

FERMENTATİF HİDROJEN ÜRETİMİ İÇİN KARIŞIK KÜLTÜRDEN HİDROJEN ÜRETEKİNİN HAZIRLANMASINDA ÖN ARITIM METOTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Nevim GENÇ^{1*}

¹Kocaeli Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İZMİT

Özet

Arıtım uygulamalarında karışık kültür saf kültür yerine kullanılır. Hidrojen, anaerobik şartlar altında karışık kültürde substratın fermente edilmesi ile üretilir. Anaerobik şartlar altındaki karışık kültür sistemlerinde, hidrojen üreten bakteri ile üretilen hidrojen, çoğu kez diğer hidrojen tüketen bakteriler ile tüketir. Bu yüzden aşı olarak kullanılacak çamura, hidrojen üreten bakterinin aktivitesi korunurken mümkün olduğunca hidrojen tüketen bakteriyel aktiviteyi baskılayacak ön arıtım işlemi uygulamak gerekir. Etkili ön arıtım prosesleri ısıtma, havalandırma, asidik veya bazik arıtım ve kimyasallar uygulama gibi işlemleri kapsar. Bu çalışmada fermentatif hidrojen üretimi için, hidrojen üreten aşının hazırlanmasında ön arıtım metotlarının etkinliği tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biohidrojen, Karanlık fermentasyon, Karışık mikrobiyal kültür, Ön arıtım

EVALUATION OF PRETREATMENT METHODS OF PREPARING HYDROGEN PRODUCING SEEDS FROM MIXED CULTURES FOR FERMENTATIVE HYDROGEN PRODUCTION

Abstract

Mixed cultures are used instead of pure cultures for treatment. Hydrogen can be produced through fermenting substrate in a mixed culture under anaerobic conditions. In a mixed culture system under anaerobic conditions, the hydrogen produced by hydrogen-producing bacteria is often readily consumed by other hydrogen-consuming bacteria. Thus the seed sludge needs a pretreatment process to suppress as much hydrogen-consuming bacterial activity as possible while still preserving the activity of the hydrogen-producing bacteria. Effective pretreatment processes include heating, acidic or basic treatment, aeration, chemicals, and so on. This review discusses effect of a pretreatment at preparing hydrogen producing seeds for fermentative hydrogen production.

Keywords: Biohydrogen, Dark fermentation, Mixed microbial culture, Pretreatment

* E-posta: ngenc@kocaeli.edu.tr

1. Giriş

Dünyada bugün tüketilen enerjinin %80'ini fosil yakıtlar oluşturmaktadır. Sınırlı rezervlere sahip olan fosil yakıtların kullanılması, iklim değişikliği yaratmasından halk sağlığını tehdit etmesine kadar geniş bir aralıkta problemler meydana getirmiştir. Bu yüzden çevreye daha dost ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyaç her geçen gün daha da artmaktadır.

Hidrojen (H_2) gerek sosyo-ekonomik gerek çevresel faydalar açısından en ümit verici yakıt bulunmuştur. Hidrojen, bilinen diğer yakıtlardan daha yüksek enerji değerine sahip olup (122-142 kJ/g) (hidrokarbon yakıtlardan 2,75 kat daha yüksek) hidrokarbon içermeyen yeşil bir alternatiftir [1,2,3]. Evsel veya endüstriyel tüketim için taşınabilir ve kullanımı doğal gazdan daha emniyetlidir. H_2 çevresel açıdan güvenilir, yenilenebilir enerji kaynağıdır ve fosil yakıtlara alternatif olarak kabul edilmektedir [3]. H_2 başlıca fosil yakıtlar, biyokütle ve sudan termokimyasal, elektrokimyasal ve biyolojik metotlar ile üretilir. Biyolojik metotların dışındaki yöntemlerde yoğun enerji kullanılmaktadır. Örneğin elektroliz metodunda işletme maliyetinin %80'ini elektrik giderleri oluşturmaktadır. Biyolojik hidrojen üretim prosesleri ortam sıcaklığı ve basıncında işletilir, bu yüzden enerji tüketimi azdır. Bu prosesler sadece çevreye dost olmaları değil, ayrıca yenilenebilir kaynakların değerlendirilmesinde yeni bir açılım yaratması bakımından önemlidir. Bu proseslerde çeşitli atık maddeler kullanılabilir [1, 4,]. Biyolojik prosesler dört şekilde sınıflandırılabilir. Bunlar: alg ve cyanobakter ile suyun biyofotolizi, fotosentetik bakteri ile organik bileşiklerin fotoparçalanması, organik bileşiklerden fermentatif hidrojen üretimi ve fotosentetik ve fermentatif bakteri kullanılarak oluşturulan hibrid sistemlerde hidrojen üretimi [4]. Fermentatif ve fotofermentasyon yöntemleri karşılaştırıldığında ise ışık olmaksızın sürekli olarak yüksek ve stabil hidrojen üretimine olanak veren fermentatif hidrojen üretim prosesinin, sanayileştirme çabaları için çok uygun olduğu, ayrıca basit kontrol ve düşük işletme maliyetine sahip olduğu da söylenebilir [5]. Fermentatif hidrojen üretim prosesi, son yıllarda laboratuvar ölçeğinde organik atıklardan hidrojen üretimi için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Heterotroflar tarafından organik maddeden fermentatif hidrojen üretimi çoğu zaman "karanlık fermentasyon" olarak tanımlanmaktadır.

Bilindiği üzere anaerobik prosesler kullanılarak, organik atıklar mikroorganizma gurubu tarafından bir seri zincirleme reaksiyon ile metana dönüştürülür. Kompleks organik maddeler önce hidrolizlenir ve yağ asitlerine fermente olur. Daha sonra yağ asitleri asetat ve hidrojene dönüşür. Son aşamada ise bu yan ürünler metana dönüşür. Son yıllardaki eğilim ise organik kirleticilerin metan yerine hidrojene dönüştürülmesidir. Hidrojen aşağıda verilen iki sebepten dolayı metana karşı tercih edilir [6].

1- H_2 , metana kıyaslandığında geniş bir aralıkta endüstriyel kullanıma sahiptir. Metan ise çoğunlukla yakıt olarak kullanılır [3]

2- H_2 ideal yakıttır, yandığı zaman sadece su oluşur.

Enerji uzmanları, hidrojenin gelecekte fosil yakıtlar ile yer değiştireceği görüşündedirler.

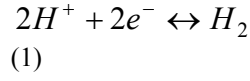
Fermentatif hidrojen üretimi hem saf kültür hem de karışık kültür kullanılarak yürütülebilir. Karışık kültürlü sistemlerin işletilmesi ucuz, kontrol edilmesi kolay ve geniş bir hammaddede çalışma olanağı bulmasından dolayı avantajlıdır. Ancak karışık kültürün kullanıldığı fermentatif hidrojen üretim proseslerinde, hidrojen üreticiler tarafından üretilen H_2 , hidrojen tüketiciler tarafından tüketilebilir. Bu yüzden bu proseslerde kullanılacak karışık kültüre, bir ön arıtım işlemi uygulanarak hidrojen üreten bakteri aktivitesinin korunması, hidrojen tüketen bakteri aktivitesinin engellenmesi önerilmektedir.

Bu makalede aşı olarak kullanılacak karışık kültüre uygulanan ön işlemler ve bu ön işlemlerin fermentatif hidrojen üretimine olan etkisi anlatılmıştır.

