4^+ gideriminin yüksek olmasının sebebi, yüksek pH etkisi ile NH_4^+ 'ün NH_3 'e dönüşmesidir. Karıştırma hızının da etkisi ile NH_3 havaya karışarak ortamdaki uzaklaşmıştır.



Şekil 4.26. Işık yoğunluğuna bağlı NH_4^+ giderimi (%)

100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğuna kadar ışık yoğunluğunun artması ile birlikte NH_4^+ giderimi de artış göstermiştir. 100 ve 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de ise giderimi miktarları oldukça yüksek olduğundan sabitlenme eğiliminde olmuştur. Bir diğer

sebebi de mikroalg gelişiminin 100 ve 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de benzer ve yüksek konsantrasyonlarda olmasıdır. C5,2 ve pH 10,5 numunelerinin PO_4^{-3} giderimi ışık yoğunluğunun artmasıyla birlikte artmıştır. 100 ve 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de C5,2 ve pH 10,5 numuneleri için %100 PO_4^{-3} giderimine ulaşılmıştır (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. Işık yoğunluğuna bağlı PO_4^{-3} giderimi (%)

PO_4^{-3} giderimleri, mikroalglerin fosforlu bileşiklere olan ihtiyacının azotlu bileşiklere oranla 1/16 az olması sebebiyle NH_4^+ giderimlerine göre az olmuştur. Aynı zamanda kullanılan atıksuyun içerdiği PO_4^{-3} konsantrasyonun düşük olması sebebiyle de PO_4^{-3} giderimi oranının yüksek olmasının bir diğer sebebidir. Özellikle C5,2 numunesinin PO_4^{-3} giderimi ışık yoğunluğunun artmasıyla birlikte artmıştır. 100 ve 140 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de %100 PO_4^{-3} giderimine ulaşılmıştır.

Işık yoğunluğu arttıkça nütrient giderimlerinin artmış, atıksu içeren numunelerde en düşük ışık yoğunluğunda bile yüzde 70'den fazla nutrient giderimi elde edilmiştir. Bu sebeple biyodizel üretimi için atıksuda *Chlorella vulgaris* kültürünün yetiştirilmesinin yanısıra nutrient giderimini artırmak amacı ile düşük ışık yoğunluklarında yüksek verim elde edilmiştir. Düşük ışık yoğunluğunda 14 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ gerçekleştirilen bir çalışmada, anaerobik atıksu arıtma ikincil çıkış suyu ile *Chlorella vulgaris* kültürünün geliştirildiği 8 gün sonunda amonyum %93,5, fosfat ise %11,1 oranında giderilmiştir (Cheng ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise yine *Chlorella vulgaris* ile arıtılmış

evsel atık sudan 3500 lux ($\approx 50 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$) ışık yoğunluğunda 14 günlük kültür süresinden sonra %79,63'lük nitrat ve %100'lük fosfat giderilmiştir (Sydney ve ark., 2011). Farklı tür mikroalgler ile atıksuda ışık yoğunluğunun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ışık yoğunluğu arttıkça *Chlorella vulgaris* için toplam azot gideriminin azaldığı, toplam fosfor gideriminin ise arttığı bulunmuştur. 8 gün sonunda toplam azot ve toplam fosfor tüm mikroalg türleri ile %75 oranında giderildiği hesaplanmıştır (Nzayisenga ve ark., 2020). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; nütrient giderim oranları mikroalg gelişimi ile ilgili olmakla birlikte başlangıç konsantrasyonu, kültür süresi, mikroalg türü ile değiştiği anlaşılmaktadır. Ayrıca ışık yoğunluğu arttıkça mikroalg gelişiminin bir noktaya kadar arttığı ve çok yüksek ışık yoğunluğunun mikroalg gelişimi ve nütrient giderimi için inhibe edici olacağı kanıtlanmıştır (Ogbonna ve Tanaka, 2000).

4.3.3. Işık yoğunluğunun toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi

Chlorella vulgaris'in gelişebilmesi için fotosententez sırasında ihtiyaç duyduğu en önemli parametrelerden biri ışıktır. Ancak mikroalg biyokütlesinin lipit içeriği ve yağ aside metil ester kompozisyonu için önemli olan ışığın dalga boyu ve ışık yoğunluğudur (Ananthi ve ark., 2021). Tablo 4.4., ışık yoğunluğu arttıkça tüm numuneler için toplam lipit üretiminin arttığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre lipit üretimi açısından pH 10,5 yönteminin kullanılmasının uygun olmadığı açıktır. pH şoklama yöntemi ile geliştirilen atıksulu C5,2 numunesi BG11 kontrol numunesi ile kıyaslandığında lipit üretimi açısından yakın sonuçlar elde edilmiştir. pH şoklamanın mikroalg gelişimi üzerindeki etkisi ise BG11pH numunesi ile kontrol numunesinin kıyaslanması ile ortaya çıkmaktadır. BG11pH numunesi için elde edilen toplam lipit oranları kontrol numunesi ile kıyaslanması sonucunda düşük ışık yoğunluklarında %1-3 oranda daha az, yüksek ışık yoğunluklarında ise %1'den az olmak üzere daha fazla lipit oluşturmuştur. Toplam lipit için C5,2 numunesi 0,1142 gr olarak en yüksek miktarı $140 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ için ölçülmüştür. En düşük lipit miktarı ise $20 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$ için 0,0886 olarak ölçülmüştür. Işık yoğunluğunun artışı ile birlikte elde edilen kuru biyokütlenin lipit oranları da artış göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; ışık yoğunluğunun artmasıyla mikroalg biyokütlesi

artarken, lipit üretimi çoğunlukla mikroalg türlerine ve diğer çevresel koşullara bağlı olarak artmış (Seo ve ark., 2017; Nzayisenga ve ark., 2020), bazı çalışmalarda azalmış (Cheirsilp ve Torpee, 2012; George ve ark., 2014) ve bazı çalışmalarda ise ışık yoğunluğundan etkilenmemiştir (Pancha ve ark., 2015).

Tablo 4.4. Işık yoğunluğuna bağlı toplam mikroalgde gelişen toplam lipit (g) ve FAME oranları (%)

Işık yoğunluğu ($\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$)	Toplam lipit (gr)	Lipit oranı (%)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
20	BG11	0,078	11,986	0,032				
	BG11pH	0,072	12,966	0,022				
	C5,2	0,089	16,407	0,120	0,010	0,010	0,049	
	pH10,5	0,056	13,455	0,045			0,012	
60	BG11	0,105	13,690	0,227	0,009	0,012	0,007	0,019
	BG11pH	0,111	16,609	0,272	0,030	0,060	0,075	
	C5,2	0,103	15,785	0,208	0,021	0,043	0,070	
	pH10,5	0,056	12,790	0,047			0,010	
100	BG11	0,087	17,283	0,211		0,047	0,076	0,034
	BG11pH	0,107	16,612	0,152		0,026	0,052	0,019
	C5,2	0,109	19,517	0,184		0,033	0,074	0,023
	pH10,5	0,079	18,769	0,067		0,025	0,021	
140	BG11	0,121	18,311	0,147		0,034	0,050	0,009
	BG11pH	0,119	17,633	0,162		0,042	0,074	0,019
	C5,2	0,114	20,429	0,158		0,030	0,064	0,017
	pH10,5	0,052	9,756	0,013				

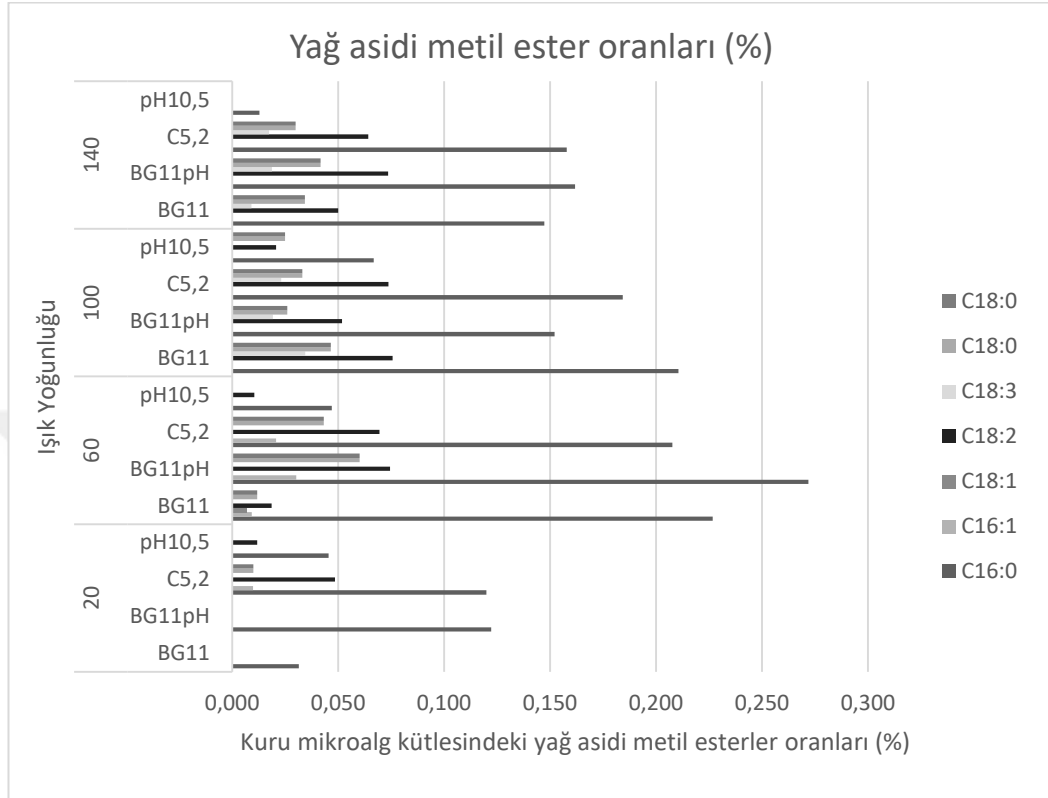
C5,2 numunesinde kuru biyokütlerdeki lipit oranları incelendiğinde, özellikle 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında, sırasıyla kuru biyokütlenin %19,5 ve %20,5 toplam lipit olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu lipit oranları BG11'den az da olsa bir miktar daha yüksektir. Farklı mikroalg türleri ile kesimhane atıksuyunda geliştirilen biyokütlerde en yüksek %14,8 lipit içeriği elde edilmiştir (Hernández ve ark., 2016). pH 10,5 numunesi her ışık yoğunluğunda en düşük lipit oranının elde edildiği numune olmuştur.

