

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

***Enterobacter aerogenes* ve Rekombinant Suşlarında
Mikrobiyal Yakıt Pili Uygulaması**

ESRA NEZAFED GÜÇLÜ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

TEMMUZ 2013

Tezin Başlığı: *Enterobacter aerogenes* ve Rekombinant Suşlarında Mikrobiyal Yakıtr Pili Uygulaması

Tezi Hazırlayan: Esra Nezafed GÜÇLÜ

Sınav Tarihi: 30.07.2013

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ (Jüri Başkanı)	(İnönü Üniv.)	_____
Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE (Üye)	(İnönü Üniv.)	_____
Yrd. Doç. Dr. A. şebnem ERENLER (Danışman)	(İnönü Üniv.)	_____

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum "*Enterobacter aerogenes* ve Rekombinant Suşlarında Mikrobiyal Yakıt Pili Uygulaması" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Esra Nezafed GÜÇLÜ

Varlıklarıyla hayatıma anlam katan Anneme, Babama ve sevgili ablam Aysun'a...

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Enterobacter aerogenes ve Rekombinant Suşlarında
Mikrobiyal Yakıt Pili Uygulaması

Esra Nezafed GÜÇLÜ
İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
86 + ix sayfa
2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. A. Şebnem ERENLER

Artan nüfus ve hızla gelişen teknolojiler enerji kaynaklarına duyulan ihtiyacı giderek artırmaktadır. Yerkürede mevcut fosil yakıt kaynakların tükeniyor olması araştırmacıları ilgi çekici yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları bulmaya yöneltmektedir. Mikrobiyal Yakıt Hücreleri (MYH), yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir ve “karbon-nötr” sistemlerdir. Yani organik maddelerin oksidasyonu sonucu atmosfere sadece kararlı karbon salarlar. Yenilenebilir enerji kaynaklarının biyolojik sistemler kullanarak geliştirilme çabası, bu sistemlerde bakterilerin de kullanılmasına yol açmıştır. MYH sistemleri, organik maddelerin sahip olduğu kimyasal enerjiyi, elektrik enerjisine dönüştürmeyi sağlayan reaktörlerdir. Bu dönüşümde bakteriler önemli bir role sahiptir.

Buradaki çalışmada mevcut prensipler doğrultusunda modellenmesi tarafımızca yapılan bir MYH sisteminde verimli hidrojen üretimi ile bilinen E.a ve vgb^- / vgb^+ rekombinantları kullanılarak elektrik üretimi hedeflenmiştir. Çalışmamızda konakçı ve rekombinantlarının çeşitli besinsel ortamlarda ve bu ortamların değişen ısı ve pH koşullarında ürettikleri voltaj değerleri ölçülmüştür. Optimum üreme ve voltaj ölçümlerinin belirlendiği şartlarda çeşitli sıcaklık ve pH aralıklarında dirence karşı gösterilen gerilim kaydedilmiştir.

Çalışmanın başında üreme zamanı voltaj verimliliği ilişkisi araştırılmış en uygun zamanın 8. saat olduğu belirlenmiştir. MYH sisteminde kullanılacak elektrot araştırılmış ve sistemimiz için en verimli olanın karbon elektrot olduğu belirlenmiştir. TB, LB, Peynir altı suyu ve Melas ortamlarında çalışılmış ve TB tüm suşlarda en iyi üreme ve en yüksek voltaj değerlerini verirken, en elverişsiz besi ortamı ise PAS ortamı olmuştur. Ancak biyoteknolojik önemi göz önüne alınarak çalışmanın sonraki aşamalarında melasın kullanımı tercih edilmiştir.

Melas ortamında pH ve ısı optimizasyonları çalışılmış, en yüksek voltajın ölçüldüğü pH derecesi tüm suşlarda ortak olarak pH 6, sıcaklık ise tüm suşlarda 37 °C olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın son aşamasında direnç voltaj ilişkisi araştırılmış ve dirençle voltaj arasında var olan doğrusal ilişki gözlemlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Mikrobiyal yakıt hücresi, *Vitreoscilla hemoglobini*, *vgb*, Melas, Peynir altı suyu, Atık su.

ABSTRACT

Master Thesis

Application Of Microbial Fuel Cell In *Enterobacter aerogenes*
and Its Recombinant strains

Esra Nezafed GÜÇLÜ
İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
86 + ix pages
2013

Supervisor: Asst. Prof. Dr. A. Şebnem ERENLER

Increasing population and rapidly developing technologies increases the need for energy resources day by day. The ongoing extinction of current fossil fuels on earth directs researchers to find interesting, new and renewable energy resources. Microbial Fuel Cells (MFC) are renewable energy sources and are carbon-neutral systems. Namely, they only emit stable carbon to atmosphere as a result of oxidation of organic materials. The effort for developing renewable energy sources by using biological systems resulted with the usage of bacteria in these systems as well. MFC systems are reactors converting the chemical energy of organic materials to electrical energy. Bacteria play important role in this conversion.

In this study, electricity production was aimed in a MFC system (modeling of which was made by us in direction of current principles) by efficient hydrogen production and by using known E.a, *vgb⁻* and *vgb⁺* recombinants. In our study, the voltage values produced by hosts and recombinants in various nutritive environments and the changing heat and pH conditions of these environments were measured. In the conditions where optimum reproduction and voltage measurements were determined, voltage against the resistance in various temperature and pH intervals were recorded.

In the beginning of the study reproduction period – voltage efficiency relation was researched and the most appropriate time was determined as 8.hour. The electrode to be used in MFC system was researched and carbon electrode was determined to be the most efficient electrode for our system. Studies were made in TB, LB, whey and molasses environments and while TB gave the best reproduction and highest voltage values in all strains, most inappropriate nutrition environment was determined as whey. However taking the biotechnological importance into consideration, usage of molasses was preferred in the former stages of the study.

pH and heat optimizations were studied in molasses environment and highest pH value was measured as pH 6 and highest temperature was measured as 37 °C in all strains. In the final stage of our study resistance-voltage relation was researched and the linear relation between resistance and voltage could be observed.

KEYWORDS: microbial fuel cell, *Vitreoscilla haemoglobin*, *vgb*, molasses, whey, waste water.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın sonuna yaklaştığım Şu günlerde hem büyük bir sevinç hem de garip bir hüçün yaşamaktayım. Çalışmalarına yön veren, yaptığım araştırmaların her aşamasında bilgi, öneri ve her türlü yardımı esirgemedi, fikirleriyle gelişmeye büyük katkısı olan Danışmanım, Değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Şebnem ERENLER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince karşılaştığım zorluklarda ve başarılarında bilgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Değerli Hocam Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye,

Çalışmalarımda en sıkıştığım anlarda yardımlarını esirgemeyen Değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Harun KAYA'ya,

Tezimin deney aşamasında yardımlarını gördüğüm Elektrik Teknisyeni Tayyar COŐKUN'a

En karamsar hallerimde bile beni gülümsettiren, maddi ve manevi desteklerinin yanında bütün sıkıntılara katlanan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Yakıt hücreleri	2
1.1.1. Yakıt pillerinde kullanılan yakıtlar	3
1.1.2. Yakıt pillerinin tarihçesi.....	3
1.1.3. Bir yakıt hücresinin çalışma prensibi.....	4
1.1.4. Yakıt hücresi çeşitleri.....	7
1.1.5. Yakıt pillerinin kullanım alanları.....	8
1.2. Mikrobiyal yakıt pilleri.....	8
1.2.1. Mikrobiyal yakıt hücresinde anot.....	10
1.2.2. Mikrobiyal yakıt hücresinde katot.....	10
1.2.3. Mikrobiyal yakıt Hücresi çeşitleri.....	12
1.2.4. Mikrobiyal yakıt hücresinde kullanılan mikroorganizmalar.....	12
1.3. <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni (vgb).....	15
1.4. Enerji üretiminde atık kullanımı.....	16
1.5. Biyo-Elektrokimyasal sistemin tarihi.....	17
1.6. MYH sistemlerinde elektronların bakteriden elektrotta taşınma mekanizmaları.....	18
1.6.1. Doğrudan elektron transferi.....	18
1.6.2. Medyatörler aracılığı ile elektron transferi.....	21
1.6.2.1. Kimyasal medyatörler aracılığı ile anot elektrotta elektron transferi.....	22
1.6.2.2. Biyolojik medyatörler aracılığı ile anot elektrotta elektron transferi....	22
1.7. MYH’de katod bölümündeki medyatörler.....	22
1.8. MYH’de kullanılan substratlar.....	23
1.9. Elektrot seçimi.....	23
1.10. Membran seçimi.....	23
1.11. MYH’ lerinin avantajları.....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Araştırmada kullanılan kimyasallar.....	33
3.2. Araştırmada kullanılan bakteriler ve saklanma koşulları.....	33
3.2.1. Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	33
3.2.2. Araştırmada kullanılan çözeltiler.....	35
3.3. Hücre kütlelerinin (OD ₆₀₀) belirlenmesi.....	36
3.4. Kültürlerin asit üretimi.....	36
3.5. Kullanılan yakıt pili.....	36
3.5.1. Kullanılan elektrotlar ve membran.....	37
3.5.2. Yakıt pilinin doldurulması.....	37