1. Organik Bileşiklerden Fermentatif Hidrojen Üretimi

Fermentatif hidrojen üretimi iki faktörün etkili birleşimi ile en yüksek seviyesine ulaşabilir. Bu faktörlerin ilki kolay elde edilebilir ve zengin elektron kaynağının varlığı, ikincisi ise aktif hidrojenazın mevcut olmasıdır.

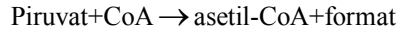
Biyolojik H_2 üretim prosesleri, hidrojen üreten enzimlerin varlığına bağlıdır. Bu enzimler



kimyasal reaksiyonunu katalizler. H_2 üreten enzimlerin aktif bölgelerinde metal grupları içerir. Şu anda, bu reaksiyonu yapabilen üç enzim bilinmektedir, bunlar nitrojenaz, Fe-hidrojenaz ve NiFe-hidrojenaz [7]. Nitrojenaz, N_2 -fiksasyonunun yan ürünü olarak H_2 üretir. Arzu edilen yönde N_2 fiksasyonu reaksiyonunda nitrojenazın ürettiği H_2 hücrenin dışına difüze olur. Hidrojenaz ise biyolojik hidrojen üretim proseslerinde kullanılmakta olan ana enzimdir [3].

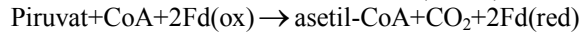
Karanlık fermentasyon anoksik (yani elektron alıcısı olarak oksijenin mevcut olmadığı şartlar) ve anaerobik şartlar altında meydana gelen bir olaydır. Bakteri organik substrat üzerinde büyürken, bu substratlar büyüme için yapı taşlarını oluşturmak ve metabolik enerjiyi sağlamak için oksidasyon ile parçalanırlar. Oksidasyon adımı elektronlar üretir, bu elektronların ise elektriksel nötralinitenin korunması için bertaraf edilmesine ihtiyaç vardır. Oksik ortamlarda, oksijen indirgenir ve su oluşur. Anoksik ortamlarda, diğer bileşikler, örneğin protonlar, elektron alıcısı olarak hizmet ederler ve moleküler hidrojene (H_2) indirgenirler. Model bileşik olarak glukoz alındığı zaman, glukoz önce hidrojen üreten bakteri tarafından piruvata dönüşür. Piruvat iki enzim sisteminin katalizlenmesi ile parçalanır. Bunlar:

1-Piruvat: format lyaz (PFL)

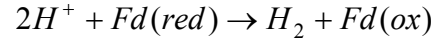


(2)

2-Piruvat: ferredoksin oksido redüktaz (PFOR)



(3)



(4)

Piruvat asetilkoenzim A (asetil-CoA), karbon dioksit ve hidrojene dönüşür. Piruvat ayrıca asetil-CoA ve formata da dönüşebilir, ki bunlar kolaylıkla hidrojen ve karbon dioksit parçalanabilir. Bu yolizinde, elektronların bir kısmı H_2 üretmek için protonlara transfer olur, diğer kısmı NADH_2 üretmek için NAD^+ ye transfer olur. NADH_2 daha sonra hidrojenaz içeren ikinci yolizde H_2 üretmek için kullanılır, hidrojenazda elektronlar ferredoksin (Fd) sonra H^+ ya transfer olacaktır. Asetil-CoA en son olarak asetat, bütirat, etanol vs. gibi bazı metabolitlere dönüşür [5, 7, 8].

Karbonhidrat içeren çeşitli atıktan anaerobik fermentasyon ile hidrojen üretimi son yıllarda dikkat çeken bir gelişme olmuştur. Karbonhidrat fermentasyonunda en önemli ürün H_2 ile birlikte asetik asit ve bütirik asitlerdir. Bu asidifikasyon prosesi olup, model bileşik olarak glukoz kullanıldığında gerçekleşecek reaksiyonlar 5 ve 6'da verilmiştir.

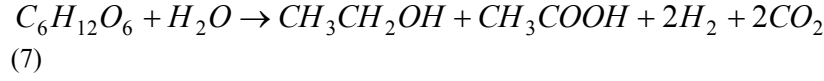


(5)



(6)

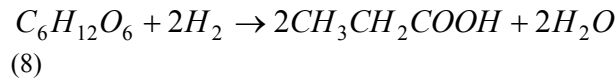
Stokiyometrik verim, üretilen uçucu yağ asitleri (VFA) tek asetik asit olduğu zaman ve elektronlar büyüme için kullanılmadığı zaman 1 mol glukoz için 4 mol H_2 (25 °C de 544mL H_2 /g heksos veya hidrojen verimliliği %33), bütirik asit üretiminde 2 mol H_2 (25 °C de 277 mL H_2 /g heksos veya hidrojen verimliliği %17) dir. Asetik asite ilaveten etanol de üretilebilir (reaksiyon 7).



Stokiyometrik verim, 1 mol glukoz için 2 mol H_2 dir. Sadece etanol üretimi olması durumunda hidrojen üretimi olmaz bir başka deyişle hidrojen verimliliği %0 olur. Bu yüzden VFA'nın üretimi alkole, asetat bütirata karşı tercih edilir [9].

Proseste gerçek H_2 verimi aşağıda verilen sebeplerden dolayı düşük olabilir [6].

- 1-Glukoz, hidrojen üretmeden diğer yollarla parçalanabilir,
- 2-Glukozun bir kısmı biokütle oluşumu için kullanılabilir,
- 3-Stokiyometrik verim denge şartlarında elde edilir,
- 4-Üretilen H_2 , diğer yan ürünlerin üretilmesinde kullanılabilir (reaksiyon 8 gibi).



2.1 Fermentatif Hidrojen Üretimini Etkileyen Faktörler

Bioprosesi etkileyen bazı parametrelerin (organizmanın tipi, pH, substrat yüklemesi (organik yükleme hızı), reaktör tipi/büyüme şartları (kesikli, arızalı kesikli, sürekli), substratın tipi (saf karbonhidrat, çeşitli atıklar)) optimize edilmesi ile hidrojen üretim verimi en yüksek seviyesine ulaşabilir.

