



BİYOLOJİK ARITIM SİSTEMLERİ İÇİN SOLUNUM TESTLERİ

Nevim GENÇ

Kocaeli Üniversitesi, Müh. Fak., Çevre Müh. Böl., İzmit, TÜRKİYE

ÖZET

Biyolojik sistemlerin izlenmesi ve kontrolünde solunum parametrelerinin (oksijen tüketim hızı (*OUR*), oksijen transfer hızı (*OTR*), karbon dioksit transfer hızı (*CTR*) ve solunum oranı (*RQ*)) önemli yeri vardır. Bu parametreler yardımı ile mikroorganizmaların fizyolojik durumu sayısal olarak ifade edilir. Bu, mikroorganizmalar tarafından tüketilen O_2 veya üretilen CO_2 'in belirlenmesi ile olur. Bu amaçla sıvıda çözülmüş oksijen azalması yada gaz fazında O_2 azalması ve CO_2 artışı belirlenir ve kütle dengesi yardımı ile solunum parametreleri hesaplanabilir. Bu yazıda O_2 azalması ve CO_2 artışının belirlenmesine dayalı solunum testleri açıklanmış ve biyokimyasal proseslerdeki uygulamalarına yer verilmiştir. Proses izlenmesi ve kontrolünde on-line gaz analizi ile belirlenen solunum parametrelerinin kullanımının avantajlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Solunum testleri, Oksijen tüketim hızı, Oksijen transfer hızı, Karbon dioksit transfer hızı, Solunum oranı.

RESPIROMETRIC TESTS FOR BIOLOGICAL TREATMENT SYSTEMS

ABSTRACT

In controlling and monitoring of the biological systems, the respirometric parameters (oxygen uptake transfer rate (*OUR*), oxygen transfer rate (*OTR*), karbon dioxide transfer rate (*CTR*) and respiration quotient (*RQ*)) reserve an important place. By means of these parameters, the physiological state of microorganisms is numerical expressed. This is obtained via measure of consumed O_2 or generated CO_2 by microorganisms. For this aim, dissolved oxygen decrease in liquid phase or O_2 decrease and CO_2 increase in gas phase are determined, and respirometric parameters are calculated by mass balance. In this paper, the respirometric tests based on determining of O_2 decrease and CO_2 increase and the application in biochemical process of tests were explained. It was shown that using of respirometric parameters determined by means of on-line gas analysis has advantage in controlling and monitoring of the biological systems.

Key words: Respirometric tests, Oxygen uptake transfer rate, Oxygen transfer rate, Karbon dioxide transfer rate, Respiration quotient.

1. GİRİŞ

Aerobik biyokimyasal proseslerin genel özelliği, biyokimyasal reaksiyonlar hakkında doğru ve güvenilir bilgi elde etme güçlüğüdür. Bu durum özellikle saf kültür yerine karışık mikrobiyal popülasyonlar yardımı ile kompleks substrat içeren atık arıtımının gerçekleştirildiği prosesler için geçerlidir. Ayrıca bu tip proseslerde işletme şartlarının değişken oluşu doğru bilgi almasını önler.

Gerek saf kültürün gerekse karışık mikrobiyal popülasyonun faaliyet gösterdiği biyolojik sistemlerde prosesin izlenmesi ve kontrolünde oksijen tüketim hızı (*OUR*), oksijen transfer hızı (*OTR*) karbon dioksit üretim hızı (*CER*), karbon dioksit transfer hızı (*CTR*), solunum oranı (*RQ*) gibi solunum parametreleri de kullanılmaktadır. Solunum testleri, aerobik bakterilerin en temel aktivitesi olan solunum sürecinde tüketilen oksijen veya üretilen karbon dioksitin ölçülmesi prensibine dayanır. Bu yazıda biyokimyasal proseslerde sıvı ve gaz fazında O_2 ve CO_2 derişiminde meydana gelen değişimin belirlenmesini temel alan solunum testleri anlatılmıştır. Ayrıca solunum testlerinin çeşitli biyokimyasal proseslere uyarlanmış şekli ile ilgili uygulamalara da yer verilmiştir.

2. SOLUNUM TESTLERİ

Solunum testleri biyokimyasal reaksiyonlar hakkında bilgi sağlamanın yanında proses işletmesini de düzelterek birtakım kontrol stratejileri ile de bağlantı kurar [1]. Solunum testleri ile aerobik kültürün fizyolojik durumu sayısal olarak ifade edilir. Testler sıvı ve gaz fazında gaz derişimde meydana gelen değişim yardımı ile belirlenebilmektedir.

2.1. Prosesin Sıvı Fazında Gaz Derişimde Meydana Gelen Değişime Dayalı Solunum Testleri

2.1.1. Çözünmüş Oksijen Derişiminin Belirlenmesine Dayalı Test

Birçok metabolik aktivite oksijen tüketimine bağlı olduğu için oksijen tüketim hızı (*OUR*) solunum parametreleri içinde en çok kullanılanıdır. Oksijen ölçümüne dayanan solunum testleri iki kriter dikkate alınarak sınıflandırılabilir [2]. Bunlar:

- 1) Oksijenin ölçüldüğü faz (gaz veya sıvı)
- 2) Gaz ve sıvı fazın akış rejimi (akışkan veya statik)

Pratik arıtım uygulamalarında solunum hızı, denklem 1’de ifade edilen sıvı faz üzerinde oksijen kütle denkliği kurularak hesaplanabilir.

$$\frac{dS_0}{dt} = \frac{Q_{in}}{V} (S_{0,in} - S_0) + K_L a_{O_2} (S_0^0 - S_0) - OUR \quad (1)$$

Burada S_0 sıvı fazda çözünmüş oksijen derişimini (mg/L), S_0^0 çözünmüş oksijenin doyunluk derişimini (mg/L), $S_{0,in}$ sisteme giren sıvıdaki çözünmüş oksijen derişimini (mg/L), *OUR* oksijen tüketim hızını (mg/L dakika), Q_{in} sisteme giren sıvının akış hızını (L/dakika), $K_L a_{O_2}$ oksijen transfer katsayısını (L/dakika), *t* zamanı (dakika), *V* solunum ölçerde sıvı hacmini (L) göstermektedir.