3.6.	Elektrot optimizasyonu.....	38
3.7.	Zaman optimizasyonu.....	38
3.8.	Besiyeri optimizasyonu.....	39
3.9.	Sıcaklık optimizasyonu.....	39
3.10.	pH optimizasyonu.....	40
3.11.	Elde edilen voltaj üretiminin okunması.....	40
3.12.	Dirence karşı voltaj değerinin okunması.....	41
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
4.1.	Elektrot optimizasyonu.....	43
4.2.	Zaman optimizasyonu.....	45
4.3.	Besiyeri optimizasyonu.....	46
4.4.	pH optimizasyonu.....	49
4.5.	Sıcaklık optimizasyonu.....	52
4.6.	Melas ortamında <i>E. aerogenes</i> ve rekombinant suşlarının pH ve spektrofotometrik değerlerinin analizi.....	55
4.7.	Direnç- voltaj ilişkisi.....	57
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6.	KAYNAKLAR.....	76
	ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	1839 yılında Sir William Grove tarafından geliştirilen yakıt hücresi.....	4
Şekil 1.2	Bir yakıt pilinin genel yapısı ve işleyişi.....	5
Şekil 1.3	Elektriğin elektrokimyasal üretiminde yer alan temel aşamaları gösteren yakıt pili kesiti	6
Şekil 1.4	Mikrobiyal yakıt hücresi yapısı	9
Şekil 1.5	Glukozun substrat olarak kullanıldığı bir MYH' de gerçekleşen olaylar.....	11
Şekil 1.6	Çalışmalarda kullanılan MYH tipleri	13
Şekil 1.7	Mtr Yolu	19
Şekil 1.8	Enterobakteriyel elektron transfer zincirinin şematik tasarımı...	19
Şekil 1.9	Pili aracılığı ile elektron taşınım mekanizması	20
Şekil 1.10	Pili aracılığı ile (B) ve Hücre membranı ile (A) anot yüzeyine elektron taşıyan bakterilerin anot yüzeyinde oluşturdukları biyofilm yapıları	21
Şekil 3.1	Deneyler süresince kullanılan yakıt pili.....	
Şekil 3.2	Kullandığımız MYH'nin anot ve katot bölümleri	38
Şekil 3.3	Multimetre Sistemi	41
Şekil 3.4	Multimetre ve Direnç Ölçer.....	42
Şekil 4.1	<i>Ea</i> [pUC8:15]'de bakır elektrotla yapılan deneysel veri grafiği.....	43
Şekil 4.2	<i>Ea</i> [pUC8:15]'de, kompozit elektrotla yapılan deneysel veri grafiği.....	44
Şekil 4.3	<i>Ea</i> [pUC8:15]'de, karbon elektrotla yapılan deneysel veri grafiği.	44
Şekil 4.4	<i>Ea</i> [pUC8:15]'in 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerdeki kültürü kullanılarak gerçekleştirilen saat optimizasyonu deneysel veri grafiği.....	45

Şekil 4.5	<i>Enterobacter aerogenes</i> 'in 4 ayrı besi ortamında gerçekleştirilen deneysel voltaj değerleri grafiği	47
Şekil 4.6	<i>Ea</i> [pUC8]'in 4 ayrı besi ortamında gerçekleştirilen deneysel voltaj değerleri grafiği	48
Şekil 4.7	<i>Ea</i> [pUC8:15]'in 4 ayrı besi ortamında gerçekleştirilen deneysel voltaj değerleri grafiği	49
Şekil 4.8	<i>Ea</i> için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği.....	50
Şekil 4.9	<i>Ea</i> [pUC8] için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği.....	51
Şekil 4.10	<i>Ea</i> [pUC8:15] için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği	52
Şekil 4.11	<i>Ea</i> için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği	53
Şekil 4.12	<i>Ea</i> [pUC8] için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği.....	54
Şekil 4.13	<i>Ea</i> [pUC8:15] için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği.....	55
Şekil 4.14	Sisteme direnç ölçer bağlanmasının şematik gösterimi.....	58
Şekil 4.15	<i>Ea</i> ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği	59
Şekil 4.16	<i>Ea</i> [pUC8] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği	60
Şekil 4.17	<i>Ea</i> [pUC8:15] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.....	61
Şekil 4.18	<i>Ea</i> ile 3 ayrı pH'da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.....	62
Şekil 4.19	<i>Ea</i> [pUC8] ile 3 ayrı pH'da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği	63
Şekil 4.20	<i>Ea</i> [pUC8:15] ile 3 ayrı pH'da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Kullanılan besi ortamları ve içerikleri (g L ⁻¹).....	34
Çizelge 3.2	Melasın içeriği (g L ⁻¹).....	34
Çizelge 3.3	Peynir altı suyunun içeriği (g L ⁻¹).....	35
Çizelge 4.1.	<i>E.aerogenes</i> ve rekombinant suşlarının Melas kültür ortamında pH değişimi ve biyokütle oluşumu.....	56
Çizelge 4.2.	<i>E. aerogenes</i> ve rekombinant suşlarının pH 7.0'da, 8.saat sonunda, LB, TB PAS ve Melas ortamında pH değişimleri ve biyokütle oluşumu.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ l	Mikrolitre
CRP	cAMP reseptör protein
<i>Ea</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Ea</i> [pUC8:15]	pUC8:15 plazmidini içeren <i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Ea</i> [pUC8]	pUC8 plazmidini içeren <i>Enterobacter aerogenes</i>
MYH	Mikrobiyal yakıt hücresi
Kb	Kilobyte
kJ	Kilojoule
LB	Luria-Bertani
Mtr	Metal indirgeme solunumu
mV	Milivolt
MW	Megawatt
R	Direnç
rpm	Dakikada dönme hızı
TB	Terrific Broth
<i>vgb</i>	Bakteriyel hemoglobin sentezleyen gen
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
Ω	Ohm, direnç simgesi
PAS	Peynir altı suyu

1. GİRİŞ

Dünyanın giderek artan enerji gereksinimini çevreyi kirletmeden ve sürdürülebilir olarak sağlayabilecek en ileri teknoloji arayışı son dönemlerin en acil ve öncelikli çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Alternatif enerji arayışı içinde biyolojik sistemlerin kullanılabilirliğinin araştırılması kaçınılmazdır (Li W ve ark., 2013).

Sürdürülebilir bir çevre ve alternatif enerji kaynakları oluşturma konusunda bilimin yeni çalışma konuları arasında yakıt pilleri ve hidrojen enerjisi de bulunmaktadır. Yakıt pilleri, kimyasal enerjiyi doğrudan elektrik enerjisine dönüştüren cihazlardır. Yakıt pili, fosil yakıtlarının yakılması yerine, yakıt ile oksijenin elektro-kimyasal reaksiyonu sonucunda enerji üreten bir tür bataryadır. Yakıt olarak genellikle hidrojen kullanılmaktadır. 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 alternatif enerji kaynağıdır. Ancak metan, doğal gaz, etanol, metanolde kullanılabilir. Yakıt pillerindeki reaksiyonda oksijenle hidrojen su ürettiğinden, bu reaksiyondan kirletici ürün çıkışı söz konusu olmamaktadır (Gandía LM ve ark., 2013; Helton JA ve ark., 2013).

Kömür ve petrol gibi fosil yakıtlar sanayi toplumlarının gelişimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Ancak bu yakıtların gelişimi, bir takım problemleri de beraberinde getirmektedir. Bu problemlerin başında ise petrol türevli yakıtların ekolojik dengeye verdikleri zararlar gelmektedir. Tamamına yakını karbon içerikli olan bu yakıtların yanması ile açığa çıkan emisyonların zehirli olması, atmosferde bu emisyonların derişimindeki artış, asit yağmurları ve sera etkisini de beraberinde getirmektedir. Bu etkiler günümüzde daha da hissedilir bir boyuta ulaşmıştır. Bunlarda en önemlisi sera etkisi olarak görülmektedir. Bu etki özellikle CO₂'in atmosferdeki derişiminin artması ile bir doğal sera gibi güneş ışınlarını yerküreye hapsederek ısınmaya ve sıcaklık artışına yol açmaktadır. Her ne kadar bu sıcaklık artışı küçük değerlerde gerçekleşse de, ekolojik denge için önemli sonuçlar doğurmaktadır. Özellikle yerkürede ısıl anlamda pek çok fonksiyonlar taşıdığı düşünülen kutup bölgelerindeki buzulların erimesi, o bölgedeki ekolojik dengenin bozulmasını, iklimlerde anormal gelişmeleri (aşırı yağış, kuraklık, fırtına, kasırga vb.) beraberinde getirmektedir (Elsharnouby O ve ark., 2013).

Petrolün kullanımı sonrası ortaya çıkan bir diğer temel problem ise fosil kökenli oluşu ve bu nedenle tükenebilirliğidir. Bugün dünya enerji ihtiyacının %88'i fosil yakıtlardan (kömür, petrol ve doğalgaz) sağlanmaktadır. Bunun %38'ini petrol, %30'unu kömür ve %20'sini ise doğalgaz oluşturmaktadır. Tüketim hızının dünya nüfus artışı ile fazlalaşması mevcut petrol rezervlerini her geçen gün azaltmaktadır. Bazı araştırmalarda; bu rezervlere sadece on yıl gibi kısa bir ömür biçilmektedir. Bu süre ise aslında yeni bir enerji sisteminin kurulması ve yaygınlaşması için hiçte uzun değildir. Yani bu rezervlerin tükenmesi halinde ortaya alternatif bir yakıt ve enerji sisteminin kurulmasının gerekliliği ortadadır. Bu gerekliliğe rezerv sınırlılığı ile beraber çevresel faktörlerde eklendiğinde alternatif bir yakıtta duyulan ihtiyaç daha da fazlalaşmaktadır (Daim T ve ark., 2012; Narbel PA, 2013).

Alternatif bir yakıttan istenen temel karakteristikler özetle; yüksek ısıl değer, zehirli olmama, çevreyle uyumlu olma, farklı enerji dönüştürücülerinde kullanılabilme ve ekonomiklik olarak ifade edilebilir. Bu bakımdan Yakıt Pilleri; özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısında hızlı bir gelişim süreci sergilemiş yeni bir enerji üreticidir. Isı makinelerinde söz konusu olan “yakıt kimyasal enerjisi-ısı enerjisi mekanik enerji” dönüşümü yerini yakıt pilinde, “yakıt kimyasal enerjisi-elektrik enerji mekanik enerji” dönüşümüne bırakmaktadır. Yakıt pilinde yanma olmaksızın, elektrokimyasal bir dönüşüm ile elektrik üretilmektedir. Bu elektrik ise istenilen herhangi bir amaçla kullanılabilir (Balat M, 2010).

Karbondioksit salınımı olmaksızın yenilenebilir enerji kaynaklarından elektrik enerjisi üretimi en çok tercih edilen yöntemdir. Son zamanlarda, üzerinde en çok durulan alternatif enerji kaynağı olarak Mikrobiyal Yakıt Hücreleri (MYH) gösterilmektedir (Wei L ve ark., 2012). Mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektrik enerjisi üretilirken aynı zamanda atık arıtımı da yapılabilmektedir. Böylece, atık arıtımı için enerji harcanmamakta, aksine atık arıtımı sırasında doğrudan elektrik enerjisi üretilmektedir (Cai J ve ark., 2013; Sakdaronnarong CK ve ark., 2013).

1.1. Yakıt Hücreleri (Pilleri)

Yakıt hücreleri herhangi bir yakıt enerjisinden elektrik üretmeye yarayan dönüştürme cihazlarıdır. Pillerde olduğu gibi doğru akım elektriği üretirler, ancak elektrikle şarj edilmeyip, yakıt ikmallerini motorlarda olduğu gibi yakıt tanklarının doldurulmasıyla gerçekleştirirler (Mathe MK ve ark., 2012).