- Saf ve karışık kültür: Belirli substratlar üzerinde büyüyen saf kültürler, sınırlayıcı faktörlerin etkisini ve genetik yönünü incelemek için uygundur, oysa karışık kültürler kompleks substratların fermentasyonu için çok uygundur. Saf kültürler ile fermentasyonun seyri (ve ürünler) organizmanın seçimi ile kontrol edilebilir, fakat karışık kültürde, metabolik yolizi bioproses parametreleri ile istenen doğrultuya yönlendirilir [10].
- pH: pH kontrolü, organik asit oluşumundan dolayı kuvvetli asidifikasyon ile fermentasyon hızının belirlenmesinde önemli bir parametredir. pH hem ürün dağılımını hem de hücre canlılığını etkiler [10]. pH, hidrojenaz aktivitesini de etkileyebilir [5]. Hidrojen üretim verimini, biyogaz içeriğini, üretilen organik asit tipini ve spesifik hidrojen üretim hızını etkiler. Maksimum hidrojen verimi veya spesifik hidrojen üretim hızı için açıklanan pH aralığı 5-6'dır. Ancak bazı araştırmacılar optimum pH aralığını 6,8-8 olarak açıklamışlardır. Anaerobik hidrojen üretiminde final pH 4-4,8 arasındadır. pH'daki bu azalma hidrojen üretimini inhibe eder [1].
- Organik yükleme hızı: Yüksek substrat derişimleri işletim açısından tercih edilecektir. Çünkü yüksek substrat derişimleri, yüksek hacimsel hidrojen üretim hızına sebep olur [10].
- Reaktör tipi: Konvansiyonel sürekli tam karışimli tank reaktöründe (CSTR) biokütle, hidrolik alıkonma süresi (HRT) ile aynı alıkonma süresine sahip olduğu için biokütlenin reaktör dışına ykanması çok kısa HRT'de meydana gelebilir. Ayrıca karışık sıvıdaki biokütle derişimi ve hidrojen üretimi sınırlanır. Tutuklanmış-hücreli reaktörler, bu tip reaktörlere bir alternatiftir. HRT'nın artışı hidrojen üreticilerinin yeteneğini artırır, ancak çok yüksek seviyelerde azalır [5]. İşletim kolaylığı açısından CSTR'ler maksimum karışım ve homojenite sağladığı için model çalışmalarda kullanmak faydalıdır. Ancak pratikte sabit yatak veya granüler tipli reaktörlerin bazı çeşitleri daha iyi adapte olduğu görülmüş. Çünkü bunlar çok yüksek hücre yoğunluğuna sahip olup reaktörlerin bakteri büyüme hızından bağımsız HRT'lerde çalışmasına olanak vermektedir. Böylece bu tip reaktörler ile çok yüksek hacimsel üretim hızları elde edilebilir, çoğunlukla CSTR reaktörlerde elde edilenin 10 katı veya daha fazlasıdır [10].
- Substrat tipi: Yüksek hidrojen verimi kolaylıkla parçalanabilen glukoz, sukroz gibi basit şekerlerin kullanımı ile elde edilebilir. Doğada bol miktarda bulunan ve hidrojen üretimi için karbonhidrat kaynağı olarak kullanılabilen nişasta içeren atıkların büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Aynı

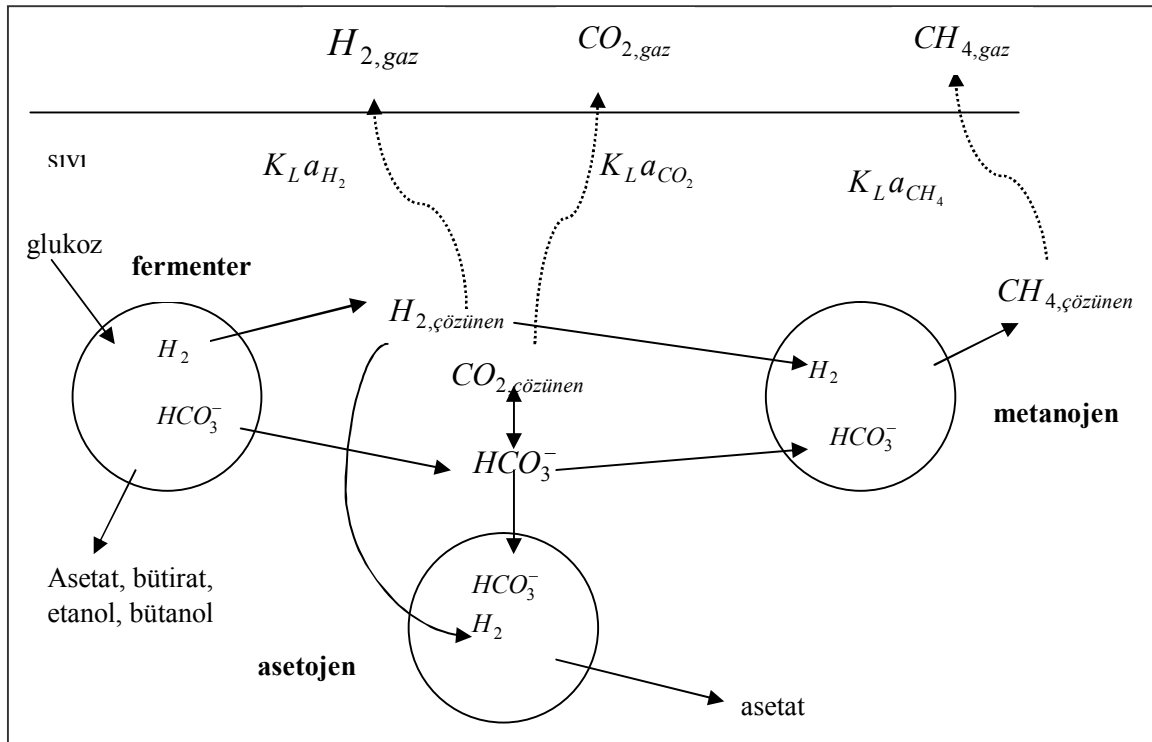
şekilde bitki biokütlesinin en önemli bileşimi olan ve tarımsal atıklarda yüksek derecede mevcut olan, kağıt ve gıda endüstrisi gibi endüstriyel çıktılarda bulunan selüloz da hidrojen üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini araştırmalar göstermiştir. Bunun dışında gıda endüstrisi atıkları ve atıksuları, arıtma çamurlarının da substrat olarak kullanımı söz konusudur [1]. Kompleks substratlar, kompleks yapılarından dolayı hidrojen üretimi için ideal değildir. Ancak bazı metotlar ile ön işlemden geçirildikten sonra hidrojen üreticiler tarafından kolaylıkla kullanılabilirler [5].

- Sıcaklık: Uygun aralıkta sıcaklık artışı hidrojen üreten bakterinin yeteneğini artırır. Fakat çok yüksek seviyelerdeki sıcaklık azaltır. Mezofilik aralık için optimum sıcaklık 37 °C, termofilik aralık için 55 °C'dır [5].

Yukarıda ifade edilen bioproses parametrelerinin optimizasyonu yanında önerilen bazı yaklaşımlar ile de hidrojen verimi artırılabilir. Bu yaklaşımlar rekabet edici reaksiyonların önlenmesi, sistemde H_2 kısmi basıncının azaltılması, termofilik türlerin kullanımı ve daha çok aktif hidrojenaz girdisinin sağlanmasıdır [10].

2. Hidrojen Üreticiler

Fermentatif hidrojen üretiminde, hidrojeni metabolize eden üç grup bakteri mevcuttur. H_2 üreticileri (fermenterler), H_2 – tüketen metanojenler ve H_2 tüketen asetojenler. Bu üç grup bakteri arasındaki ilişki Şekil 1’de gösterilmiştir. Yüksek H_2 üretim verimi elde etmek için, metanojenler ve asetojenler tarafından H_2 tüketiminin engellenmesi ve H_2 fermenterleri için şartların optimize edilmesi gerekir [9].