Işık yoğunluğunun çok yüksek olması lipit içeriğinin azalmasına sebep olmaktadır. He ve ark. (2015) tarafından yapılan ışık yoğunluğunun etkisinin incelendiği bir çalışmada, yüksek ışık yoğunluklarında klorofilin bozulmaya başladığı ancak biyokütlenin içerdiği lipit oranının arttığı belirtilmiştir. Bir çalışmada fotobiyoreaktör

üzerinden verilen bir örnekte $150 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'den yüksek ışık yoğunluklarında mikroalg türüne de bağlı olarak ışığın mikroalg gelişimini engellediği açıklanmıştır (Ogbonna ve Tanaka, 2000). Bu sebeple çok yüksek ışık yoğunluklarında istenilen verimde mikroalg gelişiminin elde edilmesi mümkün olmamaktadır. Düşük ışık yoğunluğu ise lipid birikimi için daha uygundur bunun sebebi yüksek ışık yoğunluğunda mikroalgin lipid artırmadan ziyade çoğalma eğiliminde olmasıdır (Cheirsilp ve Torpee, 2012). Bu sebeple lipid üretimi için optimum ışık yoğunluğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Yağ asidi metil esterlerinde $140 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de ışık yoğunluğunda $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'ye oranla görülen azalma ve yüksek ışık yoğunluğunun inhibe edici özelliği sebebiyle bu çalışmada $140 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğundan daha yüksek ışık yoğunluklarında çalışılmamıştır. pH şoklama yöntemi ile geliştirilmiş atıksu içeren C5,2 numunesi ve BG11 kontrol numunesi kıyaslandığında elde edilen toplam lipid miktarları ve kuru biyokütledeki lipid oranları her ışık yoğunluğu için C5,2 numunesinde daha yüksektir. Bunun sebebi pH şoklama ile *Chlorella vulgaris*'in stres altında lipid oranını artırması ile açıklanabilir. Aynı şekilde kullanılan atıksuyun kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyu olması, azotlu ve fosforlu besin içeriğinin BG11'e kıyasla farklı olması sebebiyle toplam lipid miktarının yüksek olması yönünde açıklanabilir (Chinnasamy ve ark., 2010; Cho ve ark., 2011).

Lipid transesterifikasyonu sonucu elde edilen FAME'leri palmitik asit (C16:0) ve stearik asit (C18:0) doymuş yağ asitleri başta olmak üzere; doymamış yağ asitlerinden palmitoleik asit (C16:1), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik asiti (C18:3) içermektedir (Şekil 4.28.). Işık yoğunluğunun artması sonucunda yağ asidi metil esterlerinin kompozisyonunda ve konsantrasyonlarında farklılıklar oluşmuştur. $20 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de mikroalg gelişimi, klorofil-a pigment analizi ve biyokütle ölçüm sonuçları ile paralel olarak elde edilen toplam lipid miktarı da düşük çıkmıştır. Aynı şekilde yağ aside metil esterlerinin konsantrasyonu ve tespit edilen FAME türleri de diğer ışık yoğunluğunda elde edilen konsantrasyonlar ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Bu sebeple çok düşük ışık yoğunluğunun mikroalg gelişimi ve geliştirilen biyokütlenin biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılması açısından bu çalışma için yetersiz bulunmuştur. Sürekli olarak pH'ı 10,5'da tutulan numunenin elde edilen

FAME türleri ve konsantrasyonları açısından pH şoklama yöntemine kıyasla yetersiz sonuç vermiştir.



Şekil 4.28. Işık yoğunluğuna bağlı kuru mikroalg biyokütlesindeki yağ asidi metil esterlerinin oranları (%)

C5,2 numunesinde yağ asidi metil esterlerinin oluşumu incelendiğinde 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de doymuş yağ asitlerinde (C16:0 ve C18:0) açısından en yüksek konsantrasyonlar elde edilmiştir ve doymuş yağ asitleri toplam yağ asitlerinin %73,39'unu oluşturmaktadır. En yüksek ışık yoğunluğu olan 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de ise C5,2 numunesi, kontrol numunesinden daha fazla lipit oranına sahiptir. 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ 'de doymuş yağ asitlerinden C16:0 ve C18:0, doymamış yağ asitlerinden ise C18:2 ve C18:3 oluşmuştur. Mikroalg biyokütlesinden elde edilen yağ asidi metil ester içeriği, mikroalglerin biyodizel üretimi için uygunluğunu değerlendirmek için önemli bir parametredir. C16 ve C18 yağ asidi metil esterlerinin varlığı, kaliteli biyodizelin bir göstergesidir (Gao ve ark., 2019). Mikroalglerden elde edilen C18 yağ asitleri; esas olarak doymamış formda bulunmaktadır (C18:1, C18:2 ve C18:3) (Deshmukh ve ark., 2019). Bu çalışmada elde edilen C16-C18 doymuş ve

doymamış yağ asitleri literatürde mikroalglerden elde edilen yağ asitleri ile örtüşmektedir.

Elde edilen yağ asitlerinin biyodizel eldesi için uygunluğu Avrupa standartlar komitesi biyodizel kalitesi standartı (EN 14214) ile değerlendirilmiştir. EN 14214’de belirtildiği üzere asıl sınırlayıcı faktör C18:2 yağ asidinin toplam yağ asitlerine oranı olarak kabul edilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017). Yağ asitleri içerisinde %12 oranını geçmemesi gereken C18:3 linolenik asit; C5,2 numunesinde tüm ışık yoğunluklarında bu oranın altında kalmıştır (Tablo 4.5.). 20 ve 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında C5,2 numunesinde linolenic asit (C18:3) oluşmazken, 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında sırasıyla %7,325 ve %6,320 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.5. C5,2 numunesinin farklı ışık yoğunluğunda içerdiği SFA, MUFA ve PUFA oranları (%)

FAME	Işık Yoğunluğu ($\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$)			
	20	60	100	140
C16:0	0,12	0,208	0,184	0,158
C16:1	0,01	0,021		
C18:0	0,01	0,043	0,033	0,03
C18:2	0,049	0,07	0,074	0,064
C18:3			0,023	0,017
Toplam	0,189	0,342	0,314	0,269
%SFA	68,783	73,392	69,108	69,888
%MUFA	0,015	0,029	0	0
%PUFA	25,926	20,468	30,892	30,112
% C18:3	0	0	7,325	6,320

Elde edilen biyodizelin; yanma, oksidatif stabilite, viskozite gibi özelliklerinin uygun dengesinin kurulabilmesi için yalnızca doymuş ya da yalnızca doymamış yağ asilerinden oluşmaları istenmemektedir. İdeal olarak kaliteli bir biyodizel, uzun zincirli doymuş yağ asitleri (SFA), kısa zincirli tekli (MUFA) ve çoklu (PUFA) doymamış yağ asitlerinin karışımından oluşması beklenmektedir (Chisti, 2007; Komolafe ve ark., 2014; Mohd-Sahib ve ark., 2017). Bu durumda elde edilen biyodizelin yakıt olarak kullanılmasının önünde Avrupa standartları açısından bir

sakıncası bulunmamaktadır. Literatürdeki diğer benzer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir.

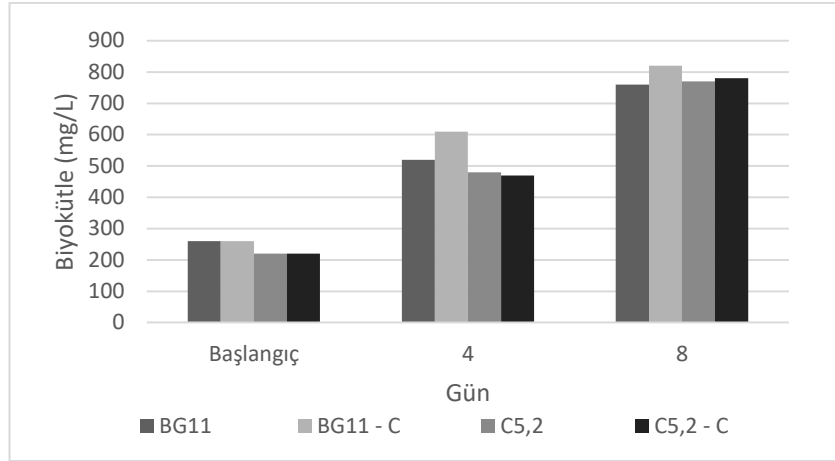
Tablo 4.5.'te verildiği üzere kanatlı hayvan kesimhanesinin biyolojik olarak arıtılmış suyunda yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'ten elde edilen biyodizel, kaliteli bir biyodizel için gerekli şartları sağlamaktadır. Tüm ışık yoğunluklarında C5,2 numunesinden biyodizel üretimi için uygun lipid oranı ve FAME içeriği elde edilmiştir. Kuru biyokütlenin lipid oranı, yağ asidi metil ester miktarları ve türleri açısından C5,2 numunesindeki mikroalg gelişimi için 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda en uygun sonuçlara ulaşılmıştır.

4.4. CO₂ İlavesinin Mikroalg Gelişimine Etkisinin İncelenmesi

Belirlenen optimum pH şoklama şartları ve optimum ışık yoğunluğunda kültür ortamına yapılan karbondioksit ilavesi çalışmalarında biyokütle artışına ve lipid oluşumuna CO₂ etkisi araştırılmıştır. BG11, BG11-C, C5,2, C5,2-C numunelerinden; BG11-C ve C5,2-C'ye karbondioksit ilavesi yapılmıştır. BG11 ve C5,2 numuneleri ise kontrol numuneleri olarak aynı şartlarda CO₂ ilave edilmeden yetiştirilmiştir. Oluşan biyokütle, klorofil-a, lipid miktarları ölçülmüştür. Aynı zamanda tüm numunelerde amonyum ve fosfat giderimi ölçülmüştür.

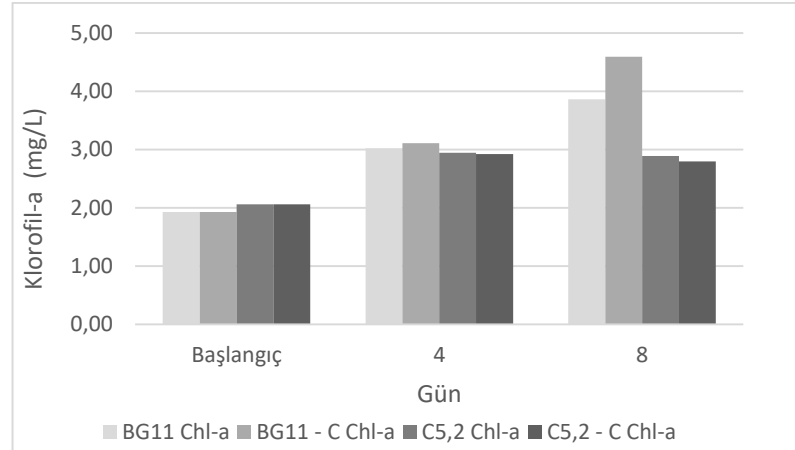
4.4.1. CO₂ ilavesinin biyokütle artışına etkisi

Deney başlangıcında, 4. gün ve 8. günde alınan numunelere biyokütle ve klorofil-a tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 8. gün sonunda CO₂ ilave edilen BG11-C numunesinde 820 mg/L biyokütle oluşurken, BG11 numunesinde ise 760 mg/L biyokütle artış oluşmuştur (Şekil 4.29.). C5,2 ve C5,2-C numunelerinde de benzer şekilde sırasıyla 770 ve 780 mg/L biyokütle oluşmuştur. Bu durum CO₂ ilavesinin BG11 üzerinde az da olsa artış yönünde bir etkisinin olduğunu, ancak C5,2 numunesinde olumlu ya da olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.29. CO₂ ilavesinin biyokütle miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

8. gün sonunda CO₂ ilave edilen BG11-C numunesinde 4,59 mg/L, BG11 numunesinde ise 3,86 mg/L klorofil-a miktarı ölçülmüştür. C5,2 ve C5,2 C numunelerinde de benzer şekilde sırasıyla 2,79 ve 2,89 mg/L klorofil-a ölçülmüştür (Şekil 4.30.). Klorofil-a miktarı da biyokütle miktarında olduğu gibi, CO₂ ilavesinin BG11 üzerinde az da olsa artış yönünde bir etkisinin olduğunu, ancak C5,2 numunesinde olumlu ya da olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bu durum mikroalg gelişim ortamına CO₂'in az miktarda ilave edilmesi sonucu mikroalg gelişimi için yetersiz gelmesi olarak yorumlanabilir. Ancak saf olarak ilave edilen CO₂ yüksek debilerde eklenmesi gelişim ortamının alg büyümesine uygun olmadığı, pH'ın artmasına sebebiyet vermesiyle sonucu alg ölümlerine neden olmuştur. Bu sebeple literatürdeki çalışmalarda olduğu gibi hava ile karıştırılıp seyreltilerek besin ortamına ilave edilmesi ve elde edilen verimin yükseltmesi beklenmektedir (Singh ve Singh, 2014; Seo ve ark., 2017).