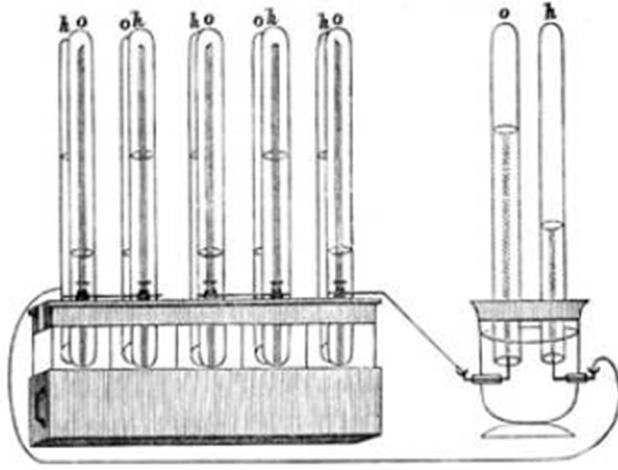
Yakıt hücreleri tek başına düşünüldüklerinde yeşil teknoloji sayılmazlar. Ancak teoride yakıtın kimyasal enerjisini elektriğe dönüştüren oldukça verimli bir yöntemdirler. Bu yöntemle herhangi bir yakıtın enerjisinin üçte ikisi (bazen daha da fazlası) elektriğe dönüştürülebilir. Geri kalan enerji ise ısı enerjisi olarak açığa çıkar. Son zamanlarda ulaşım araçlarında kullanımlarıyla ön plana çıkmış olsalar da, yakıt hücreleri başka alanlarda da kullanılarak enerjiyi mevcut teknolojilerden çok daha verimli bir şekilde dönüştürebilir. Yakıt hücrelerinin kullanımının yaygınlaşmasının önündeki en büyük engel ise performans ve dayanıklılık açısından kullanılabilir modellerinin pahalılığıdır (<http://www.lowcarbonturkey.com/p=440>).

1.1.1. Yakıt Pillerinde Kullanılan Yakıtlar

Yakıt hücresinde bulunabilecek en basit yakıt hidrojenidir, çünkü bütün yakıt hücreleri hidrojeni kolaylıkla oksijenle (genellikle havada bulunan) tepkimeye sokup elektrik üretebilir (su ile ısı da süreçte açığa çıkar). Diğer fosil yakıtlar (petrol, doğal gaz gibi) ve yenilenebilir yakıtlar da (biyodizel, biyogaz gibi) yakıt hücrelerinde kullanılabilir. Bu yakıtlar ya doğrudan ya da yakıt işleme cihazı diye bilinen reformerler yardımıyla hidrojene dönüştürüldükten sonra kullanılırlar (Fıçıcılar B, 2008).

1.1.2. Yakıt Pillerinin Tarihçesi

Yakıt pillerinin gelişimi 150 yıldan beri devam etmektedir. İngiltere Swansea'da yaşayan Avukat William Grove yakıt pillerinin gerçek mucididir. Seyreltik sülfürik asit ile yaptığı ilk hidrojen-oksijen yakıt pili 1839 yılında Philosophical Magazine dergisinde yayınlanmıştır (Bıyıköğlü A, 2003).



Şekil.1.1. 1839 yılında Sir William Grove tarafından geliştirilen yakıt hücresi (<http://www.muhendisforum.net/index.php.topic=703.0>)

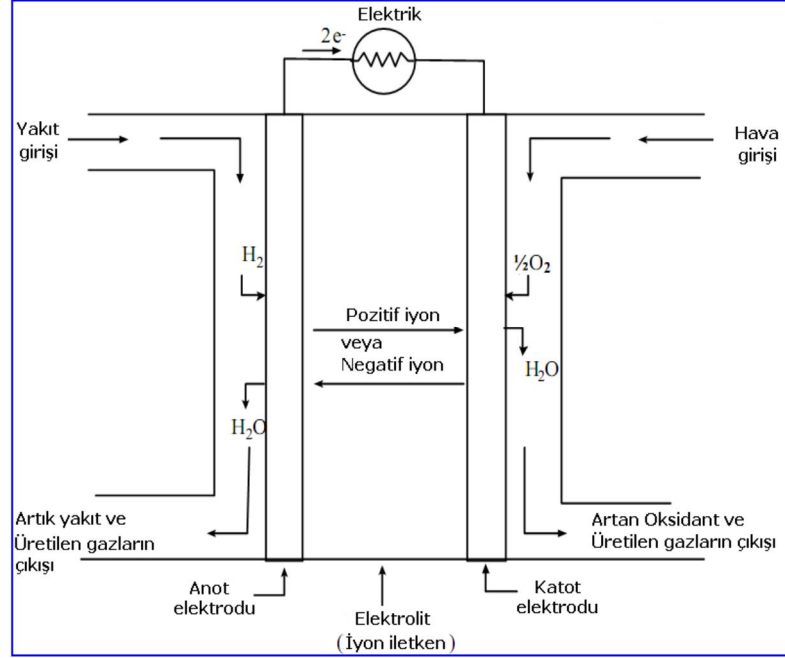
Yakıt pilleri “Gemini” ve “Apollo” mekiklerinde kullanılmıştır, günümüzde de uzay istasyonları için elektrik ve su sağlamaktadır (Bıyıkoğlu A, 2003).

1.1.3. Bir Yakıt Hücresinin Çalışma Prensibi

Yakıt pilleri yakıtın enerjisini direkt olarak elektrokimyasal yolla elektrik enerjisine çevirirler. Anot oksidasyon ve katot redüksiyon olaylarını sağladığı zaman yakıt pilleri sürekli bir batarya gibi çalışır. Aynen batarya gibi sessiz ve hareketsizdir. Fakat bataryadan iki konuda farklıdır. Birincisi; tehlikeli maddeler içermez ve kirletmeksizin yenilenebilir. İkincisi ise; bir yakıt kaynağı olarak kullanılmasıdır (Sieniutycz S ve Jezowski J, 2013).

Yakıt pilinin çalışması için hidrojen – oksijen veya hidrojen – hava gereklidir. Bir yakıt pilinin merkezi iki elektrot arasına yerleştirilmiş elektrolitten meydana gelmiştir. Hava, katot yüzeyi üzerinden geçer. Elektronlar katota doğru bir dış devre yoluyla taşınırken hidrojen iyonları da elektrolit yoluyla oksijen elektrotta göç ederler. Katotta oksijen ve hidrojen iyonları ile elektronların reaksiyona girmesiyle su elde edilir. Elektronların dış devre yoluyla akışı ile elektrik üretir. Yakıt kullanımındaki yüksek verim nedeniyle, bu elektrokimyasal işlemde çıkan yan ürünler sıcaklık, ısı, buhar halinde su ve anottan katota elektron akışından doğan elektrik akımıdır (<http://www.fuelcells.org/basics/how.html>).

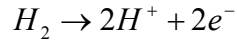
Yakıt pili 3 temel kısımdan meydana gelir. Anot (negatif elektrot), katot (pozitif elektrot) ve bu iki elektrot arasında kalan elektrolit (değişim zarfı).



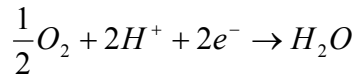
Şekil 1.2. Bir yakıt pilinin genel yapısı ve işleyişi (Wang Y ve ark., 2011)

Yakıt hücresi çalışma prensibi suyun elektrolizinin tam tersidir. Yakıt hücresi için reaksiyon formülü aşağıdaki gibidir:

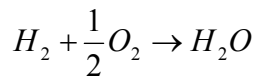
Anotta



Katotta

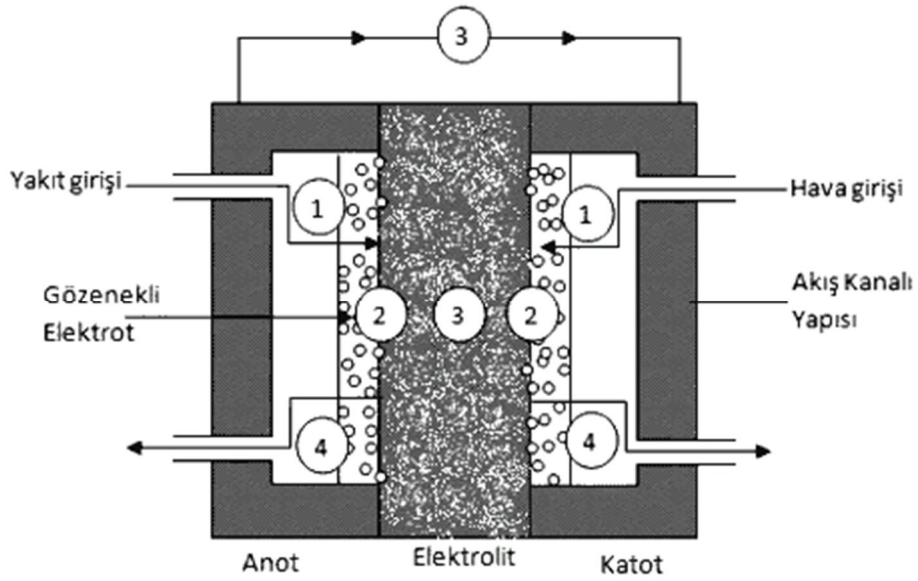


Toplam Reaksiyon



Yakıt pilinde meydana gelen süreçler (Fıçıcılar B, 2008):

1. Yakıt pilinde reaktantların (tepkimeye giren maddeler) aktarımı
2. Elektrokimyasal reaksiyon
3. Elektrolit aracılığıyla iyonik iletim ve dış devre aracılığıyla elektronik iletim
4. Yakıt pilinden ürünlerin aktarılması (uzaklaştırılması) süreci



Şekil 1.3. Elektrğin elektrokimyasal üretiminde yer alan temel aşamaları gösteren yakıt pili kesiti (1) reaktant aktarımı; (2) elektrokimyasal reaksiyon; (3) iyonik ve elektronik iletim; (4) ürün aktarımı

1. AŞAMA: *Reaktant Aktarımı.* Yakıt pilinin elektrik üretebilmesi için sürekli yakıt ve oksitleyici yakıt pili sistemine beslenmelidir. Bu oldukça basit gözükse de süreç çok karmaşık olabilmektedir. Yakıt pilinden yüksek akım çekildiğinde çok fazla yakıt ve oksitleyiciye gereksinim olmaktadır. Reaktantlar yakıt piline yeterince hızlı beslenemezse sistem yakıt ve oksitleyici açlığı içinde olacaktır. Reaktantların verimli bir şekilde aktarılması akış kanalı yapısıyla ve gözenekli elektrotlar aracılığıyla sağlanmaktadır.