Şekil 1. Hidrojeni metabolize eden bakteriler arasındaki ilişki [9]

Daha önceki bölümde ifade edildiği gibi, fermentatif bakteriler ile hidrojen üretimi bakteride hidrojenaz aktivitesi ile aşırı elektronların bertarafını sağlayacak spesifik bir mekanizmadır. Bu yeteneğe sahip bakteri çok şiddetli anaerob (*Clostridia*, methylotrophs, rumen bakterisi, metanojenik bakteri, arke), fakültatif anaeroblar (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), hatta aeroblar (*Alcaligenes*, *Bacillus*) olabilir [6]. Fakültatif anaerobik bakteriler 1 mol glukoz başına 2 mol H_2 üretir, oysa kuvvetli anaerobik bakteriler 4 mol H_2 üretir. Fakültatif bakterilerin hidrojen üretim hızı, şiddetli anaerobik bakteriden daha düşüktür [8]. Fakültatif

anaeroblar oksijene karşı daha az hassastır. Herhangi bir sebeple oksijene maruz kalınması halinde, oksijen hızla tüketip hidrojen üretim aktivitesi eski haline dönebilir. Bu yönü ile fakültatif anaeroblar, fermentatif hidrojen üretim prosesinde kuvvetli anaeroblardan daha iyi mikroorganizmalar olduğu düşünülür [3].

Hidrojen üreten bakteriler arasında *Clostridium* ve *Enterobacter* türleri çok geniş ölçüde çalışılmıştır. Bu bakteri türleri kısa zaman içinde çok etkili hidrojen üretimi yapabilmektedirler. *Clostridium* türleri gram pozitif, çubuk şeklinde, şiddetli anaerob ve endospor oluşturmazlar. Bu endosporlar ısı veya asit ve baz içeren kimyasallara karşı çok dirençli olup kolayca parçalanmazlar [11]. *Enterobacter* ise gram negatif, çubuk şeklinde ve fakültatif anaerobdur [6]. *Clostridium* türleri için hidrojen verimi 2 mol H_2 /mol hekzos iken *Enterobacter* için bu değer 1 mol H_2 /mol hekzos dır [12].

3. Karışık Kültürde Hidrojen Üreticilerinin Zenginleştirilmesi

Mühendislik uygulamalarında atık arıtım işlemlerinde saf kültür yerine karışık kültür oldukça fazla kullanılmaktadır. Hidrojen üretiminde farklı kaynaklar (toprak [13], sediment, hayvansal gübre [14], kompost [15,16], aerobik [17] ve anaerobik çamurlar [18,19]) aşı olarak kullanılabilir. Anaerobik çamur, kentsel atıksu arıtma çamuru, kompost ve topraktan elde edilen karışık bakteri kültürünün, fermentatif hidrojen üretiminde aşı

olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Kesikli sistemde, pH 5-7 aralığında, model bileşik olarak glukozun kullanıldığı farklı aşı kaynakları ile yapılan bazı çalışmalarda hidrojen üretim verimleri Tablo 1’de verilmiştir. Hidrojen verimleri, kullanılan aşı kültürüne olduğu kadar substrata, reaktör tipine, proses şartlarına (pH, sıcaklık, nütrient ihtiyacı, alıkonma süresi gibi) da bağlı olarak değişir [5, 6].

Tablo 1. Farklı doğal karışık kültürün aşı kaynağı olarak hidrojen üretim performansları

Aşı çamuru	Sıcaklık (°C)	H_2 verimi mL/g hekzos*	Kaynaklar
Kanalizasyon çamuru	35	114	[11]
Toprak	26	125	[20]
Anaerobik çürütülmüş çamur	25	132	[21]
Kompost	50,60	286	[22]

* Elde edilen veriler 25 °C sıcaklığa göre düzeltilmiştir.

Karışık kültür kullanılmasının daha önce ifade edilen avantajlarına karşın üretilen hidrojenin, diğer hidrojen tüketen bakteriler ile kolaylıkla tüketilmesi bir dezavantaj oluşturur [5]. Hidrojen ara ürün olarak üretilir ve hidrojen tüketen bakteriler ile metan, asetat ve propiyonata dönüşebilir [23]. Karışık kültürün kullanıldığı sistemlerde hidrojen tüketen bakterinin aktivitesini kesmek için, aşı çamurunun ön işlem görmesine ihtiyaç vardır [24]. Ön arıtım işlemlerinde amaç hidrojen üreten bakterinin aktivitesini korumaktır. En iyi gösterge, en yüksek hidrojen verimidir [5]. Ön arıtım, hidrojen üreten *Clostridium*’ın spor oluşturma özelliğine güvenilerek uygulanmaktadır. Bakteriyel endosporlar kompleks çok tabakalı yapıya sahip olup, bitki hücrelerinden yapısal olarak farklıdır. Isı, kurutma, radyasyon, asitler ve kimyasal dezenfektanlara karşı çok dirençlidir. Çok sert kimyasallar ile dahi kolaylıkla parçalanmazlar. Hidrojen tüketicilerinin bir kısmı spor oluşturmayan bakterilerdir. Sert ön arıtım şartlarında anaerobik çamurda, *Clostridium*, spor oluşturmamayan bakterilerden daha yüksek oranda aktivitesini yitirmeden kalabilmektedir.

Hidrojen üreticilerinin zenginleştirilmesi amacıyla uygulanan ön arıtım işlemleri aşağıdaki bölümlerde detaylı olarak açıklanmıştır.

4.1. Isı Ön Arıtımı

Karışık kültürden hidrojen üreticilerinin zenginleştirilmesinde uygulanan en genel yöntem ısı ön arıtımıdır. Buhar kullanımı ile kolay ve ucuz olarak yapılabilir. Isı ile ön arıtım çalışmaları, genel olarak aşı kültürünün 75-121 °C aralığındaki sıcaklıklarda 15 dakika- 2 saat alıkonma sürelerinde işlem görmesi ile yapılmıştır. Isı ön arıtım metanojenleri öldürmek için uygulanan metottur, geride *Clostridium*, *Bacillus* ve *Thermoanaerobacterium* gibi spor oluşturabilen bakteriler kalır. Bununla birlikte ısı ön arıtım uygulaması, sadece hidrojen üreten mikroorganizmaların seçilmesinde etkili değildir, çünkü laktik veya propiyonik asit üreticileri gibi birkaç hidrojen tüketen bakterinin de canlılığı korunacaktır [25]. Örneğin bazı homoasetonojenik bakteri (H_2 ve CO_2

kullanarak asetik asit üreten bakteriler) ısı arıtımından etkilenmeden canlılığını koruyabilir ve asetatın üretimi için hidrojen tüketimini sağlar, bu ise sistemde hidrojen üretim verimini azaltır [6,26,27]. Amaç esasen metanojenlerin önlenmesi olduğu için, ısı ön arıtımı ile H_2 üreten bakteri özel olarak seçilemez. Bu, H_2 üreticilerinin karakteristiğinin direkt olarak endospor formuna dönüşebilme yeteneği ile bağlantılı olmadığından dolaydır. Örneğin *Enterobacter* spp. ve *Citrobacter* spp. gibi enterik bakteriler spor oluşturmeyen hidrojen üreticilerdir. Ayrıca bazı H_2 tüketen bakteri grupları vardır ki bunlar spor formunda olabilir. Bu yüzden ısı ön arıtımından sonra canlılıklarını korurlar (asetojenler, belli propiyonat ve laktat üreticileri, sülfat indirgeyicileri ve denitrifiye edici bakteriyi gibi). Isı ön arıtımından sonra mikrobiyal topluluk nispeten homojen hal alır, oysa ısı ön arıtım uygulanmayan aşımın kullanıldığı reaktörde mikrobiyal çeşitlilik çok yüksektir [9, 28,29].