Şekil 4.30. CO₂ ilavesinin klorofil-a miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

Bir çalışmada CO₂ eklenmesinin alg gelişimine etkisi incelemiştir. CO₂ ilave edilen ve edilmeyen besin ortamlarındaki alg gelişimi takip edildiğinde belirgin bir farkın oluşmadığı ifade edilmiştir (Mulbry ve ark., 2008). Başka bir çalışmada ise besin ortamına eklenen CO₂ miktarının biyokütle ve lipit yüzdesine etkisi araştırılmıştır. Gelişim ortamına ilave edilen %3, %5 ve %10 CO₂'in biyokütle üzerine etkisi incelendiğinde; %2 ve %5 CO₂ ilavesinde 1,5 g/L biyokütle ölçülürken, %10 CO₂ ilavesinde 1,4 mg/L biyokütle hesaplanmıştır. Bu durumda seyrelterek ilave edilmiş CO₂'nin mikroalg gelişimine bir etkisinin olmadığı olarak açıklanabilmektedir (Wu ve ark., 2012).

4.4.2. CO₂ ilavesinin nütrient giderimine etkisi

CO₂ ilavesinin nütrient giderimine etkisinin araştırılması için tüm numuneler için amonyum ve fosfat analizleri gerçekleştirilmiştir ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. 8. Gün sonunda Amonyum giderimi BG11 için %88,983, CO₂ ilave edilen BG11-C numunesi için ise %88,136 olarak hesaplanmıştır. Fosfat giderimi ise 8. Gün sonunda BG11 için %42,012, CO₂ ilave edilen BG11-C numunesi için ise %52,071 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerlerde BG11'de CO₂ ilavesi ile amonyum giderimi sabit kalmış, fosfat giderimi ise %10'luk bir artış göstermiştir.

Tablo 4.6. CO₂ ilavesinin amonyum ve fosfat giderimi oranlarına etkisi (%). Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

	BG11	BG11 - C	C5,2	C5,2 - C
Amonyum giderim (%)	88,98	88,14	84,06	85,89
Fosfat giderim (%)	42,01	52,07	88,33	86,67

Deney sonunda amonyum giderimi C5,2 numunesi için %84,06, CO₂ ilave edilen C5,2-C numunesi için ise %85,89 olarak hesaplanmıştır. Fosfat giderimi ise C5,2 için %88,33, CO₂ ilave edilen C5,2-C numunesi için ise %86,67 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen giderim değerler incelendiğinde CO₂ ilavesinin ile amonyum ve fosfat giderimlerinin neredeyse etkisi olmamıştır. Besin ortamına yapılan CO₂ ilavesinin nütrient giderimine etkisi incelendiği bir çalışmada CO₂ verilen ve CO₂ verilmeyen numuneler arasında net bir fark elde edilmediği bildirilmiştir (Mulbry ve ark., 2008).

4.4.3. CO₂ ilavesinin toplam lipit ve yağ asidi oluşumuna etkisi

Besin ortamına ilave edilen CO₂'in toplam lipit miktarlarına etkisi incelenmiştir. Tablo 4.7.'de toplam lipit miktarı, *Chlorella vulgaris*'in kuru ağırlığındaki lipit oranı ve yağ aside metil esterlerinin türleri verilmiştir. Toplam lipit ve lipit oranı incelendiğinde BG11 ve atıksu içeren C5,2 numunelerinde CO₂ ilavesinin olumsuz etkisi olmuştur. C5,2 numunesinde yağ asidi metil esterlerin kompozisyonu da aynı şekilde olumsuz etkilenmiştir. Bu durum, bu çalışmada numunelerin sürekli karıştırma ile atmosferden mikroalg gelişim ortamına yeterli CO₂ miktarının sağlandığını ve CO₂ ilavesine gerek olmadığını açıklamaktadır.

Tablo 4.7. CO₂ ilavesi ile mikroalgde gelişen toplam lipit miktarı (gr) ve FAME oranları (%). Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

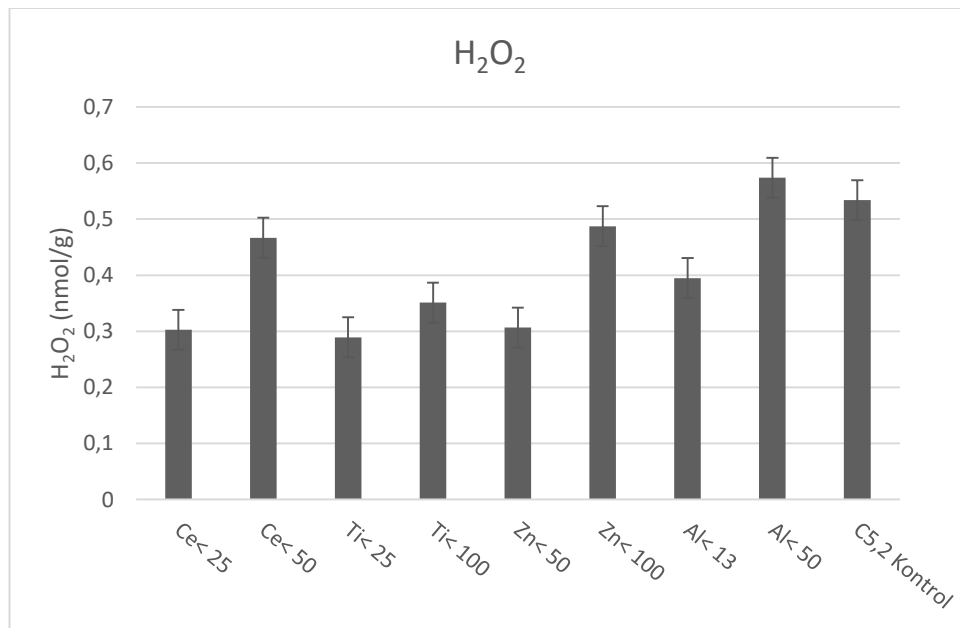
	Toplam lipit (gr)	Lipit/kuru ağırlık (%)	Toplam gelişen mikroalgdeki FAME (%)					
			C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
BG11	0,146	29,595	0,069	0,007	0,111		0,027	0,016
BG11 - C	0,117	20,436	0,224	0,016	0,048	0,016	0,023	0,009
C5,2	0,092	17,032	0,165		0,049		0,021	0,008
C5,2 - C	0,078	14,231	0,128		0,033		0,014	

Literatürde yapılmış bir çalışmada besin ortamına hava ile karıştırılıp eklenen CO₂ miktarının lipid yüzdesine etkisi araştırılmıştır. Gelişim ortamına ilave edilen %3, %5 ve %10 CO₂'in kuru biyokütledeki lipid oranı üzerine etkisi incelendiğinde; %2 CO₂ ilavesinde %18,8, %2 CO₂ ilavesinde %20,9 ve %10 CO₂ ilavesinde %18,7 olarak verilmiştir. Bu durumda seyrelterek ilave edilmiş CO₂'nin mikroalg lipid oranına net bir etkisinin olmadığı açıktır (Wu ve ark., 2012).

4.5. Nanopartikül İlavesinin Mikroalg Enzim Aktivitelerine ve Toplam Lipit Miktarına Etkisinin Belirlenmesi

4.5.1. H₂O₂ miktarları

Oluşan H₂O₂ miktarı kontrol numunesinde ve nanopartikül eklenmiş 8 numune için ölçülmüştür. Besin ortamında bulunan H₂O₂ radikalinin miktarını belirlenmiştir ve Şekil 4.31.'de verilmiştir. Al₂O₃<50 nm partikülü için H₂O₂ miktarı kontrol numunesinden yüksek çıkarken diğer tüm nanopartiküller için daha düşük çıkmıştır. Ancak CeO₂<50 nm ve ZnO<100 nm için de sırasıyla 0,46 ve 0,48 nmol/g H₂O₂ olmak üzere yakın değerler ölçülmüştür.

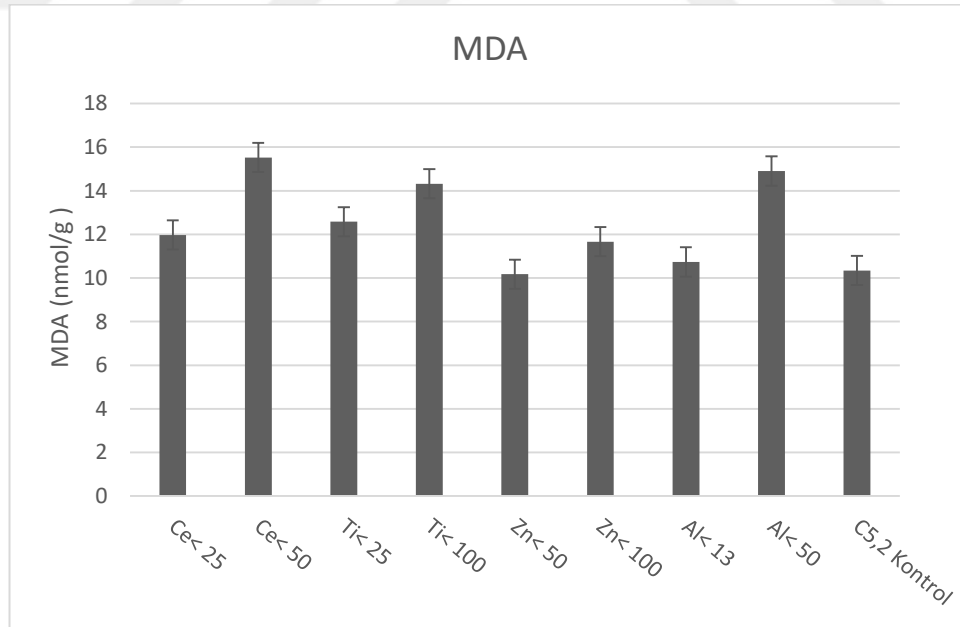


Şekil 4.31. Nanopartikül ilavesinin H₂O₂ miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 μ molphoton/m²s

Oluşan H_2O_2 miktarlarının kontrol numunesine göre düşük olmasının nedeni SOD ve APOD enzimlerinin H_2O_2 üzerinde etkili olması ile açıklanabilmektedir. APOD, askorbat ile hidrojen peroksitin suya indirgemesinde kataliz olarak görev almaktadır. Aynı zamanda oluşan askorbat-peroksidaz reaksiyonu ile dokularda oluşacak yeni H_2O_2 'in önüne geçmektedir SOD enzimi de hidrojen peroksiti (H_2O_2) etkisiz hale getirmektedir (Kaplan ve ark., 2016; Shene ve ark., 2018).