2.AŞAMA: *Elektrokimyasal Reaksiyon.* Reaktantlar elektrotlara taşındığında elektrokimyasal reaksiyon olmaktadır. Yakıt pilinde üretilen akım bu yarı elektrokimyasal reaksiyonların hızıyla doğrudan ilişkilidir. Hızlı reaksiyonlar sonucu yakıt pilinden daha çok akım elde edilebilmektedir ve tersini de düşünürsek yavaş reaksiyon olursa yakıt pilinden elde edilen akım da düşük olacaktır. Amaç elektrik üretimi olduğuna göre yüksek akımlar elde etmek yakıt pilindeki sonul hedeflerden biridir. Bu nedenle, elektrokimyasal reaksiyonları hızlandırmak ve verimini arttırmak için katalizörler kullanılmaktadır.

3. AŞAMA: *İyonik ve Elektronik İletim.* 2. Aşamada gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar iyon ve elektronları ya üretmektedir ya da tüketmektedir. Bir elektrotta üretilen iyonlar diğer elektrotta tüketilmektedir. Bu süreç elektronlar için de geçerlidir. Yük dengesini sağlayabilmek için iyonlar ve elektronlar üretildikleri yerden tüketildikleri yere aktarılmak zorundadır.

4.AŞAMA: *Ürün Aktarımı.* Oluşan elektriğin yanı sıra bütün yakıt pili reaksiyonları en azından bir ürün oluşturacaktır. Bunlardan H₂-O₂ yakıt pilleri ürün olarak su oluşturmaktadır.

1.1.4. Yakıt Hücresi Çeşitleri

Yakıt hücre sistemleri genellikle kullanılan elektrolite göre sınıflandırılırlar. Elektrolit; protonların katoda geçmesine izin verirken elektronların geçmesini engeller. Kullanılan elektrolit türü gerçekleşecek kimyasal reaksiyonları ve çalışma sıcaklık aralığını belirler (Nielsen ve Thomas, 2002);

1. Proton değişim membranlı (PEM) veya katı polimer elektrolitli yakıt pili (SPEFC)
2. Alkali yakıt pili (AFC)
3. Fosforik asit yakıt pili (PAFC)
4. Erimiş karbonat yakıt pili (MCFC)
5. Katı oksitli yakıt pili (SOFC)
6. Biyolojik yakıt pili (Mikrobiyal yakıt pili) (MFC (MYH))

1.1.5. Yakıt Pillerinin Kullanım Alanları

Yakıt pilleri teknolojisinin yüksek verimi ve modüler yapısıyla elektrik enerjisi üretiminde çığır açacağı ön görülmektedir. Yüksek verimli bir kimyasal yakıt-elektrik enerjisi dönüşüm yöntemi olduğundan, güneş enerjisi, termonükleer enerji gibi birincil derecedeki enerji kaynaklarından kimyasal yakıt elde edilerek tüketiciye bu şekilde ulaştırılması ve tüketim ortamında yakıtın tekrar elektrik enerjisine dönüştürülmesi pratik bir enerji dönüşümünü ifade etmektedir. Ayrıca yakıt pillerinin kömür dahil her türlü yakıtı kullanabilme avantajı, birinci derece hidrokarbon yakıtlarının yakıt pilleriyle kullanılabilme olasılıkları, içten yanmalı motorlara göre de cazip kılmaktadır (Andújar JM ve Segura F, 2009).

Yakıt pilleri, yüksek çalışma verimleri ve yanma reaksiyonuna göre çok daha kontrollü olarak oluşturulan elektrokimyasal dönüşüm reaksiyonu nedeniyle kükürt ve azot oksit emisyonunu sıfıra yakın değerlere düşürürken, karbondioksit emisyonu da azaltmaktadır. Bu ise atmosferimizdeki sera etkisinin gittikçe önem kazandığı günümüzde oldukça önemli bir faktördür (Mekhilef S ve ark, 2012).

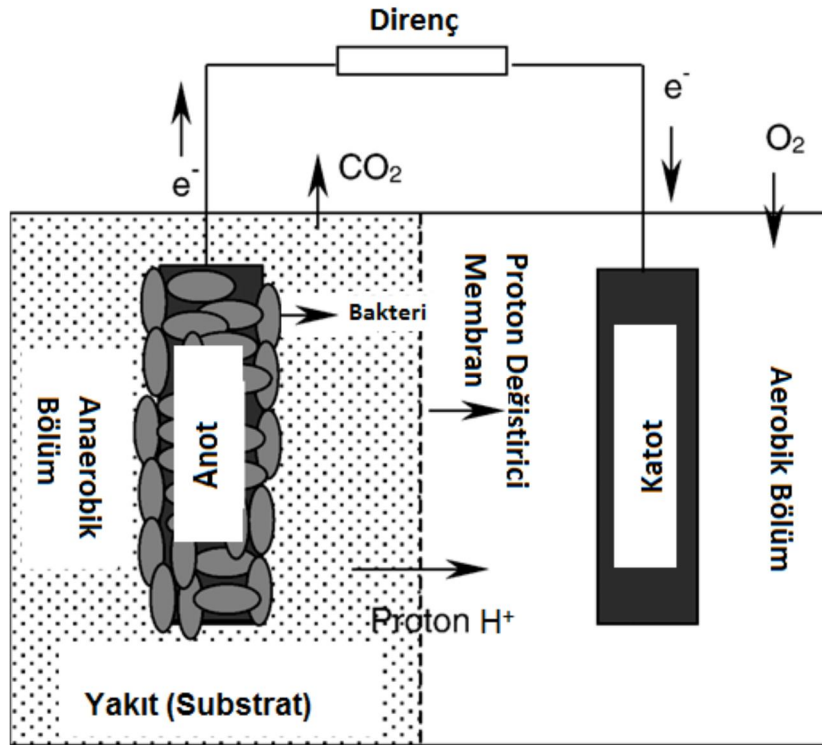
Yakıt pillerinin şu andaki en önemli uygulama alanı ulaşım endüstrisinde içten yanmalı motorlara bir alternatif olarak geliştirilmesidir. Dünyadaki hemen hemen tüm otomobil şirketleri yakıt pilleri sistemleri üzerinde çalışmaktadırlar. Elektrik enerjisi üretim alanında yakıt pillerinin ağırlığını hissettirmesi belli bir zaman alacaktır (Barbir F, 2013).

1.2. Mikrobiyal Yakıt Pilleri

Fosil yakıtların hızlı tüketimi ve yenilenebilir olmadığı göz önüne alındığında, alternatif enerji kaynaklarının bulunması zorunlu olmaktadır. Bu bağlamda, karbondioksit salınımı olmaksızın yenilenebilir enerji kaynaklarından elektrik enerjisi üretimi en çok tercih edilen yöntemdir. Son zamanlarda, üzerinde en çok durulan alternatif enerji kaynağı Mikrobiyal Yakıt Hücreleri (MYH)'dir (Mohan Y ve ark., 2008; Samrot AV ve ark., 2010). MYH en basit şekliyle, organik atıklarda bulunan kimyasal enerjinin mikroorganizmalar yardımıyla elektrik enerjisine dönüştürülmesi olarak tanımlanabilir (Du ve ark., 2007; Mohan Y ve ark., 2008; Aldrovandi A ve ark., 2009; Sharma V ve Kundu PP, 2010; Xia X ve ark., 2010). Mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektrik enerjisi üretilirken aynı zamanda atık arıtımı

da yapılabilmektedir. (Du ve ark., 2007; Daniel DK ve ark., 2009; Guerrero AL ve ark., 2010; Sharma V ve Kundu PP, 2010).

Şekil 1.4.'de elektrik enerjisi üretimi amacıyla kullanılan klasik bir MYH şeması verilmiştir (Kılıç A ve ark., 2011). MYH; katot ve anot adı verilen iki bölmeden oluşan ve birbirinden proton değiştirici membran (seçici geçirgen zar) ile ayrılan bir sistemdir. Anot hücrelerinde bulunan elektrot yüzeyine tutunarak büyüyen mikroorganizmalar, organik maddeleri oksitleyerek elektron ve proton (hidrojen) üretirler. Anot bölgesinde üretilen elektronlar, elektrot yüzeyinden bir devre ile katot bölgesine aktarılır. Hidrojen ise difüzyon ile proton değiştirici zardan geçerek katot bölgesine ulaşır ve burada oksijen (başka bir elektron alıcısı da kullanılabilir) ile birleşerek suya dönüşür. Kuvvetli bir elektron alıcısı olan O_2 'nin varlığı ve pozitif elektrik yükü oluşturan H^+ iyonları sayesinde, anottaki elektronlar katoda doğru çekilir, bu da hat üzerinde elektrik akımı oluşturur (Min B ve ark., 2005; Aldrovandi A ve ark., 2009; Guerrero AL ve ark., 2010; Mohan Y ve ark., 2008). MYH' lerde anot bölgesi tamamen anaerobik, katot bölgesi ise aerobiktir.



Şekil 1.4. Mikrobiyal yakıt hücresi yapısı (Du ve ark., 2007).

1.2.1. Mikrobiyal Yakıt Hücresinde Anot

Anot bölümü; belirli mikroorganizmaların çoğalması için bütün gerekli şartları sağlayan gelişme bölümüdür. MYH'nin anodu olarak rol oynayan bir elektrod, bakteri, medyatör (medyatörlü ve medyatörsüz MYH olma durumuna bağlıdır (Mohan Y ve ark., 2008)) ve büyüme ortamından (glukoz vb.) oluşmaktadır. Bu bölmedeki bakteriyel büyümeyle; metabolik reaksiyonlar boyunca gerekli olan protonlar ve elektronlar üretilir. Anot olarak, genellikle grafit elektrotlar kullanılır. Anot elektrotların bazıları, elektriksel verimliliği artıran, redoks potansiyelini ise azaltan, Fe iyonları, Mn iyonları, vb. elemanlarla kaplanmışır (Liu H ve Logan BE, 2005). Ayrıca, elektron transfer etkinliğini artırmak için çeşitli medyatörler de bulunabilmektedir.

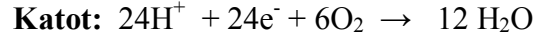
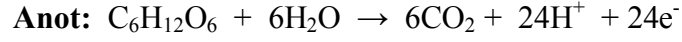
Anot bölümünde bakteriler oksidatif dönüşüm gerçekleştirirken, katot bölümünde kimyasal indirgeme prosesleri gerçekleşmektedir. Aerobik koşullar altında, mikrobiyal yakıt hücresinin anodunda oksijen mevcut değildir ve bakteriler, mikrobiyal yakıt hücresi anodu gibi, doğal elektron alıcılardan çözünmez bir alıcıya dönüşmeye ihtiyaç duyarlar. Bakterilerin çözünmez bir elektron alıcısına elektronları transfer etmedeki yeteneğinden dolayı, mikrobiyal metabolizmadan meydana getirilen elektronları toplamak için mikrobiyal yakıt hücresi kullanılabilir (Ates A, 2012).