Denklem 1’e göre sistemdeki net çözünmüş oksijen derişimi, taşınım ve havalandırma ile sisteme kazandırılan oksijenden mikroorganizmalar tarafından tüketilen oksijenin çıkartılması ile elde edilir.

Yukarıda ifade edilen iki kriter dikkate alınarak farklı solunum ölçme metotlar geliştirilmiştir. Bunlar:

Statik gaz-Statik sıvı: Bu metotta numune kısa bir havalandırma işleminden sonra, tamamen kapalı solunum ölçerde çözünmüş oksijen (*ÇO*) derişimi azalması izlenir. Burada oksijen kütle denkliğinde (denklem 1) ifade edilen taşınım ve havalandırma ile O_2 kazanım ifadelerine yer verilmez.

$$\frac{dS_0}{dt} = -OUR \quad (2)$$

Ancak numune havalandırma işleminden sonra açık solunum bölmesine alınıp çözünmüş oksijen derişiminin azalması izlenirse, sıvı-hava ara yüzeyinden gerçekleşen oksijen transferi dikkate alınmalı ve denklem 3 kullanılmalıdır.

$$\frac{dS_0}{dt} = K_L a_{O_2} (S_0^0 - S_0) - OUR \quad (3)$$

Solunum ölçerlerde ara yüzeyden oluşacak oksijen transferini önlemek için, çözünmüş oksijen elektrotları ile yaklaşık aynı ağız çapına sahip solunum ölçerlerin kullanılması önerilmektedir. Bu metotta havalandırma işlemi uygulanmadığı için oksijen sınırlaması riski vardır. Oksijen sınırlamasını önlemek için yüksek substrat derişimi ve düşük biyokütle derişimi önerilmektedir. Yüksek substrat/biyokütle oranı, maksimum büyüme hızının belirlenmesine olanak sağlar ancak yarı doygunluk sabitinin (K_s) belirlenmesini olanaksız kılar. Çünkü substrat derişimi asla K_s 'nin değerine düşmez. Oksijen sınırlamasını önleyecek diğer bir yol ise, yüksek hava basıncında saf oksijen ile numunelerin oksijene aşırı doyurulmasının sağlanmasıdır. Ancak bunun dezavantajı şudur, mikroorganizmalar doğal ortamlardan farklı çözünmüş oksijen seviyelerine maruz kaldıkları için beklenenden farklı aktivite gösterirler.

Bu metotta, numunenin havalandırma-ölçüm periyodu sonunda bir OUR değeri elde edileceği için sınırlı OUR örnekleme frekansı, numunenin kinetik parametrelerinin değerlendirilmesinde yetersiz kalır.

Akıcı gaz-Statik sıvı: Bu metotta sürekli bir havalandırma olduğu için oksijen sınırlaması söz konusu değildir. Sıvı faz üzerindeki oksijen kütle dengesi denklem 3 ile ifade edilir. Güvenilir OUR değeri elde edilebilecek biçimde havalandırma seviyesi ayarlanmalıdır.

Genel olarak oksijen tüketim hızının iki bileşenden ibaret olduğu düşünülebilir. Bunlar:

- 1) Exojen oksijen tüketim hızı ($OUR_{0,ex}$) (substratı parçalarken oluşan oksijen tüketim hızı)
- 2) Endojen oksijen tüketim hızı ($OUR_{0,end}$) (substrat yokluğunda iç solunum safhasında oluşan oksijen tüketim hızı)

$OUR_{0,ex}$ değeri ortamda substrat olmadığında sıfırdır. Substratın olmadığı durumda, akıcı gaz-statik sıvı solunum ölçerlerde oksijen konsantrasyonu, oksijen transferi ile endojen solunum arasındaki dengeyi gösteren yatışkın durum derişimi ($S_{0,eq}$)'ya ulaşır. Kısa süreli denemelerde $OUR_{0,end}$ 'un sabit olduğu kabul edilirse denklem 3, denklem 4'e dönüşür.

$$\frac{dS_0}{dt} = K_L a_{O_2} (S_{0,eq} - S_0) - OUR_{0,ex} \quad (4)$$

Burada

$$\frac{dS_0}{dt} = S_0 \text{ eğrisinin eğimi}$$

$S_{0,eq}$ = Endojen solunum safhası süresince ölçülen S_0 derişimi, zamana karşı çözünmüş oksijen derişimini gösteren grafikten kolaylıkla elde edilebilir

$K_L a_{O_2}$, endojen safhasındaki numunenin yeniden havalandırılması ile veya numuneye bilinen kolay biyolojik olarak parçalanabilen substratın ilavesinden sonra yeniden havalandırılması ile elde edilebilir. $K_L a_{O_2}$ denklem 4'de yerine konulup $OUR_{0,ex}$ hesaplanabilir.