Isı ön arıtım ile aşımın zenginleştirilmesinde termal enerji tüketilir. Bu yüzden enerji tasarrufu göz önünde bulundurulmalıdır. Karışık kültürden hidrojen üretimi için 104 °C gibi yüksek sıcaklıkların yanında 75-85 °C gibi düşük sıcaklıkların uygulandığı çalışmalar da mevcuttur. Bağhchehsaraee ve diğ., (2008) tarafından yapılan çalışmada aktif çamur ve anaerobik çamur üzerine farklı sıcaklıklarda (30 dakika 65, 80 ve 95°C) yapılan ısı arıtımının etkisi incelenmiştir [30]. Elde edilen deney sonuçları 65°C'de en yüksek hidrojen verimi ve hidrojen üretim hızı elde edildiğini göstermiştir (aktif çamurda 1,6 mol H_2 /mol glukoz ve 19,3 mL/saat; anaerobik çamurda 2,3 mol H_2 /mol glukoz ve 26,3 mL/saat). Yüksek sıcaklıktaki ön arıtım ile düşük hidrojen üretim verimi ve hızı ile birlikte yüksek bütirat/asetat oranı elde edilmiştir. Sıcaklık yüksek olduğu zaman yüksek oranda laktik asit oluşumu gözlenmiştir. Mikrobiyal topluluk analizleri ise ön arıtım sıcaklıklarındaki artış ile tür çeşitliliğinin azaldığını göstermiştir.

Lin ve diğ., (2008) ve Nicolau ve diğ., (2008), ısı ile artırılmış mezofilik anaerobik çamurun, saf mikrobiyal kültürden daha iyi aşı olarak kullanıldığını açıklamışlardır [31,32]. Argun ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada saf ve karışık formda farklı anaerobik kültürlerin hidrojen oluşumu incelenmiştir [33]. *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes* ve ısı ile artırılmış anaerobik çamur ve onların karışımı test edilmiştir. Çalışmada ısı ile artırılmış anaerobik çamurdan en yüksek hidrojen verimi (1,14 mol H_2 /mol glukoz) elde edildiği, *Enterobacter aerogenes* (1,04 mol H_2 /mol glukoz) ise bunu takip ettiği saptanmıştır. Spesifik hidrojen üretim hızı ise *Clostridium acetobutylicum*'da (34,2 mL H_2 / g hücre.saat), ısı ile artırılmış anaerobik çamurda (32,1 mL H_2 / g hücre. saat) ve karışık formda anaerobik kültürde (28,8 mL H_2 / g hücre.saat) elde edilmiştir. Isı ile artırılmış asidojenik anaerobik çamurun kullanımı saf kültüre kıyasla çok avantaj sağladığı ortaya çıkmıştır.

4.2. Asit/Baz Arıtımı

Klasik metanojenik proseslerde pH yaklaşık 7'de kontrol edilir. 6,3'ün altındaki veya 7,8'in üstündeki pH'da metan üretimi hızla düşer. Bu yüzden, anaerobik çamur pH'nın 7'den önemli ölçüde sapsması metanojenlerin (bunların bir kısmı hidrojen tüketicidir) bioaktivitesini etkili bir şekilde inhibe eder [6, 11].

Asit ve baz ön arıtım ile zenginleştirilmiş çamurun hidrojen üretim hızı, hem zenginleştirme adımındaki hem de fermentasyon adımındaki pH'na bağlıdır. Anaerobik mikrobiyal sistemlerde bakteri büyümesi ve dönüşüm proseslerinin optimum şartlarda korunması için pH kontrolü esastır. Chen ve diğ., (2002) tarafından yapılan çalışmada anaerobik hidrojen üretim prosesini geliştirmek için karışık kültürün asit-baz ile zenginleştirilmesinin etkisi incelenmiştir [11]. Asit ve baz ile zenginleştirilmiş çamurun en yüksek üretim hızı, pH 3'de zenginleştirilmiş ve pH 7'de fermentasyona alınmış çamurda 1,6 mL/ g uçucu katı. saat olarak, pH 10-12 de zenginleştirilmiş ve pH 6'da fermentasyona alınmış çamurda ise 0,73-0,75 mL/g uçucu katı. saat olarak elde edilmiştir. Verilerin kinetik analizinde hidrojen üretim potansiyeli pH 10 ve 3'de kontrol ile kıyaslandığında 200 ve 300 kat arttığı saptanmıştır. Benzer bir çalışma Cai ve diğ., (2004) tarafından yapılarak arıtma çamuruna alkali ön arıtım uygulamasından sonra hidrojen üretim performansı karşılaştırılmıştır [34]. Ham çamurdaki hidrojen verimi, alkali ön arıtım ile 9,1 den 16,6 mL H_2 /g kuru katı'ya yükseldiği belirlenmiştir.

Asit zenginleştirme hidrojen üretimini artırırken kullanılan asit, tuz inhibisyonu yaratması sebebi ile de prosesi etkilemektedir. Lee ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada, hidrojen üreten bakteri üzerine farklı asitler ile yapılan ön arıtımın etkisi incelenmiştir [23]. Zenginleştirme işlemi için HCl, HNO₃ ve H₂SO₄ kuvvetli asitleri kullanılmıştır. Deneysel sonuçlara göre en uygun asit, HCl bulunmuştur. Karışık kültürün pH 2'de ön arıtımının

yapılması ile üretilen hidrojen hacmi 3,2 kat artmıştır. HNO_3 ön arıtım basamağında kullanıldığında H_2 üretimi ciddi biçimde inhibe olduğu gözlenmiştir. Reaktörde nitrat derişimi ortalama olarak 4300 mg/L seviyesine çıkmıştır. Oysa literatürde hidrojen üreten bakteriye inhibitör olan derişim 1200 mg/ L olarak açıklanmıştır. HNO_3 ile yapılan ön arıtım nitrat değerini 3,5 kat artırmıştır. Sülfat için benzer durum H_2SO_4 ile yapılan ön arıtımda da görülmüştür.

4.3. Metanojen İnhibitörleri

Metanojenler çok şiddetli anaeroblardır ve bazı kimyasallara karşı çok hassastır. Bu yüzden hidrojen tüketen metanojenlerin aktivitesi basit havalandırma ile veya toksik kimyasalların ilavesi ile inhibe olabilir. Metanojenlerin inhibisyonu için kullanılan en genel inhibitörler BES veya BESA (2-Brometansulfonik asit veya sodyum 2-Brometansulfonat $\text{C}_2\text{H}_4\text{BrO}_3\text{SNa}$), iodpropan, asetilen ve kloroformdur [6]. Hava (oksijen) varlığında birçok metanojen varlığını sürdüremez. Metanojenler zorunlu anaerobik arke bakteriler olduğu için aerobik ortama maruz kaldıkları zaman, oksijen adenilat yüklerini düşürür ve ölümlerine sebep olur [35]. BESA ve iodpropan gibi inhibe edici kimyasallar metanojenleri elimine etmede geniş ölçüde kullanılmıştır. BES veya BESA co-enzim-M'nin struktural analogudur. Co-enzim-M spesifik olarak metanojenlerde bulunur, diğer mikrobiyal türlerde bulunmaz. Yüksek seviyede BES, 50 mM'a kadar, karışık kültür ve doğal ortamlardan metanojenlerin inhibisyonu için kullanılabilir. Ancak büyük miktarlardaki çamura uygulanması ekonomik olmayacaktır [6]. Iodpropan, B_{12} enziminin fonksiyonunu engelleyen bir corrinoid düşmanıdır [35]. Düşük derişimlerdeki asetilen (%0,5) saf kültür ve doğal örneklerde metanojenik bakterinin güçlü inhibitörüdür, fakat diğer anaerobların da asetilen inhibisyonu açıklanmıştır. Kloroform hem H_2/CO_2 hem de asetattan CH_4 üretimini inhibe eder. Çok düşük derişimdeki CHCl_3 (100 μM) metanojenlere kuvvetli inhibisyon gösterdiği açıklanmıştır. Literatürde kloroform buharının büyük miktarda toprak mikrobiyal popülasyonunu öldürdüğü de ifade edilmektedir [36,37].