Elektron transferi membran-bağlı elektron taşıyıcıları, çözünür elektron aktarıcılar veya nano teller ile gerçekleşebilir. Anot, ortamda üretilen elektronların alıcısı veya taşıyıcısı görevini görür. Daha sonra elektronlar katotta bir yük veya dirençle bir elektrik devresinden akar. Elektron akışı ile birlikte anot ve katot arasındaki potansiyel fark, elektrik gücünün oluşumu ile sonuçlanır (Ates A, 2012).

1.2.2. Mikrobiyal Yakıt Hücresinde Katot

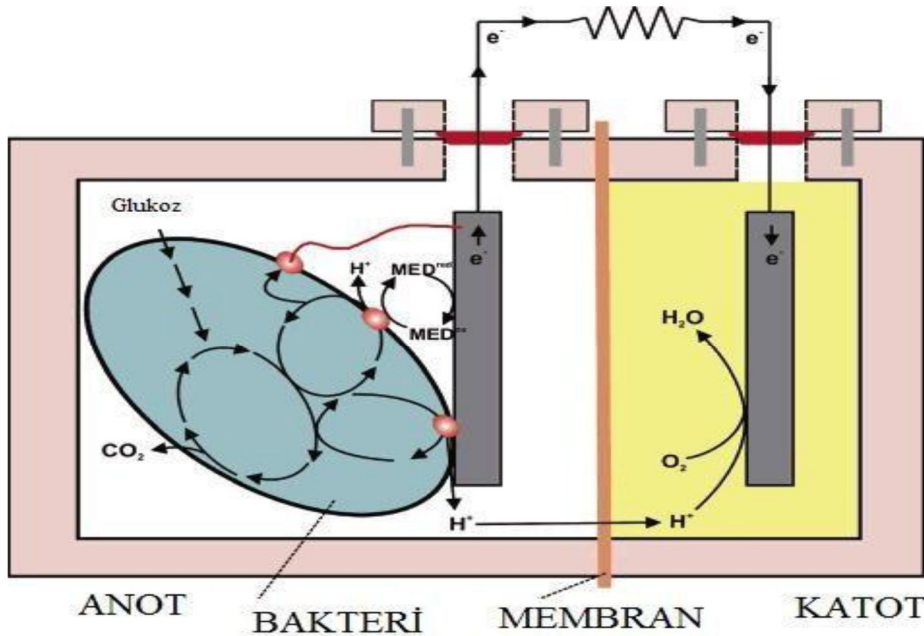
Katot bölümü; harcanan elektronlar, protonlar ve oksijen molekülleri için rekombinasyon kısmıdır. Alternatif olarak, bu bölmede; elektron alıcısı olarak rol oynayan ferrisiyanid gibi bileşenler de kullanılabilir (Oh S ve ark., 2004). Katyon değiştirici; reaksiyonun tamamlanması için, anot ve katot bölümleri arasında, ayırıcı olarak rol oynar (Logan BE ve ark., 2006).

Protonlar, katotta, proton veya katyon değiştirici membran aracılığıyla akarlar. Katotta, bir elektron alıcısı kimyasal olarak indirgenir. İdeal olarak, oksijen suya indirgenir. Glukozun substrat olarak kullanıldığı bir mikrobiyal yakıt hücresinde anot ve katotta gerçekteşen reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Mohan Y ve ark., 2008):



Toplam Reaksiyon: $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O + \text{Elektrik enerjisi}$

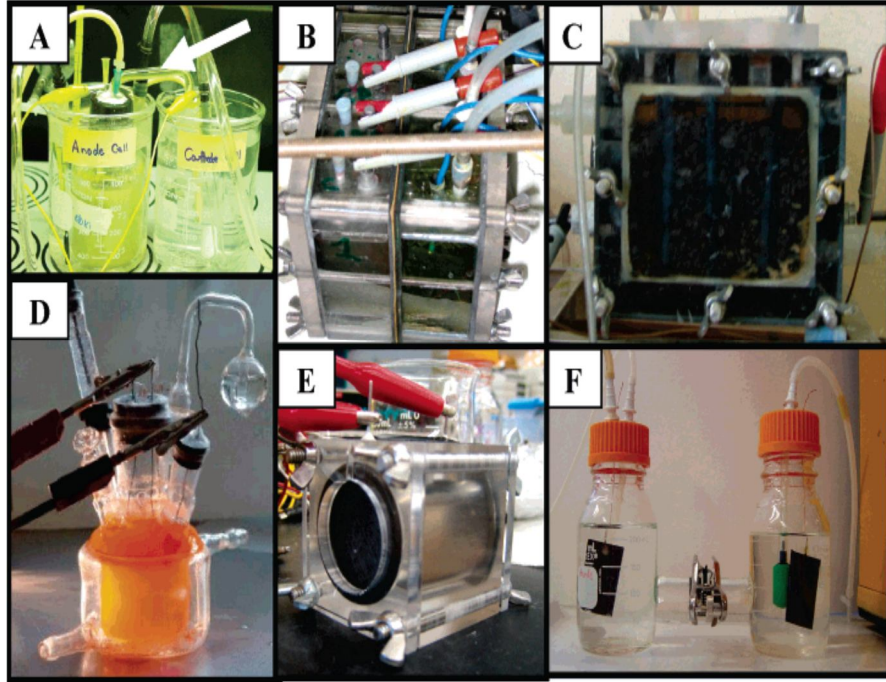
Bu sistemde; glukoz anot bölümünde bakteriler tarafından karbondioksit'e yükseltgenmektedir. Burada oluşan protonlar anottan katoda bir katyon değiştirici membran aracılığıyla taşınırken, elektronlar elektriksel bir devre aracılığı ile taşınmaktadır. Katotta ise, O_2 suya indirgenmektedir. Şekil 1.5.'de glukozun substrat olarak kullanıldığı bir mikrobiyal yakıt pilinde gerçekteşen olaylar özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Glukozun substrat olarak kullanıldığı bir MYH' de gerçekteşen olaylar (Logan BE ve ark., 2006).

1.2.3. Mikrobiyal Yakıt Hücresi Çeşitleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda pek çok farklı MYH reaktör tipleri kullanılmıştır. Bunlar; genellikle iki bölmeli, H tipi MYH reaktörleri, U borulu MYH reaktörleri, borusuz MYH reaktörleri, çökel tipi MYH reaktörleri ve tek bölmeli MYH'leridir.



Şekil 1.6. Çalışmalarda kullanılan MYH tipleri. (A) Bir tuz köprüsü içeren, yapımı kolay sistem (Min B ve ark., 2005); (B) Cıvatalarla birbirine tutturulmuş ve bir tüp olmadan, odaları membranla ayrılmış dört- yığın tip MYH (Rabaey K ve ark., 2005); (C) B gibi fakat anod boyunca devamlı akış sağlayan (taneli grafit matriks) ve yakın anot-katot yerleşimi (Ossieur W ve ark., 2005); (D) Fotoheterotrofik tip MYH (Rosenbaum M, 2005); (E) Tek bölümlü, basit bir tüp düzenlemesinde hava-katotlu sistem (Liu H ve Logan B, 2004); (F) İki bölümlü, gaz dağıtımı için donatılan anot ve katot bölümlerini gösteren H-tipi sistem (Logan B ve ark., 2005).

1.2.4. Mikrobiyal Yakıt Hücresinde Kullanılan Mikroorganizmalar

MYH kullanarak elektrik üretmek için bakteriler ya da mayalar kullanılabilir. Mikroorganizmaların çoğu elektrokimyasal olarak inaktiftirler. Mikroorganizmalardan elektroda, elektron transferi; metil moru, metil mavisi, humik

asit, nötral kırmızısı, tiyonin vb.mediyatör sayesinde kolaylaştırılmaktadır (Delaney ve ark., 2008). Böyle MYH; mediyatörlü -MYH olarak adlandırılır. Mevcut mediyatörlerin çoğu pahalıdır ve toksiktir. Diğer taraftan, mediyatörsüz- MYH'leri; elektrotta elektronları transfer etmek için elektrokimyasal olarak aktif bakterileri kullanırlar ve bu yüzden bir mediyatöre ihtiyaç duymazlar. Rabaey ve ark., anodofilik konsorsiyuma uyumlu olan mikrobiyal topluluklardan bahsetmişlerdir (Rabaey ve ark., 2003).

Tablo 1'de; mikrobiyal yakıt hücresinde kullanılan mikroorganizmalar substratlarıyla beraber listelenmiştir (Solanki K ve ark., 2013). Bugüne kadar, *Geobacter* (Richter ve ark., 2008), *Enterobacter* (Rezaei ve ark., 2009), *Shewanella* (Watson ve Logan, 2010) ve *Bacillus* (Nimje ve ark., 2009) türü bakterilerin MYH'deki maksimum güç çıkışları ve elektrik enerjisi üretimleriyle ilgili deneyler yapılmıştır. Karışık kültürler; strese karşı daha dirençli olmaları ve besinsel adaptasyonlarının yüksek olmasına bağlı olarak daha dayanıklı ve kararlı olduklarından günümüz MYH'inde saf kültürlerle nazaran daha çok karışık kültürler tercih edilmektedir. Fakat Kiely ve ark. tarafından oluşturulan çalışmada; *Shewanella* (MR-1)'in karışık bir kültürden daha fazla güç yoğunluğu ürettiği gösterilmiştir (Kiely ve ark., 2010). Bu durum; karışık kültürlerin mekanizmaları ile kıyaslandığında, MR-1 tarafından kullanılan farklı elektron transfer mekanizmaları nedeniyle olabilir. Fakat, karışık kültürlü MYH sistemler ile saf kültürlü olanlar arasında diğer tüm şartlar aynı tutulmadığı sürece doğrudan kıyaslama yapmak mümkün değildir. Aksine, MYH'de tek bir türün kullanımı; hem mekanistik hem de fizyolojik detayları doğrudan gözlemlemeye izin verir (Lanthier ve ark., 2008).