Statik gaz-Akıcı sıvı: Bu metotta havalandırılmış numune kapalı solunum bölümüne alınır. Solunum ölçerinin giriş ve çıkışında çözünmüş oksijen derişimi ölçülür. Solunum bölümündeki alıkonma süresi (V/Q_{in}), giriş ($S_{0,in}$) ve çıkış (S_0) çözünmüş oksijen derişimi kullanılıp, oksijen kütle denklığı yardımı ile OUR belirlenebilir (denklem 5).

$$\frac{dS_0}{dt} = \frac{Q_{in}}{V} (S_{0,in} - S_0) - OUR \quad (5)$$

Denklem 5'da $K_L a_{O_2}$ 'nin olmayışı, bu metodun $K_L a_{O_2}$ belirlemesinin problem olduğu kompleks substratlar içeren atıksular için kullanımını olanaklı kılar. Alıkonma süresi oksijen sınırlamasını önleyecek biçimde seçilmelidir. Bu metodun bir dezavantajı şudur, iki farklı çözünmüş oksijen elektrodu kullanıldığı için $S_{0,in} - S_0$ arasındaki küçük farkların belirlenmesinde hata meydana gelir. Bu durum ise, giriş ve çıkış akımlarının akış yönlerinin düzenli olarak aynı çözünmüş oksijen probuna doğru yönlendirilmesi ile önlenir.

Hibrit Solunum Ölçer: Farklı solunum ölçerlerin kötü unsurları hariç tutulup, iyi unsurları alınarak hibrit solunum ölçerlerin prensibi oluşturulmuştur. Hibrit solunum ölçerde akıcı gaz-statik sıvı ile statik gaz-akıcı sıvı solunum ölçerlerin prensipleri bir araya getirilmiştir. Hibrit solunum ölçer havalandırmanın olduğu bir açık bölme ve havalandırmanın olmadığı kapalı solunum bölümünden ibarettir. Burada OUR statik gaz-akıcı sıvı solunum ölçerine benzer bir prosedürle hesaplanabilir.

$$\frac{dS_{0,2}}{dt} = \frac{Q_{in}}{V_2} (S_{0,1} - S_{0,2}) - OUR_2 \quad (6)$$

$$\frac{dS_{0,1}}{dt} = \frac{Q_{in}}{V_1} (S_{0,2} - S_{0,1}) + K_L a_{O_2} (S_0^0 - S_{0,1}) - OUR_1 \quad (7)$$

Burada 1 alt indis havalandırma bölümünü, 2 alt indis ise solunum bölümünü temsil etmektedir.

2.1.2. CO_2 Derişiminin Belirlenmesine Dayalı Test

Biyolojik sistemlerde yukarıda ifade edildiği biçimde sıvıda çözünmüş oksijen derişimi belirleyerek solunum aktivitesini değerlendirmek çok pratik bir uygulamadır. Sıvıda çözünmüş karbon dioksit ölçümü yapılması ile de solunum aktivitesi belirlemek mümkündür. Ancak her iki şekilde yapılan ölçümlerde bazı dezavantajlar söz konusudur [3]. Bunlar

- 1) Çözünmüş oksijen ve çözünmüş karbon dioksit sensörleri kirlenmeye karşı oldukça eğilimlidirler. Özellikle fermantasyon prosesi işletilmesi sırasındaki kalibrasyon yenileme işlemi ile bu durum kolaylıkla düzilemez.
- 2) Ticari fiber optik çözünmüş karbon dioksit problemleri yeterli duyarlılığı sağlayamaz. Çözünmüş oksijen sensörleri ise sürekli hücre büyümelerinde kullanım için pratik değildir.

2.2. Prosesin Gaz Fazında Gaz Derişimde Meydana Gelen Değişime Dayalı Solunum Testleri

Yukarıda ifade edilen dezavantajlardan dolayı solunum parametrelerinin belirlenmesinde prosesden çıkan atık gaz içeriğinin bilinmesi büyük katkı sağlar.

Biyolojik sistemlerde giriş ve çıkış gaz analizlerine dayanan solunum testlerinde, gaz-sıvı arayüzeyinden gerçekleşen gaz transferine, ortam şartlarının etkisinin ne yönde olabileceğinin bilinmesi gerekir. Giriş ve çıkış gaz analizi yardımı ile karbon dioksit gelişim hızı (CER) belirlenmesi, yatışkın (durağan) durum şartlarında doğrudur [4]. Yatışkın durumda CER, denklem 8 yardımı ile hesaplanabilir.

$$CER = G.(\%CO_2^{out} - \%CO_2^{in}).M_{CO_2} \quad (8)$$

Burada mol yüzdesi ($\%CO_2$) ve hava akış hızı G kuru bazda verilmiştir.

Yatışkın olmayan durumda mikroorganizmaların CER ile gaz-sıvı arayüzeyinden gerçekleşen CTR arasında önemli farklılıklar vardır.

CO_2 , mikroorganizmalar tarafından üretilir ve CO_2 gelişim hızı (CER) olarak adlandırılan hızda hücre membranlarından difüze olur. Sıvı ortama difüze olan mineral karbon çeşitli tersinir reaksiyonlara girerek serbest CO_2 , bikarbonat ve karbonat formları gibi farklı türleri oluşturur [5, 4]. Mikrobial sistemlerde pH 6-8 olağan şartlardır. Bu pH aralığında bikarbonatın karbonata ayrışması ihmal edilir. Bundan dolayı tüm reaksiyon CO_2 'in bikarbonata dönüşümünü veren reaksiyon ile ifade edilebilmektedir.