Sparling ve diğ., (1997) tarafından yapılan çalışmada lignoselülozik atıktan hidrojen üretiminde hava, asetilen ve BES metanojen inhibitörlerinin etkinliği karşılaştırılmıştır [37]. Yapılan çalışmada inhibitörler reaktöre direkt uygulanmıştır. *Clostridium thermocellum* saf kültürü ve anaerobik çürütücüden elde edilen karışık kültür aşısı olarak kullanılmıştır. İki aşının kullanıldığı kompostlama ünitesinde hidrojen gelişimini inhibe etmeksizin metanojenik aktivitenin inhibe edilmesinde asetilenin BES kadar etkili olduğu saptanmıştır. Hava, saf kültürü inhibe etmiş ancak karışık kültürü inhibe etmediği gözlenmiştir.

Danko ve diğ., (2008) tarafından yapılan çalışmada metanojenik aktiviteyi inhibe etmek için iki farklı metot (30 dakika otoklav şartlarında ısı ön işlem ve 25 mM derişiminde BES ilavesi) uygulanmıştır [38]. Elde edilen sonuçlar, BES ile inhibe olmuş çamurun ısı ön işlem görmüş çamurdan daha düşük lag süresinde (aşılama ile gaz üretiminin başlamasına kadar geçen süre) ve daha yüksek hızlarda hidrojen ürettiğini göstermiştir.

4.4. Elektrik Akımı

Hidrojen üreten bakteriler, elektrik akımı ile anaerobik çamurdan elenebilir. Düşük voltajlı (3-4.5 V) elektrik akımından sonra, metan üretimi olmaksızın hidrojen üretiminin olduğu gözlenmiştir [6].

4. Ön Arıtım Basamaklarının Karşılaştırılması

Hidrojen üreten aşının hazırlanması genel olarak kaynak bakteri içeren materyalin seçimi, hidrojen üreten bakterinin zenginleştirilmesi ve spesifik substrata bakterinin alıştırılması adımlarından oluşur. Zenginleştirme adımı için Bölüm 4'de ifade edilen çeşitli ön arıtım teknikleri uygulanmaktadır. Ön arıtım tekniklerinin hidrojen üretim verimliliğine olan etkisinin araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Tablo 2'de bu çalışmaların bazıları özetlenmiştir. Tablodan görüldüğü gibi, karışık kültürden hidrojen üreten bakteriye zenginleştirilecek optimal ön arıtım metotları üzerine belirli çelişkiler vardır. Bu çelişkilerin olası sebebi, bu çalışmalar arasındaki farklılıklardır (karışık kültürün tipi, substratın çeşidi ve her bir ön arıtım metodunun işletme şartları) [5].

5. Sonuç

Karanlık fermentatif hidrojen üretimi üzerine yoğun çalışmaların olmasına rağmen, henüz mevcut bir ticari sistem yoktur. Büyük ölçekli biyolojik hidrojen üretim tesisinin olmamasının sebeplerinden biri doğal kaynaklardan büyük miktarda aktif ve stabil aşının hazırlanmasındaki güçlüklerdir. Hidrojen üretimini geliştirmek için karışık kültür metanojenlerin, homoasetojenlerin ve sülfat indirgeyen bakterilerin eliminasyonu

ile zenginleştirilmelidir. Zenginleştirme metodu önemlidir çünkü hidrojen üretim birimlerinin devreye alınmasını, verimliliğini ve sürekli hidrojen üretim sisteminin stabilitesini etkilemektedir [30]. Büyük ölçekli uygulamalarda proses bozulduğunda kısa sürede geri dönüşümünün yapılabilmesi için büyük miktarda kolaylıkla elde edilebilir aşırıya ihtiyaç duyulur [35].

Karışık kültürün hidrojen üreticilerince zenginleştirilmesi amacı ile uygulanan ön arıtım işlemleri işletim giderlerini artırmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan karışık kültürün tipine ve reaktör şartlarına göre hidrojen üretim verimi üzerine pozitif yönde etki yaptığı saptanmıştır.

Biyolojik hidrojen üretiminin artırılmasında ısı ön arıtımı, pH kontrolünden çok daha etkili olduğu açıklanmıştır. Isı ön arıtımı asetojenleri elimine etmekte, ancak spor oluşturan bakterilerin olması durumunda, özellikle bazı homoasetojenik bakteriler, etkisiz olduğu görülmüştür [36].

Isı ve kimyasal ön arıtım metotları hidrojen üretimindeki yüksek verimlilikten dolayı geniş ölçüde kullanılırlar, fakat bu metotların bioreaktörlerin ölçek büyütme aşamasında uygulanabilir olmadığı görülmüştür. Bu yüzden asit ön arıtım işlemleri daha etkili bir metot olarak önerilmektedir [22].

Karışık kültüre ön arıtım uygulamaksızın gerçekleşen anaerobik arıtım sistemlerinde de H_2 üretimi söz konusudur, çünkü H_2 , anaerobik parçalanmanın yan ürünüdür. Gomez ve diğ., (2009) tarafından mezbaha atıklarının çürütüldüğü laboratuvar ölçekli ünitelerden alınan (WI) ve kentsel atıksu arıtım ünitesi çamur çürütücüsünden alınan (HI) iki farklı çamurun spesifik hidrojen üretimi incelenmiştir [40]. Her iki çamur için elde edilen hidrojen üretimlerinin birbirine benzer olduğu (WI için $27,8 \pm 8,4$, HI için $28,3 \pm 4,5$ mL/ g).

Hidrojen üretiminin artırılmasında karışık kültüre uygulanan biyolojik zenginleştirme yönteminin de etkili olduğu saptanmıştır. Lin and Hung (2008) tarafından yapılan çalışmada inek gübresinin hidrojen/etanol üretimi

üzerine çeşitli ön arıtım işlemlerinin etkisi incelenmiştir [41]. Yapılan çalışmada üç tip aşı çamuru kullanılmıştır. Bunlar ısı ile arıtılmış (100°C de 45 dakika ısı ile işlem), hiçbir ön işlem uygulanmamış çamur ve 4 gün 55°C 'de bioreaktörde zenginleştirilmiş kültür. Elde edilen deney sonuçlarından zenginleştirilmiş kültürün hidrojen veriminin diğer iki ön arıtım uygulanmış çamurdan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Zenginleştirilmiş kültürün ksilozdan hidrojen üretimi, ısı ön arıtılmış kültürle kıyaslandığında en az 15 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Zenginleştirme işlemi ile hidrojen/etanol oranını $8/4,8$ den $15,6/2,4$ 'e arttığı belirlenmiştir.