4.5.2. MDA miktarları

MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve hücrelerde oluşan oksidatif hasarın seviyesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Besin ortamında bulunan MDA miktarları belirlenmiştir ve Şekil 4.32.'te verilmiştir. Tüm numunelerde kontrol numunesinden fazla miktarda MDA oluşur. En yüksek MDA oluşumu Ancak $CeO_2 < 50$ nm ve $Al_2O_3 < 50$ nm numunelerinde ölçülmüştür. MDA'nın en yüksek olduğu bu numuneler aynı zamanda en yüksek H_2O_2 radikalinin bulunduğu numunelerdir.



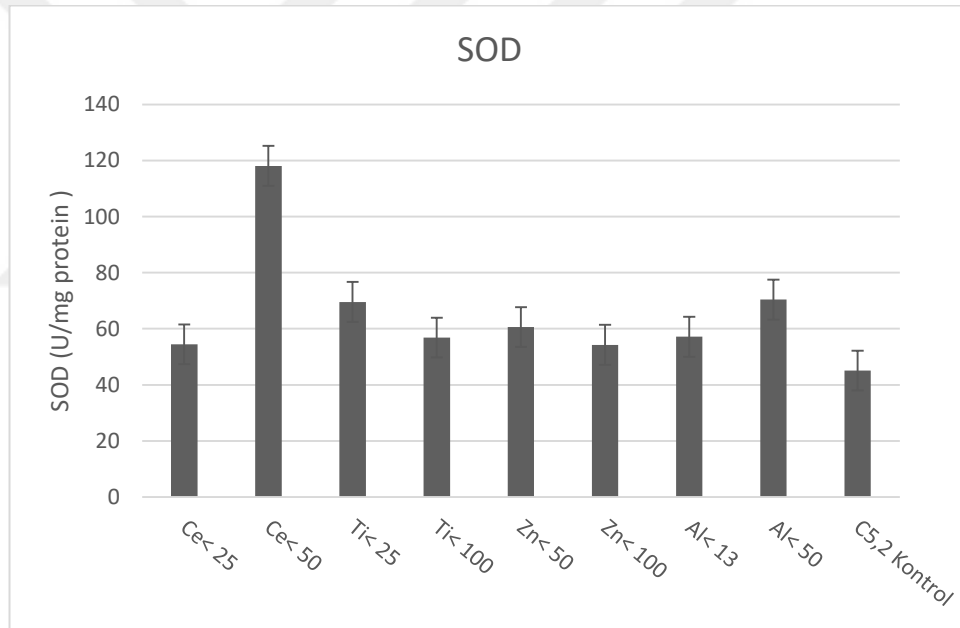
Şekil 4.32. Nanopartikül ilavesinin MDA miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 μ molphoton/m²s

MDA miktarının yüksek olması tüm numunelerdeki hücrelerin lipid yıkımına uğradığını göstermektedir. Savunmatik enzimler olan APOD ve SOD ile etkisiz hale

getirilemeyen reaktif oksijen türleri özellikle hücre membranındaki lipidlere zarar vermektedirler (Özkaleli, 2014).

4.5.3. SOD miktarları

Oluşan SOD miktarları kontrol numunesinde ve nanopartikül eklenmiş 8 numune için ölçülmüştür. Besin ortamında bulunan SOD enzimlerinin miktarları Şekil 4.33.'te verilmiştir. Ölçülen SOD miktarları içerisinde tüm numunelerde kontrol numunesi olan C5,2'ye kıyasla yüksek SOD enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu durum hücrenin lipid yıkım etkisine karşı savunma yaptığını göstermektedir (He ve ark., 2015). En yüksek SOD oluşumu $\text{CeO}_2 < 50 \text{ nm}$ 'de gerçekleşmiştir.

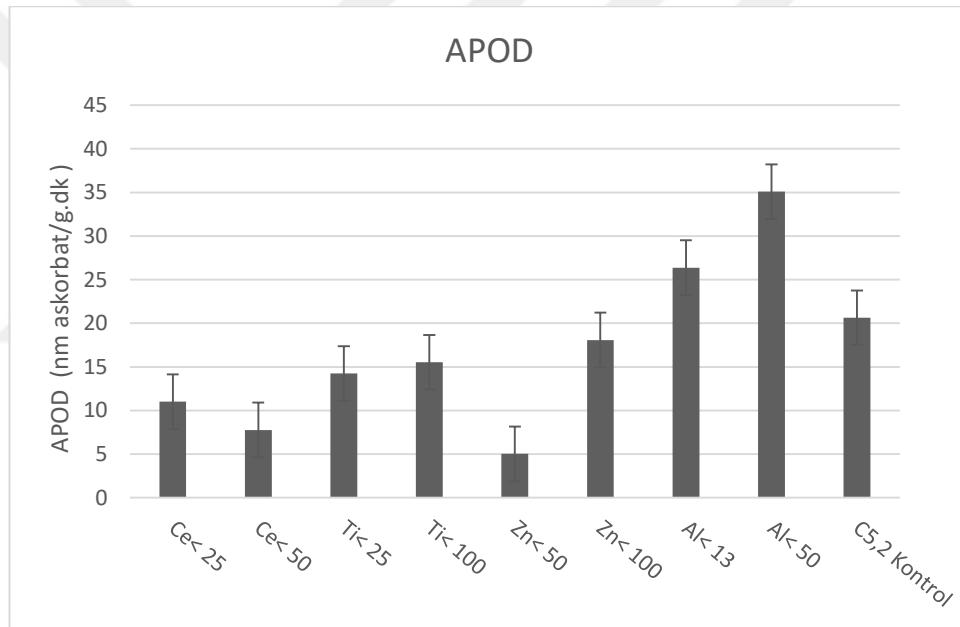


Şekil 4.33. Nanopartikül ilavesinin SOD miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton}/\text{m}^2\text{s}$

SOD aktivitesi özellikle süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) radikalini, etkisiz hale getiren uğratan bir enzimdir. Bu nedenle lipid peroksidasyonuna karşı yapılan enzimatik savunmayı temsil eden SOD ve APOD enzim miktarları birbirinden farklı eğilimde sonuç vermişlerdir.

4.5.4. APOD miktarları

Savunmatik enzimlerden olan APOD miktarları tüm numuneler için ölçülmüştür ve Şekil 4.34.'te verilmiştir. Tüm numuneler içinde en yüksek APOD miktarı 35,085 nm askorbat/gr.dk olarak $Al_2O_3<50$ nm numunesinde ölçülmüştür. $Al_2O_3<50$ nm numunesi de 26,38 nm askorbat/gr.dk olarak benzer şekilde C5,2 numunesinden yüksek miktarda oluşmuştur. Diğer tüm nanopartikül eklenmiş numunelerde C5,2 numunesine göre düşük miktarlarda APOD aktivitesi ölçülmüştür. En düşük APOD enzim aktivitesi ise 5,029 nm askorbat/gr.dk ile $ZnO<50$ nm numunesinde ölçülmüştür.

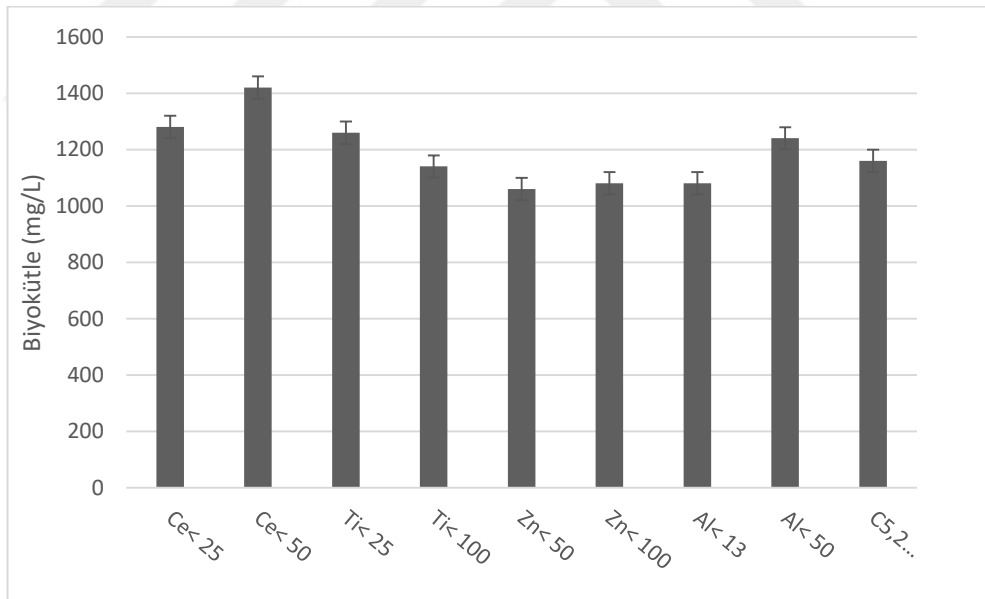


Şekil 4.34. Nanopartikül ilavesinin APOD miktarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$

Oluşan APOD enzimi, reaktif oksijen türlerinin lipit yıkıcı etkisine karşı hücreyi savunmaktadır. APOD enzim miktarlarının kontrol numunesine göre yüksek olması, lipit yıkımının tüm numunelerde kontrol numunesine göre fazla olması beklenmektedir.

4.5.5. Biyokütle oluşumuna etkisi

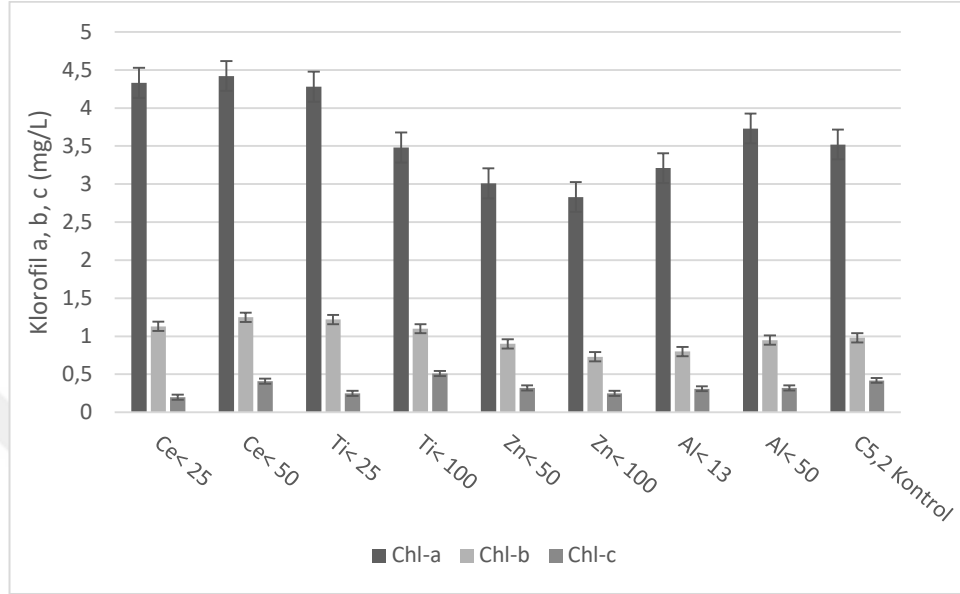
Mikroalg gelişiminde azot eksikliği, ışık yoğunluğu artışı gibi ortam şartlarının değişimi mikroalgler üzerinde strese neden olmaktadır. Bu stres koşulları, mikroalgin yağ oranını artırması veya yağ oranını azaltıp büyüme hızını arttırması gibi etkilere neden olmaktadır (Andersen, 2005). Besin ortamına optimum şartlarda eklenen nanopartiküllerin biyokütle oluşumuna etkisi incelenmiştir. Şekil 4.35.'te verildiği üzere, C5,2 kontrol numunesi 1160 mg/L biyokütle üretmiştir. CeO₂<50 nm numunesi ise 1420 mg/L ile en yüksek biyokütleyi oluşturmuştur. CeO₂<50 nm eklenen numune ise 1280 mg/L ile en yüksek ikinci biyokütlenin olduğu numune olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar CeO₂ nanopartiküllerinin *Chlorella vulgaris* üzerinde biyokütlesini arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde ZnO<50nm eklenen numune içerisinde 1060 mg/L ve ZnO<100 nm eklenen numune içerisinde 1080 mg/L ile en az biyokütle oluşturan nanopartiküller olmuştur.