CO_2 'in diğer olası reaksiyonu, hidroksit iyonu ile olan reaksiyonudur.



Denge sabitleri denklem 11 ve 12 ile ifade edilir.

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} \quad (11)$$

$$K_2 = \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2][OH^-]} = \frac{K_1}{K_w} \quad (12)$$

K_w (mol^2 / L^2) suyun ayrışma sabitini göstermektedir. Bu denge pH üzerine oldukça bağlıdır. Örneğin pH=6.3'de toplam CO_2 'in yarısı bikarbonat formundadır. Bu şartlarda 0.2 birimlik pH artışı, fiziksel olarak erir halde olan CO_2 'in %10'undan daha fazlasını bikarbonat formuna dönüştürür. Bu yüzden pH'daki değişim gaz safhasına transfer olan CO_2 miktarını büyük ölçüde etkiler. pH'daki değişim göz önünde bulundurulmadığı takdirde, transfer olan CO_2 miktarı mikroorganizma aktivitesindeki değişim olarak yanlış yorumlanacaktır.

Gaz analizi ile solunum parametresi belirlemede CO_2 'in çözünür türler oluşturması yanında CO_2 'in sıvıda çözünürlüğünün de dikkate alınması gerekir. Gazların çözünürlüğünün ifadesinde kullanılan en temel yasa Henry yasasıdır. Buna göre

$$[CO_2]^* = \frac{P_{CO_2}}{H} \quad (13)$$

Burada $[CO_2]^*$ gaz faz ile dengedeki CO_2 derişimini, H Henry yasası sabitini, P_{CO_2} CO_2 'in kısmi basıncını göstermektedir. Hava ideal gaz olarak düşünülüp $[CO_2]^* = 10^3.R.T. \frac{C_{CO_2}}{H}$ olarak elde edilir. CO_2 sıvı ortamdan gaz safhasına, CO_2 transfer hızı (CTR) olarak ifade edilen (denklem 14) hızda transfer olur. O_2 ve CO_2 için sıvı taraf transfer işleminde direnç gösteren asıl taraftır ve ara yüzeydeki akışı kontrol eder.

$$CTR = K_L a_{CO_2} \cdot \Delta C_{moy} \quad (14)$$

ΔC_{moy} logaritmik ortalama sürüş potansiyelini ifade etmektedir.

$$\Delta C_{moy} = \frac{([CO_2] - [CO_2]_a^*) - ([CO_2] - [CO_2]_b^*)}{\ln\left(\frac{[CO_2] - [CO_2]_a^*}{[CO_2] - [CO_2]_b^*}\right)} \quad (15)$$

Burada $[CO_2]_a^*$ giriş gaz ile dengedeki CO_2 derişimini, $[CO_2]_b^*$ çıkan gaz ile dengedeki CO_2 derişimini göstermektedir. CO_2 'in kütle transfer katsayısı $K_L a_{CO_2}$, oksijenin kütle transfer katsayısı $K_L a_{O_2}$ in fonksiyonu olarak ifade edilebilmektedir.

$$\frac{K_L a_{CO_2}}{K_L a_{O_2}} = \left(\frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}}\right)^{0.5} = 0.91 \quad (16)$$

Burada D_{CO_2} suda karbondioksitin yayılma gücünü (m^2/s), D_{O_2} suda oksijenin yayılma gücünü (m^2/s) göstermektedir.

Oksijen çözünür olduğu için, biyokütle tarafından tüketilen oksijen tüketim hızı OUR, direkt olarak ölçülen oksijen transfer hızı (OTR)'nin karşılığı olmaz. OUR, bilinen çözünmüş oksijen ve OTR profilleri yardımı ile dinamik denklem (17) kullanılarak hesaplanabilir [6].

$$\frac{dS_0}{dt} = OTR - OUR \quad (17)$$

Bu denklemde $OTR = K_L a_{O_2} (S_0^0 - S_0)$ dir. Çözünmüş oksijenin sabit kaldığı yatışkın durumda OUR OTR'ye eşdeğer olarak düşünülebilir, yani $OUR \approx OTR$ olur.

Solunum testleri, biyolojik sisteme sürekli giren ve çıkan gazda O_2 ve CO_2 içeriğinin belirlenmesi ile yapılabileceği gibi solunum ölçerlerde özel koşullar altında oluşan CO_2 'in belirlenmesi yada gaz kısmı basıncındaki değişimin belirlenmesi ile de yapılabilmektedir. OECD ve ISO tarafından kabul edilen ve CO_2 ile biyokimyasal oksijen ihtiyacı'nın belirlenmesini baz alan test teknikleri, kimyasalların biyolojik parçalanabilirliğinin belirlenmesinde oldukça sık kullanılmaktadır [7].

Solunum ölçerde gaz kısmı basıncındaki değişimin belirlenmesini baz alan manometrik solunum testlerinin temel prensibi çerçevesinde Sapromat ve Oxitop sistemleri geliştirilmiştir. Sapromat sisteminde, test kabının gaz safhasında CO_2 'ti tutacak soda kaymağı tuzağı, manometre ve elektrokimyasal oksijen üretim birimi mevcuttur. Test kimyasalı içeren çözeltinin biyolojik parçalanması sırasında oksijen bakteri tarafından tüketilir ve eşdeğer miktarda CO_2 oluşur. Oluşan CO_2 tuzakta absorblanarak basınç değişimine neden olur. Manometre yardımı ile elektrokimyasal oksijen üretim birimi faaliyete geçirilerek kap içine oksijen akışı sağlanır. Elektrik akışı ölçülerek test kimyasalının biyolojik oksijen ihtiyacı belirlenir.