Karanlık fermentasyon, pratik biohidrojen üretim sistemi olarak gelişimi için büyük potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Fermentatif hidrojen üretimi için karışık anaerobik mikroflora aşı olarak çok iyi bir şekilde kullanılmıştır. Çünkü bu çamurlar hidrojen üreten mikroorganizmalar içermektedir. Doğal karışık kültürlerden hidrojen üreticilerinin zenginleştirilmesi için ekonomik açıdan uygun metodun belirlenmesi, tam ölçekli hidrojen üretim tesislerinin yaygınlaşmasına katkı sağlayacaktır.

Aşısı	Ön arıtım teknikleri	Hidrojen verimi	Lag süresi	Değerlendirme	Kaynak
Anaerobik kültür	Asit ön arıtım (P): 24 saat, ortofosforik asit ile pH 5'de işlem görmüş; kimyasal ön arıtım (C): 24 saat, 0,2 g/l BESA 2-brometan sulfonik asit sodyum tuz çözeltisi ile işlem görmüş; ısı-şok ön arıtım (H): 1 saat, 100°C de işlem görmüş. Ayrıca olası ön arıtım kombinasyonlarının (PC, PH, HC ve PHC) etkisi de araştırılmıştır.	C(17,6)>PC(16,1)>PH(11,5)>H(6,77)>P HC(6)>HC(4,66)>P(4,38)>Kontrol (0) (parantez içindeki değerler kontrole göre elde edilen hidrojen üretiminin (mmol H_2 /g KOİ olarak katlarını göstermektedir)	-	Tüm ön arıtım metotlarının H_2 üretim hızı ve substrat giderim verimliliği üzerine kontrol denemesine kıyasla pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir	[2]
Anaerobik kültür	Isı şok ön arıtımı: 20 dakika çamurun kaynatılması ile; asit ön arıtım: 30 dakika 1N HCl ile çamur pH 3'e getirilmesi ile; baz ön arıtım: 30 dakika 2N NaOH ile çamur pH'nın 10^3 'a getirilmesi ile; havalandırma arıtımı: 30 dakika hava ile çamurun havalandırılması ile; BESA ve iodpropan arıtım: 30 dakika 10 mmol derişiminde uygulanması ile yürütülmüştür.	Hidrojen verimi ısı-şok ön arıtımı için 3,18; baz ön arıtımı için 6,12, havalandırma ön arıtımı için 3,72, BESA ön arıtımı için 3,64, iodpropan ön arıtımı için 2,41 mol/mol sukroz olarak elde edilmiştir. Asit ön arıtılmış aşıda hidrojen üretimi ihmal edilebilir seviyede bulunmuştur. Hiçbir ön işlem görmemiş aşıda ise 4,56 mol/mol sukroz elde edilmiştir.	İodpropan ile ön işlem görmüş çamur ve hiçbir ön işlem görmemiş çamurda lag safhası sırası ile 10-17 saat olarak belirlenmiştir.	Baz ön arıtım işlemi hidrojen verimini önemli ölçüde arttırmıştır.	[35]
İkincil çökeltme çamur	Isı şok: 121°C'da 20 dakika sterilizasyon; asit ön arıtım: 1N HCl ile 24 saat pH 3'de tutulmuş, daha sonra 1N NaOH ile pH 6,8'e ayarlanmıştır; alkali ön arıtım: 1N NaOH ile 24 saat pH 11'de tutulmuş, daha sonra 1N HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır; havalandırma ön arıtım: çamurun çözünmüş oksijeni <0,5 mg/L olacak şekilde havalandırılmıştır, daha sonra 12 saat glukoz ile beslendikten sonra çökelttilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır, bu metot ile anoksik karışık kültür elde edilmiştir.	Havalandırma (224,5 ml)>ısı-şok (189,5 ml)>kontrol (180,4 ml)>alkali (134,1 ml)>asit (51,9 ml).	Alkali (14 saat)>asit (13 saat)>ısı-şok(11 saat) >kontrol(3 saat)>havalandırma(2 saat).	Havalandırma en yüksek mikrobiyal çeşitliliği sağlamıştır. Bu yöntemin en önemli avantajı spor oluşturmeyen bakteriyi öldürmeden hidrojen üreten bakteriyi zenginleştirilmesi ve oksidasyon-redüksiyon potansiyeli artışı ile metanojenleri öldürmesidir. Ayrıca elde edilen aşı, kompleks mikrobiyal topluluğa sahip olduğu görülmüştür.	[39]
anaerobik çamur (S), metanojenik	Asit ön arıtımı: 24 saatte de çamur pH'nın 3'e getirilmesi, daha sonra ise 7'ye ayarlanması ile; ısı ön arıtımı: 10-30 dakikada kaynayan su banyosunda çamurun ısıtılması ile daha sonra soğutulması ile; kloroform ön arıtımı ise glukozlu kültür ortamındaki çamura kloroform ilavesi ile sağlanmıştır	H_2 üretimi mL H_2 /g glukoz olarak, Asit ön arıtımı için: S için 125'den 89'a; den 0.00'a düşmüş, Isı ön arıtımı için (30 in 125 den 134'e ; G için 0,42'den 118.2'e loroform ön arıtımı: S için %0,1 125 den 145'e; G için %0,05 derişiminde 0,09'e yükselmiştir		Kloroform ile yapılan ön işlem, test edilen üç metodun arasında en etkili olarak bulunmuştur.	[36]