Tablo 1. MYH'lerinde kullanılan mikroorganizmalar (Solanki K ve ark., 2013)

Substrat	Mikroorganizmalar	Uygulama
Glukoz	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Elektron medyatörü olarak tiyonin yada nötral kırmızısı Park ve ark. (1999)
Asetat	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Medyatörsüz MYH Pham ve ark. (2003)
Sukroz	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Medyatör olarak sülfat/sülfid Ieropoulos ve ark. (2005)
Nişasta, glukoz,	<i>Clostridium butyricum</i>	Fermentatif bakteriyum laktat, melas Niessen ve ark.(2004)
Glukoz, sukroz	<i>Escherichia coli</i>	Medyatör olarak metilen mavisi ve Ieropoulos ve ark. (2005)

Tez çalışmamızda; *Enterobacter aerogenes* ile onun rekombinant suşları (*Ea puc8*, *Ea puc8:15*) kullanılmıştır. *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacteriaceae* familyasına aittir. Bu familyadaki bakteriler; spor oluşturmazlar, Gram negatifirler. Bazıları kapsüle sahiptirler. Bunlar; çeşitli besiyerlerinde, özellikle de 37 derecede çok iyi ürerler.

E.aerogenes; fermentatif hidrojen üretiminde dolayısıyla alternatif enerji üretiminde en yaygın çalışılan model türlerden biridir. *E.aerogenes*'in bir hidrojen üreticisi olduğunu keşfeden ilk araştırmacı, onu topraktan izole eden Tanisho'dur (Tanisho ve ark., 1983). Bundan sonra, Tanisho'nun grubu, 1980 ve 1990' lar

boyunca hidrojen üretiminde *E.aerogenes*'in temel fermentasyon özelliklerini çalışmışlardır (Tanisho, 2000; Tanisho ve ark., 1987).

Önemli miktarda hidrojen üretmesi nedeni ile enerji çalışmalarında tercih edilen *E. aerogenes*; aşağıdaki avantajlara sahiptir (Zhang C ve ark., 2011):

- (1) Fakültatif bir anaerob olarak, *E.aerogenes*, zorunlu anaerob olanlara göre, oksijenli ortamda büyüme avantajına sahiptir.
- (2) Hidrojence yoğun bir atmosferik ortamda büyüme özelliğine sahiptir.
- (3) Nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) yolu sayesinde (10 mol H₂/mol glukoz) yüksek bir hidrojen üretim oranına sahiptir.

1.3. *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni (*vgb*)

Vitreoscilla Hemoglobin Geni (*vgb*) promotor- operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru oksijene duyarlı bir promotor olup aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar. Güçlü bir promotor olan *vgb* promotoru -35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribov kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlanma bölgesine benzer bir bölge vardır (Erenler Ş, 2007).

VHb geni (*vgb*) *E.coli* (Khosla C ve Bailey JE, 1988), *Enterobacter aerogenes* (Dikshit KL ve ark., 1989), *Saccharomyces* türleri (Magnolo SK ve ark., 1991) ve tütün bitkisi (Holmberg N ve ark., 1997; Farres J ve Kallio PT, 2002) gibi farklı sistemlere klonlanarak hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb hemen hemen tüm klonlanmış olduğu hücrelere daha iyi bir oksijen alımı ve kullanım potansiyeli kazandırırken bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçlar rapor edilmiştir (Erenler Ş, 2007).

VHb sentezinin oksijene duyarlı *vgb* promotoru nedeniyle, doğal konakçıklarında ve klonlandığı organizmalarda düşük oksijenli ortamlarda yüksek oranda gerçekleştiği ve VHb senteziyle beraber organizmaların büyüme ve

gelişimlerinin arttığı kaydedilmiştir. Üretimleri belli seviyede oksijen gerektiren çeşitli metabolitler ve rekombinant proteinler de VHb/ *vgb* sistemi taşıyan organizmalarda önemli artışlar göstermiştir (Gould JL, 1999; Zhang Y ve ark., 2002). Dolayısıyla endüstriyel kullanımda bu proteinin özellikle bazı mikroaerobik fermentasyonlar için etkili bir ajan olarak kullanılabilmesi ortaya atılmıştır.

Daha önceki çalışmalar *Vitreoscilla* hemoglobini taşıyan rekombinant bakterilerin kontrol konakçılara göre on kata varan daha yüksek oksijen alımı yaptıkları ve hücrelerin daha okside durumda olduklarını göstermiştir (Tsai PS ve ark., 1996; Zhang Y ve ark., 2002). VHb içeren hücrelerin kontrollere göre daha okside durumda olmaları, bu hücrelerin daha etkin bir solunuma sahip olmasına ve TCA gibi metabolik yolları ve solunum zincirini daha etkin kullanmasına bağlanmıştır (Tsai PS ve ark., 1996). Bu anlamda, VHb içeren bakterilerin kontrollerine göre daha yüksek bir ATP düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. *vgb*'nin bakterilerde önemli bir etkisi de metabolik yol açısından olmuştur. *vgb* taşıyan bakteriler pentoz fosfat yolunu tercih etmektedirler ve yüksek hücre yoğunluğu göstermektedirler (Erenler Ş, 2007).

1.4. Enerji Üretiminde Atık Kullanımı

Enerji üretimi için bir atık/atıksuyun etkili hammadde olarak nitelendirilebilmesi için ölçüt; yüksek derişimde parçalanabilir organik bileşiklerin bulunması, şeker ve karbonhidratlar gibi kolaylıkla fermente olabilen bileşiklerin yüksek oranda bulunması ve mikrobiyal aktiviteye inhibitor olabilen bileşiklerin düşük derişimde bulunmasıdır. Gıda endüstrisinden gelen atıksular bu üç ölçütü sağlamaktadır. Herhangi bir ön arıtım uygulamaksızın gıda endüstrisi atıklarından oldukça yüksek enerji verimleri elde edilmiş. Ancak birçok durumda süreçte inhibisyona neden olan yüksek organik yüklemeyi düşürmek için ham atık seyreltilmiştir. Ayrıca bu tür atıklar süreçte üremeyi sınırlayabilen oldukça karmaşık kimyasal içerikte de olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Ntaikou ve ark., 2010). Bu tür atıkların farklı içeriğe sahip olmasından dolayı enerji üretim performansında çok büyük değişim gözlenmiştir (Guo ve ark., 2010).

Mutfak, gıda işleme ve kentsel atıklar, karbonhidratdan farklı olarak oldukça yüksek derişimde protein ve yağa sahiptirler, bu yüzden bu atıkların enerjiye dönüşüm verimliliği, karbonhidrat esaslı atıklardan elde edilen değerden önemli

ölçüde düşüktür. Yapılan çalışmalar bu durumu proteinin biyoparçalanması ile oluşan azotun hidrojeni tüketip amonyum oluşturmaya bağlamıştır (Ntaikou ve ark., 2010).

Karbonhidratlar ve peptonlar gibi organik bileşikler, enerji üretimi için kolaylıkla parçalanabilen maddelerdir (Guerrero AL ve ark., 2010).

Bu çalışmada kullandığımız atık/atık sulara; melas ve peynir altı suyu örnek verilebilir. Melas; anaerobik şartlarda parçalanması kolay olan ve gıda endüstrisinde çok kullanılan şeker fabrikalarının atığıdır. Yaklaşık olarak % 53 oranında şeker içerir (Ren ve ark., 2006). Yüksek şeker oranına sahip olması enerji üretimi için iyi bir alternatif substrat yapmıştır. Melasın mikrobiyal fermentasyonundan oluşan çözünür yoğunlaşmış melas; çok sayıda çeşitli mikroorganizmayı, bakteriyel büyüme için gerekli besinleri ve mikrobiyal proteinleri, amino asitleri, organik asitleri, vitaminleri ayrıca koenzimler gibi diğer fermentasyon ürünlerini içerir (Lay ve ark., 2010).

Herhangi bir hayvanın sütünün peynir yapılmasından sonra geride kalan sıvıya "peynir altı suyu" denir. Peynir sütün pıhtılaşmasıyla yapılır. Pıhtılaşmadan sonra oluşan katı kısımdan (lor) ayrılan sıvı peynir altı suyudur. Bu su; protein, vitamin ve minerallerin yanında yaklaşık olarak süt laktozunun % 50'sini de içermektedir. (Erenler Ş, 2007).

1.5. Biyo-Elektrokimyasal Sistemin Tarihi

Elektrik ve biyoloji arasındaki ilk bağlantı; 1791'de, ayrılmış kurbağa bacaklarının, sabit bir elektrik jeneratörüne bağlı olan kas ve sinir uçlarını, kastıklarını keşfeden Luigi Galvani tarafından yapılmıştır (Kipnis, 1987; Bullen ve ark., 2006). Aynı dönemde, yakıt hücre kavramı ise; oksijenle hidrojen gazını başarılı şekilde birleştirerek su ve bir elektrik akımı üreten W.R. Grove tarafından geliştirilmiştir (Grove, 1839). M.C Potter, bir elektrik akımı üretebilen bakterilerin olduğu ihtimalini göstererek, mikrobiyal topluluklardan düşük elektrik miktarlarının elde edilebildiğini gözlemlediğinde, bir hücresel yapı ile mikroorganizmalar arasındaki ilişki 1911'e kadar fark edilmiş değildi (Potter,1911; Bullen ve ark., 2006). Bu keşif; mikroorganizmalar tarafından katalizlenen anodik ve/yada katodik reaksiyonlarda meydana gelen biyoelektrokimyasal sistemi açıklamayı sağlamıştır. Eğer ki elektrik;

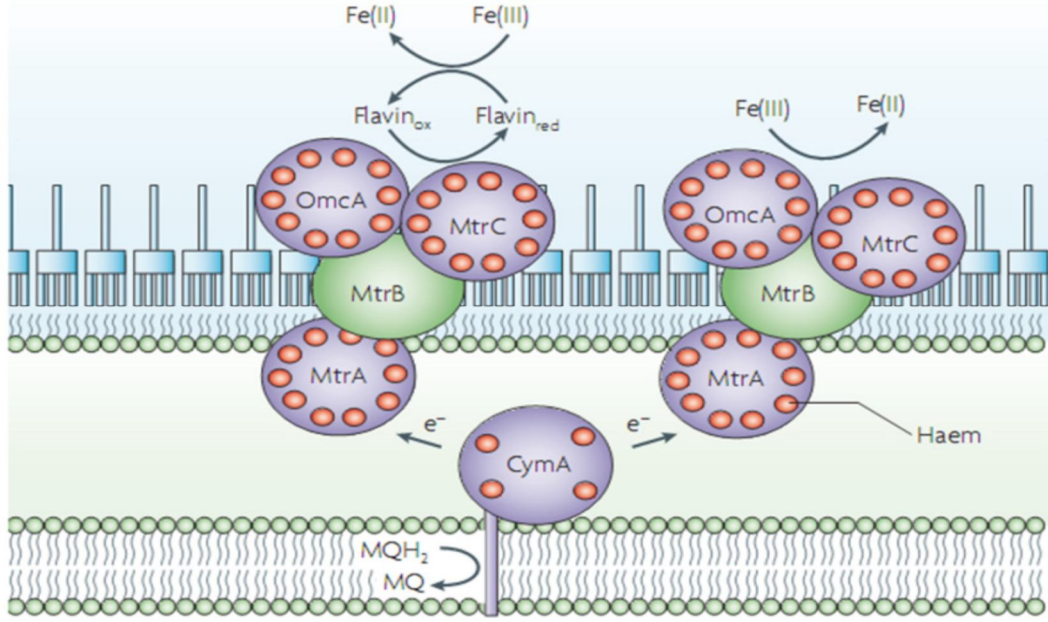
bir biyoelektrokimyasal sistem (BES) vasıtasıyla üretiliyorsa o zaman mikrobiyal yakıt hücre terimini kullanmak doğru olacaktır (Rabaey ve ark., 2003).