Oxitop sisteminde, kapalı kapta test kimyasalı içeren bileşiğin biyolojik parçalanması, elektronik basınç göstergesi içeren başlık ile kapatılarak izlenir. Kapalı test kabında gaz karışımındaki basınç azalması sürekli kaydedilerek biyolojik oksijen ihtiyacı değeri hesaplanır.

3. SOLUNUM TESTLERİNİN BİYOLOJİK ARITIM SİSTEMLERİNDE UYGULANMASI

Yukarıda ifade edilen temel prensipler çerçevesinde çeşitli ticari solunum ölçerler geliştirilmiştir. Ancak gerek yüksek maliyetinden dolayı gerekse birçok çevre laboratuvarında standart ekipman olarak mevcut olmamasından dolayı kullanımı sınırlıdır. Pek çok araştırmacı tarafından spesifik amaçlar için yukarıda ifade edilen solunum ölçüm teknikleri modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu konuda son yıllardaki araştırmalar, çeşitli kirleticilerin bakteriyel toksisitesini değerlendiren aktif çamur solunum inhibisyon testi [8, 9], organik madde karakterizasyonu [10, 11, 12], karbon oksidasyonunun modellenmesi [13], proses kontrolü [14], biyokatı stabilitesinin değerlendirilmesi [15, 16, 17] üzerine yoğunlaşmıştır. Aşağıda biyolojik sistemlerde solunum ölçümlerinin uygulamaları ile ilgili bazı çalışmalar verilmiştir.

3.1. Biyoreaktörlerde Solunum Testleri

Arıtım uygulamalarında havalandırmanın sürekli, beslemenin ise kesikli yapıldığı prosesler çok yaygındır. Kesikli sistemde çalışan biyolojik proseslerde taşınım ile oksijen girişi söz konusu olmayıp, gaz-sıvı kütle transferi $K_L a_{O_2}$ ve OUR ile karakterize edilir. Bu sistemlerde $K_L a_{O_2}$ 'nin bilinmesi durumunda sistemde solunum hızı kolaylıkla hesaplanabilir. $K_L a_{O_2}$ 'yi belirleyen çeşitli metotlar vardır. Bu metotlar zamana karşı çözülmüş oksijen derişimindeki değişimin ölçümünü temel alır [1, 18]. Bunun için ilk adımda biyoreaktöre oksijen sağlayan gaz akışı durdurulur ve mikrobiyal tüketimle oluşan oksijen azalma hızı OUR tespit etmek çözülmüş oksijen azalması ölçülür. Ardından gaz akışı ilk işletme değerine getirilir ve zamanla çözülmüş oksijen derişimindeki artış belirlenerek $K_L a_{O_2}$ hesaplanır. Bu şekilde yapılan dinamik ölçümler sırasında bioreaktörün hidrodinamiği her zaman etkilenir. Ancak, oksijen tüketim ifadesi hidrodinamik rejimdeki değişimden etkilenmediği de bir gerçektir.

Havalandırmanın kesikli yapıldığı biyolojik sistemlerde, sıvı fazda oksijen kütle dengesi denklem 3'de verildiği gibidir. Havalandırma ile sisteme oksijenin absorpsiyonu ve havalandırmanın kesilmesinin ardından kazanılan oksijenin desorpsiyonu ile oluşan iki faz için denklem çözülür. Desorpsiyon adımı için denklem 2 geçerli olup, zamana karşı çözülmüş oksijen derişimindeki azalma yardımı ile OUR kolaylıkla belirlenebilir. Denklem 3'de OUR yerine konulup $K_L a_{O_2}$ hesaplanabilir.

Karışımın gaz akışı ile sağlandığı tam karışımli pünomatik biyoreaktörler için, $K_L a_{O_2}$ ve OUR 'nin belirlendiği bu yöntemin işletme sırasında uygulanması sistemi olumsuz etkiler. Bu reaktörlerde gaz akışı kesilmesi ile, akışkan uzun süre iyi karışmaz. Bu dinamik metodun bir modifikasyonu geliştirilmesi ile özellikle işletme sırasında bu tür reaktörlerde $K_L a_{O_2}$ ve OUR belirlenmesi için ölçümlerin yapılabilmesine olanak sağlanmıştır. Modifiye metotta hava akışı durdurulmadan, aynı akış hızında havalandırma gazının içeriği değiştirilmiştir.

Biyoreaktörlerde yerinde ölçüm yapılarak OUR değerinin belirlenebilmesi özellikle işletilmekte olan proseslerin kesintiye uğramadan on-line olarak veri elde edebilme açısından önemlidir. Yerinde OUR ölçüm tekniği, atmosfere açık sürekli akışlı karıştırılmalı tank reaktörleri veya ardışık kesikli reaktörler olarak işletilen oldukça büyük laboratuvar ölçekli aerobik biyoreaktörlerin sürekli izlenmesi için uygun bir yoldur. Reaktör sürekli akışlı karıştırılmalı olarak işletiliyorsa, OUR ölçüm periyodu süresince besin ilavesi geçici olarak durdurulur. OUR ölçümleri, set edilen en düşük çözülmüş oksijen derişimine kadar devam eder. Quintela ve Ro (2003) tarafından atmosfere açık laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerin OUR ölçümlerinde etkili faktörler ele alınmıştır [19]. Havalandırmanın olmadığı periyod süresince kesikli reaktör modunda işletilen açık biyoreaktörde oksijen kütle dengesi denklem (18) ile ifade edilir.

$$-\frac{dD}{dt} = -OUR_T + \alpha K_L a_{O_2} D \quad (18)$$

Burada $D = S_0^0 - S_0$ oksijen açığı (g/m^3), $K_L a_{O_2}$ aynı hidrodinamik şartlar altında musluk suyunun oksijen kütle transfer katsayısı (1/saat), α düzeltme faktörünü, OUR_T gerçek OUR ($g/m^3 \cdot \text{saat}$) değerini göstermektedir.