Tablo 2. Karışık kültüre uygulanan ön arıtım metotlarının karşılaştırılması

Kaynaklar

- [1] İk. Kapdan, F. Kargi, "Bio-Hydrogen Production From Waste Materials", *Enzyme Microb Technol*, 38: 569-582, (2006)
- [2] Sv. Mohan, Vl. Babu, Pn. Sarma, "Effect Of Various Pretreatment Methods On Anaerobic Mixed Microflora To Enhance Biohydrogen Production Utilizing Dairy Wastewater As Substrate", *Bioresour Technol*, 99: 59-67, (2008)
- [3] D. Das, Tn. Veziroğlu, "Advances In Biological Hydrogen Production Processes", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 6046-6057, (2008)
- [4] D. Das, Tn. Veziroğlu, "Hydrogen Production By Biological Processes: A Survey Of Literature", *Int J Hydrogen Energy*, 26: 13-28, (2001)
- [5] J. Wang,, W. Wan, "Factors Influencing Fermentative Hydrogen Production: A Review", *Int J Hydrogen Energy*, 34: 799-811, (2009)
- [6] C. Li, Hhp. Fang, "Fermentative Hydrojen Production From Wastewater And Solid Wastes By Mixed Cultures", *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, 37: 1-39, (2007)
- [7] S. Manish, R. Banerjee, "Comparison Of Biohydrogen Production Processes", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 279-286, (2008)
- [8] Ml. Chong,, V. Sabaratnam, Y. Shirai, Ma. Hassan, "Biohydrogen Production From Biomass And Industrial Wastes By Dark Fermentation", *Int J Hydrogen Energy*, 34: 3277-3287, (2009)
- [9] Jt. Kraemer, Dm. Bagley, "Improving The Yield From Fermentative Hydrogen Production", *Biotechnol Lett*, 29: 685-695, (2007)
- [10] Pc. Hallenbeck, "Fermentative Hydrogen Production: Principles, Progress And Prognosis", *Int J Hydrogen Energy*, Doi: 10.1016/J.Ijhydene.2008,12.080, (2009)
- [11] Cc. Chen, Cy. Lin, Mc. Lin, "Acid-Base Enrichment Enhances Anaerobic Hydrogen Production Process", *Appl Microbiol Biotechnol*, 5:, 224-228, (2002)
- [12] S. Patra, S. Sangyoka, M. Boonmee, A. Reungsang, "Bio-Hydrogen Production From The Fermentation Of Sugarcane Bagasse Hydrolysate By *Clostridium Butyricum*", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 5256-5265, (2008)
- [13] P. Iyer, Ma. Bruns, H. Zhang,, Sv.Ginkel, Be, Logan, "H₂-Producing Bacterial Communities From A Heat-Treated Soil Inoculum", *Appl Microbiol Biotechnol*, 66: 166-173, (2004)
- [14] Dy. Cheong, Cl. Hansen, "Bacterial Stres Enrichment Enhances Anaerobic Hydrogen Production In Cattle Manure Sludge", *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 635-643, (2006)
- [15] Y. Ueno, S,Haruta, , M. Ishiii , Y.Garashi, "Microbial Community In Anaerobic Hydrogen-Producing Microflora Enriched From Sludge Compost", *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 555-562, (2001)
- [16] B. Çallı, Lc.Chung,, D. Arslan, K. Vanbroekhoven, "H₂ Production In Thermophilic Mixed Fermentation", *Journal Of Environmental Science And Health Part A*, 44: 78-86, (2009)
- [17] Mf. Arooj, Han, Kim, Sh, Kim Dh, Hs. Shin, "Continuous Biohydrogen Production In A Cstr Using Starch As A Substrate", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 3289-3294, (2008)
- [18] H. Argun, F. Kargi, İk. Kapdan, R. Öztekin, "Biohydrojen Production By Dark Fermentation Of Wheat Powder Solution Effects Of C/N And C/P Ration On Hydrogen Yield And Formation Rate", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 1813-1819, (2008)
- [19] J. Wang, W. Wan, "Experimental Design Methods For Fermentative Hydrogen Production: A Review", *Int J Hydrogen Energy*, 34 (1): 235-244, (2008)
- [20] B.Logan, Oh, Se, Kim, Ik And Van Ginkel, Sw, "Biological Hydrogen Production Measured In Batch Anaerobic Respirometers", *Environ Sci Technol*, 36 (11): 2530-2535,(2002)
- [21] Oh, Se, Van Ginkel, Sw And Logan, Be, "The Relative Effectiveness Of Ph Control And Heat Treatment For Enhancing Biohydrogen Gas Production", *Environ Sci Technol*, 37 (22): 5186-5190, (2003)
- [22] M, Morimoto, M. Atsuko, Aay. Atif, Ma. Ngan, Fakhru'l-Razi, A, Iyuke, Se And Bakir, Am, "Biological Hydrogen Production Of Hydrogen From Glucose By Natural Anaerobic Microflora", *Int J Hydrogen Energy*, 29 (7): 709-713, (2004)
- [23] Mj Lee, Jh. Song, Sj. Hwang, "Effect Of Acid Pre-Treatment On Bio-Hydrogen Production And Microbial Communities During Dark Fermentation", *Bioresour Technol*, 100: 1491-1493, (2009)
- [24] Kb. Cantrell, Ducey, T, Ro, Ks, Hunt, Pg, "Livestock Waste-To-Bioenergy Generation Opportunities", *Bioresour Technol*, 99: 7941-7953, (2008)
- [25] Davila-Vazquez, G, Alatrisme-Mondragon, F, De Leon-Rodriguez, A, Razo-Flores, E, "Fermentative Hydrogen Production In Batch Experiments Using Lactose, Cheese Whey And Glucose: Influence Of Initial Substrate Concentration And Ph", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 4989-4997, (2008)

- [26] H. Argun, F. Kargi, İ. Kapdan, R. Öztekin, "Batch Dark Fermentation Of Powdered Wheat Starch To Hydrogen Gas: Effects Of The Initial Substrate And Biomass Concentrations", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 6109-6115, (2008)
- [27] Chen, Wh, Sung, S, Chen, Sy, "Biological Hydrogen Production In An Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Ph And Cyclic Duration Effects", *Int J Hydrogen Energy*, 34(1): 227-234, (2009)
- [28] B. Xie, Cheng, J, Zhou, J, Song, W, Cen, K, "Cogeneration Of Hydrogen And Methane From Glucose To Improve Energy Conversion Efficiency", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 5006-50011, (2008)
- [29] JI. Wang, W. Wan, "Comparison Of Different Pretreatment Methods For Enriching Hydrogen-Producing Cultures From Digested Sludge", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 2934-2941, (2008)
- [30] B. Baghchehsaraee, G. Nakhla, D. Karamanev, A. Margaritis, G. Reid, "The Effect Of Heat Pretreatment Temperature On Fermentative Hydrogen Production Using Mixed Cultures", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 4064-4073, (2008)
- [31] Cy. Lin, Cc. Chang, Ch. Hung, "Fermentative Hydrogen Production From Starch Using Natural Mixed Cultures", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 2445-2453, (2008)
- [32] Jm. Nicolau, R. Dinsdale, A. Guwy, "Hydrogen Production From Sewage Sludge Using Mixed Microflora Inoculum: Effect Of Ph And Enzymatic Pretreatment", *Bioresour Technol*, 99: 6325-6331, (2008)
- [33] Argun, H, Kargi, F, Kapdan, İ, "Microbial Culture Selection For Bio-Hydrogen Production From Waste Ground Wheat By Dark Fermentation", *Int J Hydrogen Energy*, 34: 2195-2200, (2009)
- [34] Ml. Cai, Jx. Liu, Ys. Wei, "Enhanced Biohydrogen Production From Sewage Sludge With Alkaline Pretreatment", *Environ Sci Technol*, 38(11): 3195-3202, (2004)
- [35] H. Zhu, M. Beland, "Evaluation Of Alternative Methods Of Preparing Hydrogen Producing Seeds From Digested Wastewater Sludge", *Int J Hydrogen Energy*, 31: 1980-1988, (2006)
- [36] B. Hu, S. Chen, "Pretreatment Of Methanogenic Granules For Immobilized Hydrogen Fermentation", *Int J Hydrogen Energy*, 32: 3266-3273, (2007)
- [37] R. Sparling, D. Risbey, Hm. Poggi-Varaldo, "Hydrogen Production From Inhibited Anaerobic Composters", *Int J Hydrogen Energy*, 22: 563-566, (1997)
- [38] As. Danko Pinheiro F, Abreu Aa, Mm. Alves "Effect Of Methanogenic Inhibitors, Inocula Type, And Temperature On Biohydrogen Production From Food Components", *Environmental Engineering And Management Journal*, 7: 531-536, (2008)
- [39] Nq. Ren, , Wq. Guo, Xj. Wang, Ws. Xiang, Bf. Liu, Xz. Wang, J. Ding, Zb. Chen, "Effect Of Different Pretreatment Methods On Fermentation Types And Dominant Bacteria For Hydrogen Production", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 4318-4324, (2008)
- [40] X. Gomez, Mj. Cuetos, Ji. Prieto, A, Moran, "Bio-Hydrogen Production From Waste Fermentation: Mixing And Static Conditions", *Renewable Energy*, 34: 970-975, (2009)
- [41] Cy. Lin, Wc. Hung, "Enhancement Of Fermentative Hydrogen/Ethanol Production From Cellulose Using Mixed Anaerobic Cultures", *Int J Hydrogen Energy*, 33: 3660-3667, (2008)