Şekil 4.35. Nanopartikül ilavesinin biyokütle oluşumuna etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Besin ortamına optimum şartlarda eklenen nanopartiküllerin biyokütle oluşumuna etkisi klorofil-a,b ve c cinslerinden de incelenmiştir. Şekil 4.36.'da verildiği üzere, C5,2 kontrol numunesinde 3,52 mg/L klorofil-a, 0,98 mg/L klorofil-b ve 0,42 mg/L klorofil-c pigmenti ölçülmüştür. CeO₂<50 nm numunesinde ise 4,42 mg/L klorofil-a,

1,25 mg/L klorofil-b ve 0,41 mg/L klorofil-c pigmenti oluşmuştur. CeO₂<25 nm eklenen numunede ise 4,33 mg/L klorofil-a, 1,13 mg/L klorofil-b ve 0,2 mg/L klorofil-c pigmenti ile en yüksek ikinci klorofil pigmenti ölçülmüştür.



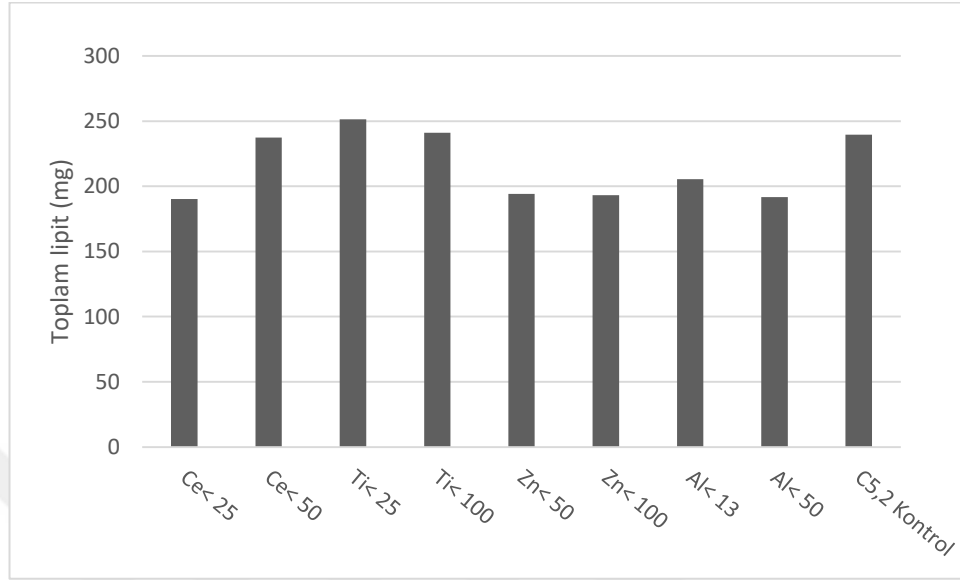
Şekil 4.36. Nanopartikül ilavesinin klorofil a,b,c miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Klorofil a,b ve c pigmentleri de benzer eğilimle artış ve azalış göstermiştir. Elde edilen klorofil sonuçları CeO₂ nanopartiküllerinin *Chlorella vulgaris* üzerinde biyokütlesini arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. En az klorofil miktarı ise biyokütlede olduğu gibi ZnO<100 nm numunesinde ölçülmüştür. ZnO<100 nm klorofil a,b ve c değerleri sırasıyla 2,83, 0,73 ve 0,25 mg/L olarak ölçülmüştür. Alg gelişim ortamına ilave edilen bir maddenin klorofil-a miktarını eklenmeyen kontrol grubuna göre daha fazla artırması herbisitlerle yapılan bir çalışmada da bulunmuştur (Er, 2019).

4.5.6. Toplam lipit miktarına etkisi

Besin ortamına optimum şartlarda eklenen nanopartiküllerin biyokütle oluşumuna etkisinin yanında lipit oluşum miktarları da incelenmiştir ve Şekil 4.37.'de verilmiştir. Biyokütle oluşumunun aksine yalnızca TiO₂<25 nm eklenen numunede kontrol numunesine göre az miktarda lipit artışı olmuştur. C5,2 kontrol numunesinde 239,58 mg lipit oluşurken, TiO₂<25 nm eklenen numunede 251,24 mg lipit oluşmuştur.

TiO₂<100 nm numunesinde ise 241,16 mg lipit oluşmuştur. Bu durum TiO₂ nanopartiküllerinin az da olsa lipit miktarını artırıcı etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.37. Nanopartikül ilavesinin toplam lipit miktarlarına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Oluşan biyokütlelerin lipit miktarları ile kuru biyokütledeki lipit oranları hesaplanmıştır ve Tablo 4.8.'de verilmiştir. C5,2 kontrol numunesinin yağ oranı %20,653 olarak hesaplanmıştır. TiO₂ < 100 nm eklenen numunedeki yağ oranı ise %21,154 olarak kontrol numunesine göre artış göstermiştir. TiO₂ < 25 nm eklenen numunede ise %19,940 ile kontrole yakın bir lipit oranı elde edilmiştir.

Tablo 4.8. Nanopartikül ilavesinin biyokütle, toplam lipit ve kuru biyokütledeki lipit oranına etkisi. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Numune	Biyokütle (mg/L)	Toplam lipit (mg/L)	Kuru biyokütledeki lipit oranı (%)
CeO ₂ <25	1280	190,22	14,861
CeO ₂ <50	1420	237,46	16,723
TiO ₂ <25	1260	251,24	19,940
TiO ₂ <100	1140	241,16	21,154
ZnO<50	1060	194,2	18,321
ZnO<100	1080	193,1	17,880
Al ₂ O ₃ <13	1080	205,5	19,028
Al ₂ O ₃ <50	1240	191,66	15,456
C5,2 kontrol	1160	239,58	20,653

Diğer nanopartikül içeren numunelerde ise lipit oranı C5,2 kontrol numunesine göre düşüş göstermiştir. En düşük lipit oranları ise %14,861 ile $\text{CeO}_2 < 25$ ve %16,723 ile $\text{CeO}_2 < 50$ çaplı nanopartiküllü ilave edilen numunelerde hesaplanmıştır. *Chloella vulgaris* gelişim ortamına CeO_2 nanopartikülünün ilave edilmesi numunelerin lipit oranının azalmasına neden olmuştur.

4.6. Kinetik Model Hesaplamaları

Optimum ışık yoğunluğunda C5,2 numunesinde geliştirilen mikroalglerin zamana bağlı olarak mikroalg gelişim kinetik model hesaplamaları yapılmıştır. Benzer şekilde optimum ışık yoğunluğunda C5,2 numunesinde NH_4^+ ve PO_4^{3-} için giderim kinetik modellerinin hesaplamaları yapılmıştır.

4.6.1. Mikroalg gelişim kinetikleri

Reaksiyon süresi ve reaksiyon hız sabitine göre kinetik model hesaplamaları yapılmıştır. Yapılan kinetik model hesaplamalara göre regresyon katsayı değerleri hesaplanmıştır. Mikroalglerin gelişimi için biyokütle ve klorofil-a artışları için yapılan kinetik hesaplamalarda birinci derece ve ikinci derece kinetik modeller incelenmiştir. İncelenen kinetik modeller için k ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

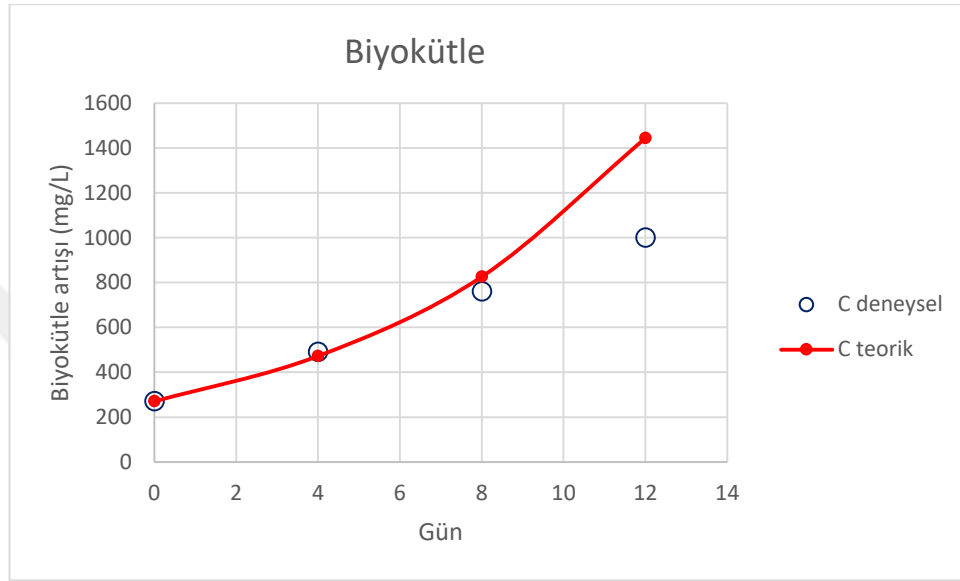
Kinetik denklemler, Denklem 3.4 ve Denklem 3.5. ile hesaplanmıştır (Lam ve ark., 2017). Tablo 4.9.'da kinetik hesaplamalardan elde edilen k ve R^2 değerleri verilmiştir.