Δt havalandırmanın olmadığı periyot süresince OUR nispeten sabit kabul edildiği zaman denklem (18) ilk oksijen açığından (D_i) final oksijen açığına (D_f) integrali alındığında denklem (19) elde edilir

$$\frac{\alpha K_L a_{O_2} D_f - OUR_T}{\alpha K_L a_{O_2} D_i - OUR_T} = e^{-\alpha K_L a_{O_2} \Delta t} \quad (19)$$

$$D_f = S_0^0 - S_f$$

$$D_i = S_0^0 - S_i$$

S_f set edilen düşük çözünmüş oksijen, S_i set edilen yüksek çözünmüş oksijen değerini ifade etmektedir. α atıksuyun tipine bağlı olarak değişir. Örneğin ham evsel atıksular için 0,82 dir

Reaktörün işletme sırasındaki görünür OUR_a denklem (20) göre ifade edilir.

$$OUR_a = \frac{D_f - D_i}{\Delta t} \quad (20)$$

ψ faktörü görünür ve gerçek OUR değeri arasındaki oran olarak tanımlanır.

$$\Psi = \frac{OUR_a}{OUR_T} \quad (21)$$

Sıvı fazında çözünmüş oksijen değişiminin ölçülmesi ile solunum parametrelerinin belirlenmesi ucuz ve pratik bir yoldur. Buna karşın, içeriği bilinen bir gaz ile havalandırılan biyolojik proseslerden çıkan atık gazın soğutulup aşırı nemi giderildikten sonra, gaz analizöründe içeriği ölçülmesi ile solunum parametrelerinin belirlenmesi nispeten pahalı bir yoldur. Ancak sisteme herhangi bir müdahale yapılmaksızın (beslemenin veya hava akışının durdurulması gibi), istenilen ölçüm periyodunun seçilebilmesi bu yöntemin avantajıdır. Atmosfere kapalı, sürekli hava beslemeli, tam karışimli kesikli sistemde işletilen reaktörler için bu OTR ve CTR denklem (22) ve (23) yardımı ile hesaplanabilir [20].

$$OTR = \frac{F_{hava} M_{O_2}}{V_L V_N} \left[X_{O_2, in} - X_{O_2, out} \left(\frac{1 - X_{CO_2, in} - X_{O_2, in}}{1 - X_{CO_2, out} - X_{O_2, out}} \right) \right] \quad (22)$$

$$CTR = \frac{F_{hava} M_{CO_2}}{V_L V_N} \left[X_{CO_2, out} - X_{CO_2, in} \left(\frac{1 - X_{CO_2, in} - X_{O_2, in}}{1 - X_{CO_2, out} - X_{O_2, out}} \right) \right] \quad (23)$$

Burada F_{hava} hava akış hızını (m^3 /saat), V_L reaktörde karışımın hacmini (m^3), $X_{O_2, in}$ ve $X_{O_2, out}$ giriş ve çıkış havasında O_2 mol fraksiyonunu, $X_{CO_2, in}$ ve $X_{CO_2, out}$ giriş ve çıkış havasında CO_2 mol fraksiyonunu göstermektedir.

$M_{O_2} = 32$ kg/kmol, $M_{CO_2} = 44$ kg/kmol, $V_N =$ Normal şartlar altında 1 mol gazın hacmi ($22,4116$ m^3 /kmol), $X_{O_2, in} =$ Giriş havası için 0,21, $X_{CO_2, in} =$ Giriş havası için 0,00035 olarak kabul edilir.

Solunum parametreleri içinde değerlendirilen solunum oranı RQ ; üretilen CO_2 ile tüketilen O_2 arasındaki ilişkiyi gösterir.

$$RQ = \frac{CTR}{OTR} \frac{32}{44} \quad (24)$$

3.2. Biokati Stabilitésinin Değerlendirilmesinde Solunum Testleri

Solunum ölçümleri biyokati stabilitésinin değerlendirilmesinde güvenle kullanılabilir. Lasaridi ve Stentford (1998) tarafından solunum ölçüm tekniği kullanılarak kompost stabilitési değerlendirilmiştir [21]. Yapılan çalışmada pH ve nütrient sınırlamasını önleyecek biçimde tampon ve nütrient çözeltileri ilave edilmiş kompost süspansiyonu, ard arda gelen havalandırma ve ölçüm safhasına alınarak zamana karşı çözülmüş oksijen verileri elde edilmiştir. Bu veriler kullanılarak denklem (25) yardımı ile spesifik oksijen tüketim hızı ($\text{mg } O_2/\text{g } VS/\text{saat}$) hesaplanmıştır.

$$SOUR = \frac{60 \cdot |S|_{\max} \cdot V}{m \cdot DS \cdot VS} \quad (25)$$

Burada $|S|_{\max}$ mutlak maksimum eğimi ($\text{mg } O_2/\text{L. dakika}$), V süspansiyonun hacmini (L), m kompost numunesinin kütesini (g, ıslak ağırlık), DS kuru katı fraksiyonunu, VS uçucu katı fraksiyonu, 60 dakikadan saate dönüşüm faktörünü ifade etmektedir