1.6. MYH Sistemlerinde Elektronların Bakteriden Elektrota Taşınma Mekanizmaları

1.6.1. Doğrudan Elektron Transferi

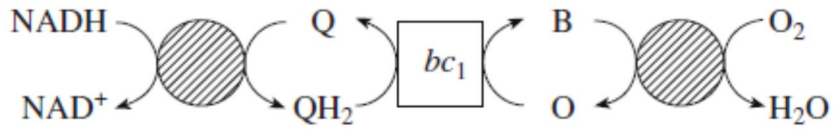
Doğrudan elektron transferi, mikroorganizmaların hücre membranları ya da pili yapılarıyla, anot elektrot yüzeyi ile yapmış oldukları fiziksel temas aracılığıyla yapılan elektron taşınımıdır. Hücre membranı ile taşınım sitokrom-c proteinleri aracılığı ile olurken, pili aracılığı ile yapılan taşınım nanowire'lar aracılığıyla olmaktadır. Nanowirelar bazı bakterilerin oluşturduğu, elektrokimyasal olarak aktif olduğu kanıtlanan spesifik bir pildir (Gezginci M ve ark., 2011).

Doğrudan elektron transferinin gerçekleşmesi için membran bağımlı elektron taşıma proteinlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu proteinler bakterinin içerisinde yer alan elektronların, hücre dışı membranda yer alan ve dış ortamda bulunan katı elektron alıcıya (metal oksit ya da MYH anotu gibi) iletilmesini sağlayan bir redoks proteinine iletirler. Bu sistem hücre membranı ile taşınım yapan organizmalarda Mtr solunum yoludur. Bu yolda 5 ana protein bileşeni (OmcA, MtrC, MtrA, MtrB, ve CymA) tanımlanmıştır (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Mtr Yolu (Fredrickson JK ve ark., 2008)

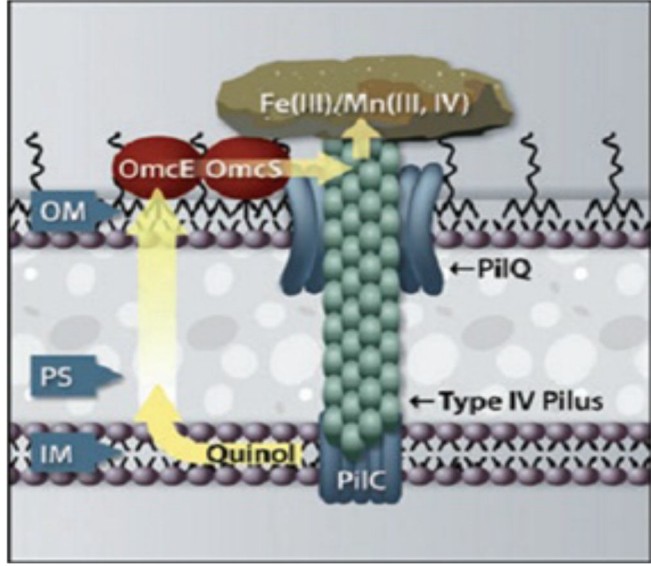
Shewanella spp. türleri, hücre membranı ile doğrudan elektron transferi yaparlarken, *Geobacter spp.* türleri pilileri aracılığı ile doğrudan elektron transferi yapmaktadır. *Enterobacter*'lerde ise nitrat nitrit üzerinden nitrit redüktaz yardımıyla amonyuma kadar indirgenir; redüksiyon sırasında ara ürün oluşmamakta ve 6 elektron taşınmaktadır. Böylece oksijen olmadığı zaman nitrat, hidrojen alıcı terminali gibi işlev görmektedir (Lengeler JW ve ark., 2005).



Şekil 1.8. Enterobakteriyel elektron transfer zincirinin şematik tasarımı. NADH/NAD⁺; sitoplazmada indirgenmiş eş değerli molekülleri transfer eden metabolik ara ürünlerdir; QH₂/Q; membranda indirgenmiş eş değerli molekülleri transfer eder; bc₁ ise; periplazmik sitokromu içeren komplekstir (Debabov VG, 2007).

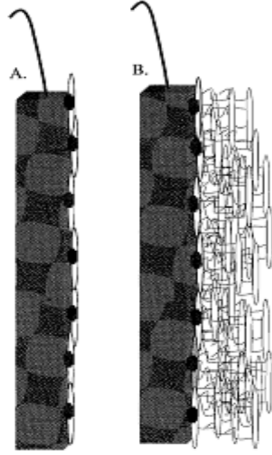
Pili aracılığı ile yapılan elektron taşıma sistemi hücre membranı ile yapılan taşınımına benzer şekilde olmaktadır. Pili ile yapılan taşınımında yer alan proteinler, diğer taşınımında yer alan proteinlerden farklıdır. Pili aracılığı ile yapılan elektron

taşıyımında rol alan proteinler OmcS ve OmcE'dir (Şekil 1.9.). Bu iki proteinin görevi, hücre içerisinde açığa çıkan elektronları nanowire adı verilen özel pilusa iletmeleridir.



Şekil 1.9. Pili aracılığı ile elektron taşıyım mekanizması (Liang S ve ark., 2007)

Shewanella spp. ve *Geobacter spp.* türlerinin doğrudan elektron taşıyımını arasındaki en önemli fark, hücre membranı ile yapılan elektron taşıyımında bu türler anot elektrotla yüzeysel temas içinde olmak zorunda iken, pili aracılığı ile yapılan elektron taşıyımında bakterilerin anot elektrotla direkt olarak temasları gerekmektedir. Çünkü pili yapısı uzundur, pilinin ucunun anot elektrotla temas etmesi yeterlidir. Pili aracılığı ile elektronunu ileten bakterilerin daha çok elektrik enerjisi üretmelerinin nedeni, aynı anot elektrot yüzey alanına membranları aracılığı ile taşıyım yapan bakterilerden daha fazla bakterinin elektronlarını iletebilmeleridir. Yani pili aracılığı ile elektronlarını ileten bakteriler, anot yüzeyinde daha kalın bir biyofilm tabakası oluşturmaktadırlar (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Pili aracılığı ile (B) ve Hücre membranı ile (A) anot yüzeyine elektron taşıyan bakterilerin anot yüzeyinde oluşturdukları biyofilm yapıları (Lovley DR ve K.P. Nevin., 2008).

1.6.2. Medyatörler Aracılığı İle Elektron Transferi

MYH sistemlerinde mikrobiyal türlerin çoğunluğunun dış yüzeyi, iletken olmayan bir lipit membrana, ve peptidoglikan tabakaya sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı bu bakteriler, elektronlarını anot elektrotla direkt olarak aktaramazlar. Bu engeli aşmak için indirgenme ve yükseltgenme gibi özelliklere sahip medyatörlere ihtiyaç duyarlar. Medyatörler, hücre içine kolayca girebilen ve burada elektron taşıma sistemlerinde görev alan elektron taşıyıcılardan elektronları alarak indirgenen taşıyıcılardır. Hücre içine giren medyatörler herhangi bir kimyasal tepkimeye girmeden hücreden çıkarlar ve aldıkları bu elektronları anot elektrotla vererek yükseltgenirler. Bu aşamalarda mikroorganizmaya ve anot elektrotla herhangi bir zarar vermezler (Ieropoulos IA ve ark., 2005). *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, ve *Bacillus* cinslerine ait türler metabolizma sonucu oluşan elektronları hücre dışına vermede sorun yaşadıkları için, medyatörler bunlar için çok önemlidir. Bazı bakteri türleri kendi medyatörlerini kendilerini sentezleyebilirken (biyolojik medyatörler), bazı türler için medyatörlerin dışarıdan kimyasal şeklinde (kimyasal medyatörler) verilmesi gerekmektedir (Nathan W ve ark., 2010; Samrot AV ve ark., 2010).

1.6.2.1. Kimyasal Medyatörler Aracılığı İle Anota Elektron Transferi

Kimyasal medyatörlerin hücre duvarı ve elektrot arasında elektron transferini teşvik ettiği ve MYH performansını arttırdığı rapor edilmiştir. Yaygın olarak kullanılan kimyasal medyatörler; neutral red (NR), methylene blue (MB), thionine, meldola's blue (MelB), 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ), anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) ve Fe(III)EDTA gibi metalloorganikleri ve boyaarı içermektedir (Gezginci M ve ark., 2011). Bu medyatörler; daha hızlı hareket etme yeteneğine sahip olmaları ve elektron transferinin yapılacağı ortamlara daha kolay bir şekilde sızmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedirler.

1.6.2.2. Biyolojik Medyatörler Aracılığı İle Anota Elektron Transferi

Kimyasal medyatörlerin aksine biyolojik medyatörler, toksik olmamaları, stabil olmaları ve kimyasal olmadıklarından ekstra maliyet gerektirmediği için MYH sistemlerinde kullanımları kimyasal medyatörlere göre daha çok tercih edilmektedir (Ieropoulos IA ve ark., 2005). *Shewanella algae* BrY suşu tarafından üretilen melanin (Turick CE ve ark., 2002), *Geothrix fermentans*'ın ürettiği quinon bileşeni (K.P. Nevin ve ark., 2002), *Shewanella oneidensis* MR1 tarafından üretilen menaquinon (Newman DK ve Kolter R, 2000), *Pseudomonas aeruginosa* KRPI'in ürettiği pyocyanin (Rabaey K ve ark., 2005) ve *Shewanella* türlerinin ürettikleri riboflavin, flavin mononucleotit (FMN) ve flavin adenin dinukleotit (FAD) (Velasquez-Orta S ve ark., 2009; Von Canstein H ve ark., 2008) bileşikleri biyolojik medyatörlere örnek olarak verilebilir.