Tablo 4.9. Kinetik hesaplamalardan elde edilen biyokütle ve Klorofil-a için R^2 ve k değerleri

Kinetik Model	Biyokütle		Klorofil-a	
	k	R^2	k	R^2
1. Mertebe	-0,1397	0,8553	-0,07	0,8647
2. Mertebe	-0,0003	0,8499	-0,032	0,7852

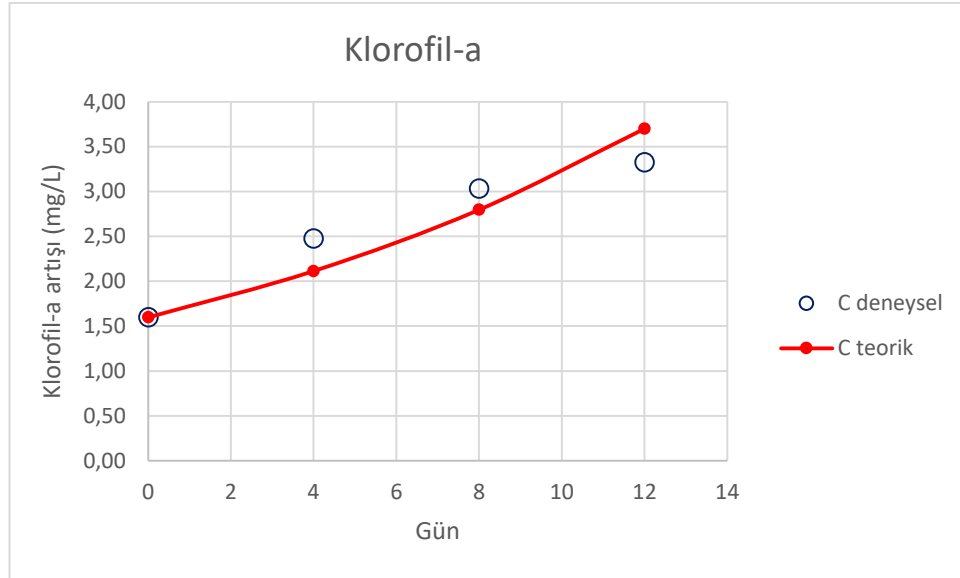
Şekil 4.38.'de görüldüğü üzere elde edilen deneysel sonuçlar ile biyokütle artışı için hesaplanan 1. mertebe kinetik modele göre hesaplanan teorik sonuçlar birbirine yakındır. Ancak 8. gün sonrasında biyokütlenin deneysel konsantrasyon değeri

sabitlenme eğilimi göstermektedir. Bunun nedeni besin azalması sebebiyle mikroalg gelişiminin besin azalması ile birlikte duraklama evresine girmiş olmasıdır. Şekil 2.1.'de görüldüğü üzere mikroalg gelişiminin logaritmik artış evresinden sonra duraklama fazına geçilmektedir. Duraklama fazının başlangıcında ise biyokütle artışı sabitlenme eğilimi göstermektedir.



Şekil 4.38 Kinetik hesaplamalardan elde edilen teorik biyokütle miktarları ve deneysel biyokütle miktarlarının karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Şekil 4.39.'da görüldüğü üzere elde edilen deneysel sonuçlar ile klorofil-a artışı için 1. mertebe kinetik modele göre hesaplanan teorik sonuçlar birbirine yakındır. Ancak deneysel olarak 4. ve 8. günde daha fazla klorofil-a artışı gösterirken 12. günde besin azalması sebebiyle klorofil-a'nın deneysel konsantrasyon değeri teorik değere göre azalmıştır. Biyokütle için olduğu gibi klorofil-a deneysel konsantrasyon deney sonunda sabitlenme eğilimi göstermektedir. Biyokütle ve klorofil-a artış kinetiklerinin birbirleri ile uyumlu olması oluşan kinetik modelin doğruluğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.39. Kinetik hesaplamalardan elde edilen teorik klorofil-a miktarları ve deneysel klorofil-a miktarlarının karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

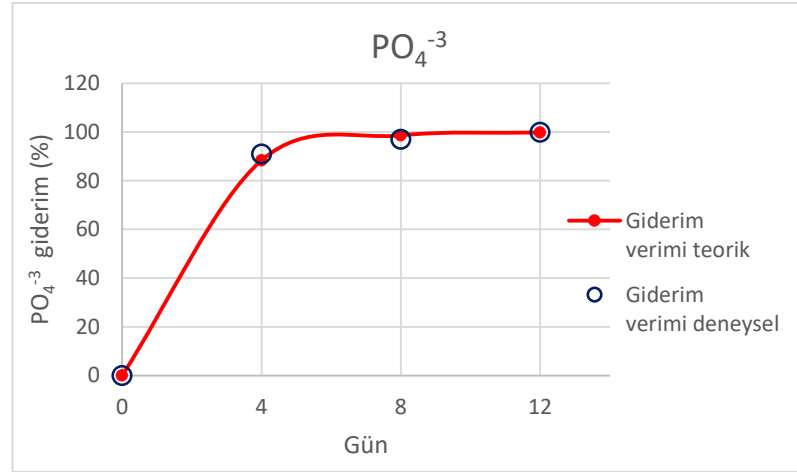
4.6.2. Atıksudan nütrient giderim kinetikleri

Reaksiyon süresi ve reaksiyon hız sabitine göre kinetik model hesaplamaları yapılmıştır. Yapılan kinetik model hesaplamalara göre regresyon katsayı değerleri hesaplanmıştır. Mikroalgler ile atıksudan PO_4^{3-} ve NH_4^+ giderimleri için yapılan kinetik hesaplamalarında birinci derece ve ikinci derece kinetik modeller incelenmiştir. İncelenen kinetik modeller için k ve R^2 değerleri hesaplanmıştır. Kinetik denklemler, Denklem 3.4 ve Denklem 3.5. ile hesaplanmıştır (Lam ve ark., 2017). Tablo 4.10.'da kinetik modellerden elde edilen k ve R^2 değerleri verilmiştir.

Tablo 4.10. Kinetik hesaplamalardan elde edilen PO_4^{3-} ve NH_4^+ için R^2 ve k değerleri

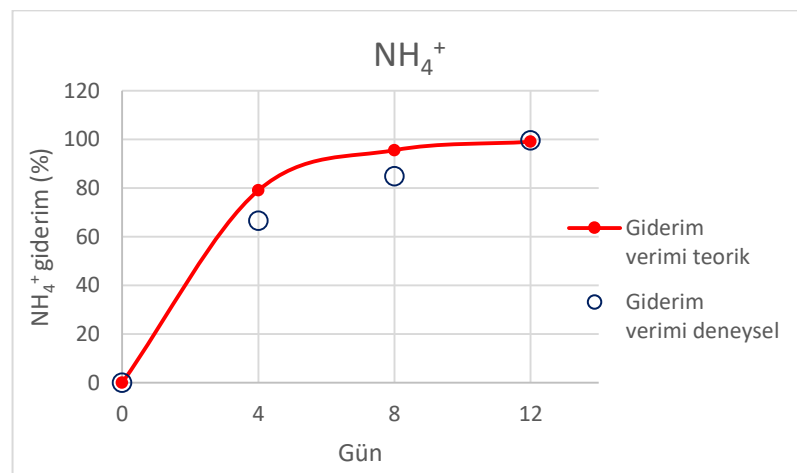
Kinetik Model	PO_4^{3-}		NH_4^+	
	k	R^2	k	R^2
1. mertebe	0,5383	0,9634	0,3911	0,8516
2. mertebe	54,853	0,5533	0,1693	0,5512

Şekil 4.40.'da görüldüğü üzere elde edilen deneysel sonuçlar ile PO_4^{3-} giderimi için hesaplanan 1. Mertebe kinetik modelinin R^2 'si %96,34 olması, 1. mertebe kinetik modele göre hesaplanan teorik sonuçlar birbirine yakın olmasını açıklamaktadır.



Şekil 4.40. Kinetik hesaplamalardan elde edilen zamana bağlı teorik PO_4^{3-} giderim verimleri ve deneysel PO_4^{3-} giderim verimlerinin karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

Şekil 4.41.'de görüldüğü üzere elde edilen deneysel sonuçlar ile NH_4^+ giderimi için hesaplanan 1. mertebe kinetik modele göre hesaplanan teorik sonuçlar birbirine yakındır. Ancak 4. gün ve 8. gün elde edilen deneysel giderimi verimi teorik giderimi verimine göre biraz daha düşüktür. NH_4^+ giderimi için elde edilen 1. Mertebe kinetik modelinin R^2 'si % 85,16 olması teorik ve deneysel verimlerin yakın değerler olduğunu göstermektedir. Deneysel ve teorik değerlerin farklı olması, yüksek pH değerlerinde NH_4^+ 'ın NH_3 haline dönüşümü ve karıştırmanın da etkisi ile havaya karışmasından ileri geldiği olarak yorumlanabilmektedir.



Şekil 4.41. Kinetik hesaplamalardan elde edilen zamana bağlı teorik NH_4^+ giderim verimleri ve deneysel NH_4^+ giderim verimlerinin karşılaştırılması. Işık yoğunluğu: $100 \mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kullanılan biyolojik olarak arıtılmış kanatlı hayvan kesimhanesi atıksuyunda bulunan rotifer ve bakterilerin mikroalg gelişimine zarar vermeden yok edilmesi amacıyla pH şoklama yöntemi uygulanmıştır. *Chlorella vulgaris* yetiştirilmesi için en pH şoklama süresinin ve periyodunun C5,2 numunesine ait olduğu, numuneden elde edilen lipid miktarına ve yağ asidi metil ester profiline göre karar verilmiştir. C5,2 numunesinden 60 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda 0,118 gr lipid elde edilmiştir ve kuru biyokütlesindeki lipid oranı %17,35 olarak hesaplanmıştır.

Kullanılan atıksu içerisindeki rotifer ve bakterilerin öldürülmesi için ortam pH'nın alkali bir değerde sabit tutulmasının mikroalg gelişimine olan etkisinin incelenmesi için bir deney seti yürütülmüştür. Alkali şartlarda gelişen mikroalglerin biyolojik olarak arıtılmış suyun azot ve fosfor içeriğinin ileri arıtımına olan etkisi de incelenmiştir. Biyokütle ve klorofil-a analizlerinin sonuçlarına göre, pH 10,5 optimum biyokütle gelişim değerlerini göstermiştir. Mikroalg biyokütlesi pH 10,5'te 12 günde 262 mg/L'den 660 mg/L'ye yükselmiştir. Benzer şekilde, pH 10,5 numunesindeki klorofil-a miktarı 12 gün sonra 1,92 mg/L'den 2,6 mg/L'ye çıkmıştır. Literatürde bir çalışmada, *Chlorella pyrenoidosa* mikroalg kültürü, otoklavlanmış kümes hayvanı mezbaha atıksuyu ile pH 10,16'da geliştirilmiştir 15. günün sonunda ölçülen en yüksek mikroalg biyokütlesi 430 mg/L, klorofil-a miktarı ise 15,31 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (Azam ve ark., 2020). Bu çalışmada, 12. gün sonunda NH_4^+ giderimi pH 10'da yaklaşık %92 ve pH 10,5'te yaklaşık %99 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, pH 10 ve pH 10,5'te %85 ile %96,43 arasında, *Chlorella vulgaris* tarafından PO_4^{3-} giderilmiştir. Benzer şekilde ikincil arıtma atık suyunda *Chlorella vulgaris* kültürü ile yapılan bir çalışmada %95'e varan NH_4^+ giderimi ve %86'ya varan PO_4^{3-} giderimi sağlanmıştır (Gao ve ark., 2015).

Mikroalg gelişimi için farklı ışık yoğunluklarında (20, 60, 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$) yürütülen deneylerde kontrol numuneleri ile C5,2 ve pH 10,5 numunelerinde gelişen *Chlorella vulgaris* biyokütleleri ve bu numunelerin klorofil-a pigment içerikleri kıyaslanmıştır. C5,2 numunesi BG11 içeren numuneler ile benzer mikroalg gelişimi elde edilmiştir. Ancak pH10.5 numunesinde çok daha az biyokütle oluşmuştur. C5,2 numunesi en yüksek biyokütleyle 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda ulaşmıştır. Tüm numuneler için de en düşük mikroalg gelişimi 20 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda oluşmuştur. Işık yoğunluğunun artması ile mikroalg hücrelerindeki klorofil-a miktarı da artmaktadır (Gim ve ark., 2016). Bir çalışmada *Chlorella sp.* için sürekli ışıktaki orta yoğunlukta ışığın biyokütle artışı için en iyisi olduğu belirtilmiştir (He ve ark., 2015).