Kompostun solunum parametresi, daha önce ifade edildiği gibi kompost süspansiyonunda çözülmüş oksijen azalması yardımı ile belirlenebilmektedir. Bunu yanında kompostlayıcılardan çıkan gaz içeriğinin analizlenmesi ile de belirlemek mümkündür. Organik katı atıkların kompostlama işleminde biyolojik aktivitenin izlenmesinde çok sık kullanılan OUR çoğunlukla dinamik solunum indeksi (DRI) olarak ifade edilir [22]. OUR veya DRI'nin on-line belirlenebilmesi için statik kompostlayıcıda çıkan atık gazın O_2 içeriğinin belirlenmesi gerekir. Denklem (26) yardımı ile OUR belirlenebilir.

$$OUR = \frac{F \cdot (20.9 - O_{2,out})}{M \cdot 100} \cdot \frac{P \cdot 32 \cdot 60}{R \cdot T \cdot DM \cdot TOM} \quad (26)$$

Burada OUR ($\text{g } O_2/\text{kgTOM.saat}$), F reaktöre hava akışını (L/dakika), M reaktörde atığın toplam kütesini (kg), P atmosferik basıncı (atm), R ideal gaz sabitini ($0.08206 \text{ L.atm/mol.K}$), T sıcaklığı (K), DM numunelerin kuru madde fraksiyonunu, TOM numunelerin kuru bazda toplam organik madde fraksiyonunu (kg TOM/kg DM) göstermektedir. Oksijenin moleköl ağırlığı $32 \text{ (g } O_2/\text{mol } O_2)$, dakikadan saate dönüşüm faktörü 60, giren hava da oksijenin yüzdesi 20.9 olarak kabul edilmiştir.

Oksijen tüketim hızının off-line olarak belirlenmesi de mümkündür. Onun için inkübasyon periyodu süresince nemli hava ile havalandırılan statik kompostlayıcılarda havalandırma kesilir ve oksijen seviyesindeki düşme kaydedilir. Statik solunum indeksi olarak ifade edilen SRI denklem (27) yardımı ile hesaplanır.

$$SRI = \frac{V \cdot P \cdot 32 \cdot s \cdot 60}{R \cdot T \cdot X \cdot DM \cdot TOM} \quad (27)$$

Burada SRI ($\text{g } O_2/\text{kg TOM.saat}$), V kompostlama kabında hava hacmini (L), s O_2 'nin değişim yüzdesinin eğimini ($\text{mol } O_2/\text{mol.dakika}$), X kompostun ıslak ağırlığını (kg) göstermektedir.

RQ on-line olarak denklem (28) yardımı ile belirlenir.

$$RQ = \frac{CO_{2,out}}{20.9 - O_{2,out}} \quad (28)$$

Yığın ile kompostlama yönteminde ise, yığın içinde çeşitli noktalara yerleştirilen gaz örnekleyiciler yardımı ile hava numunesi alınabilir. Vakum pompa ile gaz örnekleyicilerden çekilen havanın aşırı nemi giderildikten sonra analizlenir. Kompost yığnında gözenekler arasında bulunan gazın oksijen içeriği portatif oksijen metre ile belirlenebilir. Oksijen ölçümünden önce CO_2 'in gazdan yıkanarak uzaklaştırılması gerekir [23].

3.3. Mikrobiyolojik Uygulamalarda Solunum Testleri

Gaz fazı analizleri ile solunum testlerinin yapılması, özellikle mikrobiyolojik uygulamalarda sık kullanılan çalkalamalı kap (shake flask) deneysel sistemlerin on-line izlenmesinde büyük katkı sağlamıştır. Anderlei ve diğ., (2004) tarafından karıştırılmalı kaplarda gaz analizi ile mikrobiyal kültürün solunum aktivitesi on-line olarak incelenmiştir [24]. Bunun için solunum testinin yapılacağı kap hava ile doyurulduktan sonra hava girişleri kapatılarak ölçüm safhasına alınmıştır. Bu safhada mikroorganizmanın solunumu ile oksijen kısmı basınç ΔP_{O_2} azalır ve CO_2 kısmı basıncı (ΔP_{CO_2}) artar. Basınç sensörleri yardımı ile belirlenen ΔP_{O_2} ve ΔP_{CO_2} yardımı ile denklem (29) ve (30) göre *OTR* ve *CTR* hesaplanabilir.

$$OTR = \frac{\Delta P_{O_2}}{\Delta t} \cdot \frac{V_G}{R.T.V_L} \quad (29)$$

$$CTR = \frac{\Delta P_{CO_2}}{\Delta t} \cdot \frac{V_G}{R.T.V_L} \quad (30)$$

Burada ΔP_{O_2} ve ΔP_{CO_2} kısmı basıncı (bar), Δt zamanı (saat), V_L sıvı hacmini (L), V_G gaz hacmini, T sıcaklığı, R gaz sabitini (bar L/mol K) göstermektedir.

4. SONUÇ

Solunum parametreleri için sıvı fazda çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın belirlenmesi, çok pratik bir uygulamadır. İşletilmekte olan biyolojik sistemden alınan numunenin özel solunum ölçerlerde çözünmüş oksijen azalması belirlenerek solunum değeri elde edilebilmektedir. Solunum ölçerlerde deneysel şartlar yapay olarak sağlandığı için elde edilecek verinin doğruluğu etkilenir, ayrıca solunum ölçüm periyodunun uzun oluşu elde edilecek veri sayısını azaltır. Bu iki faktör, bu metotla solunum parametresinin değerlendirmesinde göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun yanı sıra atmosfere açık olan biyoproseslerde işletme aşamasında yerinde ölçüm yapmak sureti ile de OUR değerlendirmek mümkündür. Ancak bu yöntemde prosese bazı müdahaleler söz konusudur.