Işık yoğunluğunun etkisinin belirlenmesi çalışmalarında *Chlorella vulgaris*'in tüm numunelerdeki NH_4^+ ve PO_4^{3-} giderimleri incelenmiştir. En düşük ışık yoğunluğuna sahip 20 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 'de en düşük NH_4^+ giderimine sahiptir. Ancak bu duruma rağmen atıksu içeren numunelerde % 77,95 oranında C5,2 numunesinde NH_4^+ giderimi sağlanmıştır. En yüksek giderime ise 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda %100 ile sağlanmıştır. 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda PO_4^{3-} giderimleri için de benzer şekilde fosfatın tamamı alg gelişim ortamından uzaklaştırılmıştır.

Işık yoğunluğu arttıkça tüm numuneler için toplam lipit üretimi artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre lipit üretimi açısından pH 10.5 numunesi diğer numunelere oranla düşük miktarda lipit üretmiştir. C5,2 numunesi BG11 kontrol numunesi ile kıyaslandığında lipit üretimi açısından yakın sonuçlar elde edilmiştir. 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında C5,2 numunesi kuru biyokütlenin %20'si kadar lipit oluşturarak BG11'den fazla lipit elde edilmiştir. Bunun nedeni yapılan pH şoklama işleminin *Chlorella vulgaris*'in üzerinde stres oluşturduğu ve lipit miktarının artışına neden olduğu yönünde yorumlanabilir. Işık yoğunluğunun artışı ile birlikte elde edilen kuru biyokütlenin lipit oranları da artış göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; ışık yoğunluğunun artmasıyla mikroalg biyokütlesi

artarken, lipit üretimi çoğunlukla mikroalg türlerine ve diğer çevresel koşullara bağlı olarak artış göstermiştir (Seo ve ark., 2017; Nzayisenga ve ark., 2020).

C5,2 numunesinin yağ asidi metil esterlerinin tür ve miktarları incelendiğinde en yüksek miktarın 100 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluğunda oluşmuştur. Oluşan türler C16:0, C18:0, C18:2 ve C18:3 FAME'leri içermektedir. Elde edilen FAME'lerin biyodizel eldesi için uygunluğu Avrupa standartlar komitesi biyodizel kalitesi standardı (EN 14214) ile değerlendirilmiştir. Standartta sınırlayıcı faktör C18:2 yağ asidinin toplam yağ asitlerine oranı olarak kabul edilmektedir (Mohd-Sahib ve ark., 2017). Yağ asitleri içerisinde %12 oranını geçmemesi gereken C18:3 linolenik asit; 20 ve 60 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında C5,2 numunesinde oluşmazken, 100 ve 140 $\mu\text{molphoton/m}^2\text{s}$ ışık yoğunluklarında sırasıyla %7,325 ve %6,320 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen FAME türleri C16-C18 doymuş ve doymamış yağ asidi metil esterlerinin bir karışımıdır ve bu FAME'lerin varlığı, kaliteli biyodizelin bir göstergesidir (Deshmukh ve ark., 2019; Gao ve ark., 2019).

Belirlenen optimum pH şoklama şartları ve optimum ışık yoğunluğunda kültür ortamına yapılan karbondioksit ilavesi çalışmalarında biyokütle artışına ve lipit oluşumuna CO₂ etkisi araştırılmıştır. CO₂ ilavesinin C5,2 numunesinde mikroalg gelişimi, lipit oluşumu ve nütrient giderimleri üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etkisi olmamıştır. Literatürde de CO₂ ilave edilen ve edilmeyen besin ortamlarındaki alg gelişimi takip edildiğinde belirgin bir farkın oluşmadığı çalışmalar mevcuttur (Mulbry ve ark., 2008; Wu ve ark., 2012).

Lipit miktarının artırılması için stres oluşturma amacıyla besin ortamına ilave edilen nanopartiküllerden TiO₂<25 nm partikül ilavesiyle lipit miktarında 12 mg lipit artışı olmuştur. TiO₂<100 nm partikül ilavesiyle ise 2 mg lipit artışı olmuştur. Diğer tüm numunelerde ise toplam lipit miktarları azalmıştır. Bu durum TiO₂ nanopartiküllerinin az da olsa lipit miktarını artırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Biyokütle ve klorofil-a miktarlarında CeO₂ nanopartiküllerinin *Chlorella vulgaris* üzerinde biyokütlesini arttırıcı etkisi olmuştur. Enzim aktiviteleri incelendiğinde *Chlorella vulgaris*'in stres şartları altında lipit peroksidasyonunu önlemek amacıyla APOD ve SOD enzim

aktivitelerini artırmıştır ancak çoğu nanopartiküllü numune için yetersiz kalmıştır. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak ölçülen MDA ise çoğu nanopartiküllü numune için kontrol numunesinden yüksek çıkmıştır. Bu da lipit yıkımının olduğunu göstermektedir. Nanopartikül ilavesi ile bir miktar biyokütle artışı olmasına rağmen lipit artışı beklenenden yetersiz olmuştur.

Optimum şartlarda C5,2 numunesi için alg gelişim ve nütrient giderim kinetik modelleri oluşturulmuştur. Elde edilen R^2 değerlerine göre tüm parametreler 1. Mertebe kinetik ile uyumlu sonuç vermiştir.



KAYNAKLAR

- Almutairi, A. 2015. Production of biofuels from the green alga tetraselmis. The University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Doktora Tezi.
- Ananthi, V., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A. ve Arun, A. 2021. "Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae", *Fuel*, 284(August 2020), 118962.
- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press. 1. baskı. New York, 1–578.
- APHA 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. New York.
- Arif, M., Bai, Y., Usman, M., Jalalah, M., Harraz, F. A., Al-Assiri, M. S., Li, X., Salama, E. S. ve Zhang, C. 2020. "Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: Role of lipidomics", *Bioresource Technology*, 298(October 2019), 122–299.
- Azam, R., Kothari, R., Singh, H. M., Ahmad, S., Ashokkumar, V. ve Tyagi, V. V. 2020. "Production of algal biomass for its biochemical profile using slaughterhouse wastewater for treatment under axenic conditions", *Bioresource Technology*, 306(January), 123-116.
- Bazdar, E., Roshandel, R., Yaghmaei, S. ve Mardanpour, M. M. 2018. "The effect of different light intensities and light/dark regimes on the performance of photosynthetic microalgae microbial fuel cell", *Bioresource Technology*, 261(February), 350–360.
- Bhola, V., Swalaha, F., Ranjith Kumar, R., Singh, M. ve Bux, F. 2014. "Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration", *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 2103–2118.
- Biernat, K., Malinowski, A. ve Gnat, M. 2013. "The Possibility of Future Biofuels Production Using Waste Carbon Dioxide and Solar Energy, *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability*", *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability*, 125–172.
- Bindoli, A. ve Rigobello, M. P. 2013. *Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling, Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. 2. baskı.
- Bligh, E. . ve Dyer, W. 1959. "Rapid metod of total lipit extraction", *Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.

- Cabanelas, I. T. D., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Souza, C. O., Perales, J. A., Almeida, P. F., Druzian, J. I. ve Nascimento, I. A. 2013. "From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol", *Applied Energy*, 109, 283–290.
- Chang, H. X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q. ve Zhu, X. 2016. "Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon", *Bioresource Technology*, 206, 231–238.
- Chatsungnoen, T. ve Chisti, Y. 2019. Flocculation and electroflocculation for algal biomass recovery, *Biofuels from Algae*. Second Edi., 257–286.
- Cheirsilp, B. ve Torpee, S. 2012. "Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation", *Bioresource Technology*, 110, 510–516.
- Cheng, T., Wei, C. H. ve Leiknes, T. O. 2017. "Polishing of anaerobic secondary effluent by *Chlorella vulgaris* under low light intensity", *Bioresource Technology*, 241, 360–368.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W. ve Das, K. C. 2010. "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications", *Bioresource Technology*, 101(9), 3097–3105.
- Chisti, Y. 2007. "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306.
- Chisti, Y. 2008. "Biodiesel from microalgae beats bioethanol", *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126–131.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, T. Y., Chang, Y. Bin, Kuo, C. M. ve Lin, C. S. 2015. "Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource", *Bioresource Technology*, 184, 179–189.
- Cho, S., Luong, T. T., Lee, D., Oh, Y.-K. ve Lee, T. 2011. "Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production", *Bioresource Technology*, 102(18), 8639–8645.
- Çirik, S. ve Gökpınar, Ş. 2008. *Plankton Bilgisi ve Kültürü*, Ege Üniversitesi Yayınları, 5. Baskı, İzmir, 1-274.
- D'oca, M. G. M., Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J. A., Primel, E. G. ve Abreu, P. C. 2011. "Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*", *Biomass and Bioenergy*, 35(4), 1533–1538.
- Dai, Y. M., Chen, K. T. ve Chen, C. C. 2014. "Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production", *Chemical Engineering Journal*, 250, 267–273.
- Deshmukh, S., Kumar, R. ve Bala, K. 2019. "Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions", *Fuel Processing Technology*, 191(May), 232–247.

- Dhindsa, R. S., Plumb-dhindsa, P. ve Thorpe, T. A. 1981. "Leaf Senescence : Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation , and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase", *Journal of Experimental Botany*, 32(126), 93–101.
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., Sengupta, D. ve El-Halwagi, M. M. 2017. "A review of biodiesel production from microalgae", *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19, 637–668.
- Enamala, M. K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T. V., Velpuri, J. ve Kuppam, C. 2018. "Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94(May), 49–68.
- EPA 1991. "ESS Method 150.1: Chlorophyll – Spectrophotometric, Environmental Sciences Section Inorganic Chemistry Unit", (September).
- Er, Ş. 2019. İki Farklı Herbisitin *Arthrospira Platensis* Gomont ve *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck) Alglerinin Gelişimi ve Antioksidan Parametrelerinin Üzerine Etkisi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Florentino de Souza Silva, A. P., Costa, M. C., Colzi Lopes, A., Fares Abdala Neto, E., Carrhá Leitão, R., Mota, C. R. ve Bezerra dos Santos, A. 2014. "Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae", *Renewable Energy*, 63, 762–766.
- Gao, F., Yang, H.-L., Li, C., Peng, Y.-Y., Lu, M.-M., Jin, W.-H., Bao, J.-J. ve Guo, Y.-M. 2019. "Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp.", *Bioresource Technology*, 282, 118–124.
- Gao, F., Yang, Z., Li, C., Zeng, G., Ma, D. ve Zhou, L. 2015. "Bioresource Technology A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent", *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 179, 8–12.
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T. ve Mishra, S. 2014. "Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production", *Bioresource Technology*, 171, 367–374.
- Gim, G. H., Ryu, J., Kim, M. J., Kim, P. Il ve Kim, S. W. 2016. "Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 605–616.
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M. ve Yang, J. 2014. "Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*", *Energy Procedia*, 61, 2012–2015.
- Halim, R., Danquah, M. K. ve Webley, P. A. 2012. "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review", *Biotechnology Advances*, 30(3), 709–732.

- Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K. ve Webley, P. A. 2012. "Microalgal cell disruption for biofuel development", *Applied Energy*, 91(1), 116–121.
- Halim, R., Rupasinghe, T. W. T., Tull, D. L. ve Webley, P. A. 2013. "Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass", *Bioresource Technology*, 140, 53–63.
- Hamed, S. M., Selim, S., Klöck, G. ve AbdElgawad, H. 2017. "Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144(May), 19–25.
- He, Q., Yang, H., Wu, L. ve Hu, C. 2015. "Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae", *Bioresource Technology*, 191, 219–228.
- Heath, R. L. ve Packer, L. 1968. "Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation Department", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A. ve García-González, M. C. 2016. "Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications", *Chemical Engineering Journal*, 285, 449–458.
- Hu, X., Liu, B., Deng, Y., Bao, X., Yang, A. ve Zhou, J. 2019. "A novel two-stage culture strategy used to cultivate *Chlorella vulgaris* for increasing the lipid productivity", *Separation and Purification Technology*, 211, 816–822.
- Jaimes-Duarte, D. L., Soler-Mendoza, W., Velasco-Mendoza, J., Muñoz-Peñaloza, Y. ve Urbina-Suárez, N. A. 2012. "Characterization chlorophytas microalgae with potential in the production of lipids for biofuels", *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(1), 93–102.
- Ji, X., Jiang, M., Zhang, J., Jiang, X. ve Zheng, Z. 2018. "The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater", *Bioresource Technology*, 247(July 2017), 44–50.
- Juneja, A., Ceballos, R. M. ve Murthy, G. S. 2013. "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review", *Energies*, 6(9), 4607–4638.
- Kadir, W. N. A., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W. ve Lee, K. T. 2018. "Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review", *Energy Conversion and Management*, 171(June), 1416–1429.
- Kaplan, M., Temizgül, R., Yılmaz, S. ve Gökalp, Z. 2016. Tuz Stresinin Sorgum Hat ve Çeşitlerin Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri, Erciyes Üniversitesi, BAP Sonuç Raporu, 1-65.
- Katarzyna, L., Sai, G. ve Avijeet Singh, O. 2015. "Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: Literature review and research needs", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1418–1427.
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C. ve Sharma, G. 2022. "Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment", *Fuel*, 311, 122543.

- Kim, D., Kim, E. K., Koh, H. G., Kim, K., Han, J. I. ve Chang, Y. K. 2017. "Selective removal of rotifers in microalgae cultivation using hydrodynamic cavitation", *Algal Research*, 28(February), 24–29.
- Komolafe, O., Velasquez Orta, S. B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I. Y., Harvey, A. P. ve Orta Ledesma, M. T. 2014. "Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater", *Bioresource Technology*, 154, 297–304.
- Lam, M. K., Yusoff, M. I., Uemura, Y., Lim, J. W., Khoo, C. G., Lee, K. T. ve Ong, H. C. 2017. "Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies", *Renewable Energy*, 103, 197–207.
- Lee, I., Park, J. Y., Choi, S. A., Oh, Y. K. ve Han, J. I. 2014. "Hydrothermal nitric acid treatment for effectual lipid extraction from wet microalgae biomass", *Bioresource Technology*, 172, 138–142.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y. ve Oh, H. M. 2010. "Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae", *Bioresource Technology*, 101(1 SUPPL.), S75–S77.
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F. ve Wong, M. 2013. "Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*", *Chemosphere*, 92(10), 1383–1389.
- Luangpipat, T. ve Chisti, Y. 2017. "Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae — Effects of salinity and other factors", *Journal of Biotechnology*, 257, 47–57.
- Mandal, S. ve Mallick, N. 2009. "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 281–291.
- Mata, T. M., Martins, A. A. ve Caetano, N. S. 2010. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.
- Menegazzo, M. L. ve Fonseca, G. G. 2019. "Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 87–107.
- Meullemiestre, A., Breil, C., Abert-Vian, M. ve Chemat, F. 2016. "Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application", *Bioresource Technology*, 211, 190–199.
- Mohd-Sahib, A. A., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., Isa, M. H., Ho, C. D., Kutty, S. R. M., Wong, C. Y. ve Rosli, S. S. 2017. "Lipid for biodiesel production from attached growth *Chlorella vulgaris* biomass cultivating in fluidized bed bioreactor packed with polyurethane foam material", *Bioresource Technology*, 239, 127–136.
- Moser, B. R. 2009. "Biodiesel production, properties, and feedstocks", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(3), 229–266.

- Mubarak, M., Shaija, A. ve Suchithra, T. V. 2015. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production", *Algal Research*, 7, 117–123.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C. ve Kebede-Westhead, E. 2008. "Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers", *Bioresource Technology*, 99(17), 8137–8142.
- Nakano, Y. ve Asada, K. 1981. "Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts", *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- Nzayisenga, J. C., Farge, X., Groll, S. L. ve Sellstedt, A. 2020. "Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater", *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–8.
- Ogbonna, J. C. ve Tanaka, H. 2000. "Light requirement and photosynthetic cell cultivation - Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors", *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 207–218.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Yagi, K. 1979. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Özkaleli, M. (2014) Ticari nanopartiküllerin *P. Subcapitata* yeşil-alg türü üzerindeki akut toksisitesinin incelenmesi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Pancha, I., Chokshi, K. ve Mishra, S. 2015. "Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077", *Bioresource Technology*, 179, 565–572.
- Pittman, J. K., Dean, A. P. ve Osundeko, O. 2011. "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources", *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25.
- Prabakaran, P. ve Ravindran, A. D. 2011. "A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae", *Letters in Applied Microbiology*, 53(2), 150–154.
- Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A. ve Nagappan, T. 2020. "*Chlorella vulgaris* : a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts", *Applied Phycology*, 1(1), 2–11.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. ve Vaca-Garcia, C. 2014. "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Schnurr, P. J. ve Allen, D. G. 2015. "Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 418–429.
- Seo, S. H., Ha, J. S., Yoo, C., Srivastava, A., Ahn, C. Y., Cho, D. H., La, H. J., Han, M. S. ve Oh, H. M. 2017. "Light intensity as major factor to maximize biomass and lipid productivity of *Ettlia* sp. in CO₂-controlled photoautotrophic chemostat", *Bioresource Technology*, 244(July), 621–628.

- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M. Z., Nawaz, S., Asraful Alam, M. ve Mehmood, M. A. 2020. "Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review", *Science of the Total Environment*, 704, 135303.
- Sharma, J., Kumar, V., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Mathimani, T., Bishnoi, N. R. ve Pugazhendhi, A. 2020. "Microalgal consortia for municipal wastewater treatment – Lipid augmentation and fatty acid profiling for biodiesel production", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 202(July 2019), 111638.
- Shene, C., Asenjo, J. A. ve Chisti, Y. 2018. "Metabolic modelling and simulation of the light and dark metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Journal*, 96(5), 1076–1088.
- Singh, S. P. ve Singh, P. 2014. "Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 172–179.
- Soares, A. T., da Costa, D. C., Silva, B. F., Lopes, R. G., Derner, R. B. ve Antoniosi Filho, N. R. 2014. "Comparative Analysis of the Fatty Acid Composition of Microalgae Obtained by Different Oil Extraction Methods and Direct Biomass Transesterification", *Bioenergy Research*, 7(3), 1035–1044.
- Soares, A. T., D'Alessandro, E. B., Lopes, R. G., Derner, R. B. ve Antoniosi Filho, N. R. 2019. "Optimization of biodiesel production by in situ transesterification from dry biomass of *Choricystis minor* var. *minor* via response surface methodology", *Biofuels*, 0(0), 1–7.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. ve Cohen-Bazire, G. 1971. "Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*).", *Bacteriological reviews*, 35(2), 171–205.
- Su, Y., Mennerich, A. ve Urban, B. 2016. "Bioresource Technology The long-term effects of wall attached microalgal biofilm on algae-based wastewater treatment", *Bioresource Technology*, 218, 1249–1252.
- Suali, E. ve Sarbatly, R. 2012. "Conversion of microalgae to biofuel", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342.
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T. ve Shuit, S. H. 2019. "Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115(January), 109361.
- Sydney, E. B., da Silva, T. E., Tokarski, A., Novak, A. C., de Carvalho, J. C., Woiciechowski, A. L., Larroche, C. ve Soccol, C. R. 2011. "Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage", *Applied Energy*, 88(10), 3291–3294.
- Tanattı, P., Şengil, A. ve Özdemir, A. 2018. "Treatment of biodiesel wastewater by solvent extraction: Evaluation of kinetic and thermodynamic data", *Environmental Engineering and Management Journal*, 17(11), 2657–2665.
- Taşkan, E. 2016. "Performance of mixed algae for treatment of slaughterhouse wastewater and microbial community analysis", *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20474–20482.

- Terán Hilares, R., Garcia Bustos, K. A., Sanchez Vera, F. P., Colina Andrade, G. J. ve Pacheco Tanaka, D. A. 2021. "Acid precipitation followed by microalgae (*Chlorella vulgaris*) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment", *Bioresource Technology*, 335(May).
- Vasistha, S., Khanra, A., Clifford, M. ve Rai, M. P. 2021. "Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110498.
- WMO 2020. "The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2019", *WMO Greenhouse Gas Bulletin*, (16), 1–9.
- Wu, L. F., Chen, P. C., Huang, A. P. ve Lee, C. M. 2012. "The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater", *Bioresource Technology*, 113, 14–18.
- Xu, M., Bernards, M. ve Hu, Z. 2014. "Algae-facilitated chemical phosphorus removal during high-density *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor", *Bioresource Technology*, 153, 383–387.
- Yan, C., Luo, X. ve Zheng, Z. 2013. "Effects of various LED light qualities and light intensity supply strategies on purification of slurry from anaerobic digestion process by *Chlorella vulgaris*", *International Biodeterioration and Biodegradation*, 79, 81–87.
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Hu, D., Liu, C. ve Li, B. 2020. "A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions", *Bioresource Technology*, 301(November 2019), 122804.
- Yun, C. J., Hwang, K. O., Han, S. S. ve Ri, H. G. 2019. "The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703", *Biomass and Bioenergy*, 127(July), 105277.
- Zagal, A. (2008) *Tekstil atık suyunun oreochromis niloticus'da toksik etkisinin bazı antioksidan enzimler kullanılarak araştırılması*, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Zhang, X. 2015. Microalgae removal of CO₂ from flue gas. IEA Clean Coal Centre, 1-95.
- Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. ve Volova, T. G. 2011. "Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252", *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 47–52.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gamze KATIRCIOĞLU SINMAZ

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Doktora	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Çevre Mühendisliği	Devam ediyor
Yüksek Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü / Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü / Çevre Mühendisliği	2013
Lisans	Kocaeli Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Çevre Mühendisliği	2010
Lise	Cahit Elginkan Anadolu Lisesi / KOCAELİ	2005

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2014-Halen	Sakarya Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2010-2014	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER (makale, bildiri, proje vb.)

1. Katırcıoğlu Sınmaz, G., Erden, B. & Şengil, İ.A. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in alkaline condition for biodiesel feedstock after biological treatment of poultry slaughterhouse wastewater. Int. J. Environ. Sci. Technol. (2022). <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04137-4>