İçeriği bilinen gaz ile beslenen biyolojik sistemlerden çıkan atık gazın içeriği belirlenerek yapılan solunum aktivitesi ölçümleri numune almaksızın gerçekleşmesi bakımından önemlidir. Bu metotta gaz içeriğinin on-line olarak belirlenebilmektedir ve ölçüm periyodu istenildiği gibi ayarlanabilmektedir. Bu ise yöntemin üstünlüğüdür.

5. KAYNAKLAR

1. Marsili-Libelli S and Vaggi A., Estimation of respirometric activities in process, Journal of Biotechnology, 52, 181-192, 1997.
2. Gernaey A.K., Petersen B, Ottoy J.P. and Vanrolleghem, Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements, Water Research., 35, 1280-1294, 2001.
3. Wu L., Lange H.C., van Gulik W.M. and Heijnen, Determination of in vivo oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates from off-gas measurements under highly dynamic conditions, Biotechnol Bioengineering, 81, 448-458, 2003.
4. Sperandio M., and Paul E., Determination of carbon dioxide evolution rate using on-line gas analysis during dynamic biodegradation experiments, Biotechnology and Bioengineering, 53, 243-252, 1997.
5. Lencki R.W., Zhu M. And Chu C.L., Comparison of unsteady-and steady-state methods for produce respiration rate determination. 1.Model development and validation, Postharvest Biology and Technology, 31, 229-238, 2004.
6. Pratt S., Yuan Z., Gapes D., Dorigo M., Zeng R.J., Keller J., Development of a novel titration and off-gas analysis (TOGA) sensor for study of biological process in wastewater treatment systems, Biotechnology and Bioengineering, 81, 482-495, 2003.
7. Reuschenbach P., Pagga U., and Strotmann U., A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods, Water Research., 37, 1571-1582, 2003.

8. Gendig C., Domogala G., Agnoli F., Pagga U., Strotmann U.J., Evaluation and further development of the activated sludge respiration inhibition test, *Chemosphere*, 52, 143-149, 2003.
9. Narita N., Takahashi M., and Shoji R., Rapid activated sludge respiration inhibition test performed by CO_2 producing rate using a carbon dioxide sensor, *Journal of Environmental Science and Health*, 40, 1987-1996, 2005.
10. Ganesh R., Balaji G, Ramanujam R.A., Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor-respirometric assessment, *Bioresource Technology* , 97, 1815-1821, 2006.
11. Tremier A., Guardia A., Massiani C., Paul E., and Martel J.L., A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted, *Bioresource Technology*, 96, 169-180, 2005.
12. Orhon D., and Okutman D., Respirometric assessment of residual organic matter for domestic sewage, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 560-566, 2003.
13. Pratt S., Yuan Z., and Keller J., Modeling aerobic carbon oxidation and storage by integrating respirometric, titrimetric, and off-gas CO_2 measurements, *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 135-147, 2004.
14. Zeng A.P., Byun T.G., Posten C., Deckwer W.D., Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 1107-1114, 1994.
15. Scaglia B., Erriquens F.G., Gigliotti G., Taccari M., Ciani M., Genevini P.L., and Adani F., Precision determination for the specific oxygen uptake rate (SOUR) method used for biological stability evaluation of compost and biostabilized products, *Bioresource Technology*, 98, 706-713, 2007
16. Oviedo M.D.C., Sanchez J.B., and Alonso J.M.Q., Enzymatic estimation of biosolids stability in aerobic digestion systems, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 191-197, 2005.
17. Sanchez J.B., Alonso J.M.Q., Oviedo M.D.C., Use of microbial activity parameters for determination of a biosolids stability index, *Bioresource Technology*, 97, 562-568, 2006.
18. Lopez J.L.C., Porcel E.M.R., Alberola I.O., Martín M. M. B., Perez J.A.S., Sevilla J. M. F. And Chisti Y., Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 1167-1171, 2006.
19. Quintela M., and Ro K. S., Atmospheric oxygen transfer during in situ oxygen uptake rate measurement, *Journal of Environmental Engineering*, 129, 183-186, 2003.
20. Genç N. And Yonsel Ş., Evaluation of the biological activity in aerobic sludge digestors by respiration measurements (OTR, CTR and RQ). (İnceleme aşamasında)
21. Lasaridi K. E. and Stentiford E. I., A simple respirometric technique for assessing compost stability, *Water Research*, 32, 3717-3723, 1998.
22. Gea T., Barrena R, Artola A. and Sanchez A., "Monitoring the biological activity of the composting process: Oxygen uptake rate (OUR), Respirometric index (RI), and Respiratory Quotient (RQ)", *Biotechnology and Bioengineering*, Cilt 88, No 4, 520-527, 2004.
23. Singley M.E., Higgins A.J., and Frumkin-Rosengaus M., *Sludge Composting and Utilization: A Design and Operating Manual*, New Jersey Agricultural Experiment Station, 193-196, 1982.
24. Anderlei T., Zang W., Papaspyrou and Bücs J., "Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks", *Biochemical Engineering Journal*, Cilt 17, 187-194, 2004.