1.7. MYH'de Katod Bölümündeki Medyatörler

Bu bölümdeki; araçlar esas olarak, ferrisiyanid ($K_3Fe(CN)_6$), bilirubin/ lakkaz ve permanganat ($KMnO_4$)'dır. Potasyum ferrisiyanid; MYH için mükemmel bir katodik elektron alıcısıdır ve bu sistem ile düşük maliyetli yüksek miktarda elektrik akımı üretilir (Liling Wei ve ark., 2012). Katod bölümündeki ferrisiyanid ferrosiyanide indirgenir.

MYH kullanarak, potasyum ferrisiyanidin farklı konsantrasyonlarının voltaj üretimindeki etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmalar en uygun potasyum ferrisiyanid

konsantrasyonunun; 0.1 M olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, pratik uygulamalarda, atık indirgemesi yapmak ve yüksek miktarda elektrik akımı üretmek için uygun bir potasyum ferrisiyanid konsantrasyonu seçmek gerekir (Liling Wei ve ark., 2012).

1.8. MYH'de Kullanılan Substratlar

Teorik olarak karbonhidratlar, yağlar ve proteinler bakımından zengin herhangi bir organik madde fermentatif biyohidrojen üretimi için olası bir substrat olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte yapılan çalışmaların gösterdiği gibi fermentatif işlem sırasında hidrojenin ana kaynağı karbonhidratlardır, bu yüzden şekerler ve/veya karmaşık karbonhidratlarca zengin biyokütle ve atıkların, biyohidrojen üretimi için en uygun substrat olduğu anlaşılmıştır (Li ve Fang, 2007).

1.9. Elektrot Seçimi

Elektrot seçimi konusunda dikkat edilmesi gereken özellikler: oldukça özel bir yüzey alanına sahip olması, aşındırıcı olmaması, iletkenliğinin yüksek olması, ölçeklendirilebilir olması, üretiminin kolay, maliyetinin düşük olması ve kir tutmamasıdır (Logan, 2008). Ek olarak, iyi bir elektriksel bağlantı sağlamak için bakterilerin, bu elektrotların yüzeyine bağlanabilmeleri gerekir. Karbon ve grafit elektrotlar; bu özelliklerin çoğuna sahiptir. Bu materyaller bakteriyel büyüme için uygun olmalarının yanında mikrobiyal elektroliz sistemleri için onları mükemmel adaylar yapan, düşük maliyetli olma ve yüksek iletkenliğe sahip olma özelliklerini de taşırlar. Sonuç olarak, literatür araştırmalarında özellikle anotta, deneylerin çoğunda karbon ve grafit elektrotların kullanıldığı tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2005; Cheng ve Logan, 2007; Rozendal ve ark., 2007; Call ve Logan, 2008; Hu ve ark., 2008).

1.10. Membran Seçimi

Membranlar; anot ve katot bölümleri arasındaki iyonik akışı düzenlemek için kullanılırlar, bunların görevi anot ve katot bölümlerini birbirinden ayırmaktır. Ayırıcılar, genellikle Nafion ya da ultrex gibi katyon değişim zarı veya tuz köprüsü şeklindedir. Bu tasarımlarda önemli nokta; zarların protonların geçişine izin verirken,

besinin veya katot bölmesindeki elektron alıcısının geçmesine izin vermemesidir (Kılıç A ve ark., 2011).

Nafion TM; yüksek iyonik iletkenlik sağlayan olarak, en yoğun şekilde çalışılan yakıt hücre membranıdır (10^{-2} S cm⁻¹). Nafion TM; yüksek maliyeti (\$780/m²), (Reimers ve ark., 2001), sınırlı sıcaklık aralığında çalışma özelliği (100 °C'den daha az), (Basura ve ark., 1998) ve oksijen geçirgenliği (9.3×10^{-12} mol cm⁻¹ s⁻¹), (Basura ve ark., 1998). nedeniyle kısıtlı bir çalışma alanına sahiptir.

1.11. MYH' lerinin Avantajları

MYH'ler; organik maddeden enerji üretiminde kullanılan mevcut teknolojilerden daha fazla işlemsel ve fonksiyonel avantajlara sahiptirler. Bu avantajlar (Rabaey K ve Verstraete W, 2005):

1. Substrat enerjisinin direkt elektriğe dönüşümü, yüksek dönüşüm etkinliğini sağlar.
2. MYH'ler, onları mevcut tüm biyo-enerji işlemlerinden ayıran, ortamsal ve hatta düşük sıcaklıklarda bile işlem görürler.
3. Bir MYH; gaz işlemine ihtiyaç duymaz, çünkü MYH'lerin gazsız olanları karbondioksitle zenginleştirilmiştir ve normalde yararlı enerji dönüşümüne sahip değildirler.
4. MYH'leri; pasif şekilde havalandırılan katoda hava sağlamak için enerji girdisine ihtiyaç duymazlar.
5. MYH'leri, hem enerji ihtiyaçlarımızı gidermek için kullandığımız yakıtların çeşitliliğini geliştirmede hem de eksik altyapılı elektriksel bölgelerde yaygın kullanım gücüne sahiptirler.

Mikrobiyal yakıt hücrelerinin birçok kullanım alanı vardır. Bu kullanım alanlarının en temeli elektrik üretimidir. Hemen hemen her organik madde yakıt hücresini beslemek için kullanılabilir. Dolayısıyla medyatörlü yakıt hücreleri su arıtma tesislerinde kullanılabilir. Bakteriler sudaki atık materyalleri tüketerek tesis

için yeterli miktarda elektrik üretebilir. Su arıtma tesislerinin yanı sıra mikrobiyal yakıt hücreleri doğrudan ekinlerden elektrik elde edilmesi için de kullanılabilirler. Bu durum su yosunu veya geniş çaplı su bitkilerinin bulunduğu platformlarda da kullanılabilmesine imkan vermektedir. Ayrıca bu mikrobiyal yakıt hücresi teknolojisinin en iyi kullanım alanlarından bir tanesi de yenilenebilir enerji santralleri ile kombine edilerek kullanılabilmesidir. Medyatörlü yakıt hücrelerinin kullanılması ile hem temiz hem de efektif bir şekilde elektrik üretimi sağlanabilir. Ayrıca temiz enerji kaynakları da düşünüldüğünde son araştırmalar yeni mikrobiyal yakıt hücrelerinin kullanımı geleneksel hidrojen üretim teknolojilerinden sekiz kat fazla hidrojen üretebilmekte olduğunu göstermiştir (Logan BE, 2008).

Bu çalışmada; modellemesini özel olarak yaptırdığımız mikrobiyal yakıt hücresi ve *Enterobacter aerogenes* ile onun [pUC8] ve [pUC8:15] suşlarını kullanarak belli bir düzeyde elektrik akımı üretimi hedeflenmiştir. *Enterobacter aerogenes*'in iyi bir hidrojen üreticisi olması dolayısıyla alternatif enerji üretiminde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu bilgidan yola çıkarak *Enterobacter aerogenes* ve suşlarını çeşitli besiyerlerinde üreterek en yüksek düzeyde elektrik akımı elde etmek amaçlanmaktadır. Elektrik üretiminin yanı sıra çalışmamızda çeşitli atıkları da kullanarak hem ekonomik enerji eldesi sağlamak hem de atık kullanımı hedeflenmektedir.

Çalışmamızda bakterilerin belirli saatler sonunda ürettikleri voltaj değerlerine bakılarak en iyi hangi saatlerde elektrik ürettiklerini saptamak hedeflenmektedir. Çeşitli elektrotlardan faydalanılarak tek bir elektrotla bağlı kalmadan elektrot potansiyelinin akım üretimi üzerine etkisi araştırılmaktadır. Belirli sıcaklık ve pH değerlerinin MYH performansı ve buna bağlı olarak voltaj üretimi üzerine etkisi araştırılmakta, en yüksek elektrik üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH değerinin bulunmasına çalışılmaktadır.

Her ne kadar mikrobiyal yakıt hücreleri henüz geniş yelpazede kullanılmaya başlanmamış olsa da sadece 7 µm kalınlıkta ve 2 cm uzunlukta olabilirler. Normal kullandığımız pillere karşı olan başarısı ise standart bir pilde gerektiği gibi yeniden şarj edilme ihtiyacının olmamasıdır. Bunun yanı sıra hafif uygulama gerektiren yerlerde 20 ile 40 derece arasında ve pH 7'ye sahip ortamlarda çalışabilirler.

MYH etkin bir elektrik üretim teknolojisi olarak geleceğin muhtemel elektrik üretim kaynaklarından biri olarak görülmektedir. Bu teknolojinin gelişmesi ve

kullanım alanlarının yaygınlaşması ile gerçek anlamda “yeşil enerji üretimi” sağlanmış olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikrobiyal Yakıt Hücreleri, akım üretmek amacıyla organik ve inorganik maddeleri oksitleyen bakterileri katalizör olarak kullanan düzeneklerdir. Bu maddelerden bakteriler vasıtasıyla üretilen elektronlar, anot bölümünden (negatif kutup) rezistans içeren iletken bir materyalle bağlanmış katot (pozitif kutup) bölümüne doğru iletilir. Bu sistem sayesinde, elektronlardan gelen akım, pozitiften negatif kutba doğru akar. Sistem, devamlı ya da aralıklı olarak doldurulan anot bölümünde okside bir substrata sahip olmalıdır. Başka bir ifade ile sistem bir biyobattara gibi düşünülmektedir.

Mikrobiyal yakıt hücreleriyle organik maddeden elektrik üretimi, neredeyse geçmiş 100 yıla yakın olan kavramdır. Bakterilerin elektrik akımı üretebildikleri ilk kez Potter tarafından rapor edilmiştir. Potter; mikroorganizmalar tarafından organik bileşenlerin parçalanması esnasında elektriksel enerji üretildiğini göstermiştir (Potter, 1911).

Mikrobiyal yakıt hücre potansiyeli kapsamlı olarak çalışılmıştır. Medyatörler ve farklı substratlarla çeşitli mikrobiyal sistemler araştırılmıştır. Literatür kayıtları, mikrobiyal bir yakıt hücresinin performansının, büyük ölçüde, kullanılan medyatör ve mikroorganizma tipine bağlı olduğunu gösteriyor. Potter'ın çalışmasında, maya kullanarak mikrobiyal bir yakıt hücresi geliştirilip onun çeşitli şartlar altında performansı test edilmiştir (Potter, 1911).

1931'de, B. Cohen; bakteriyel büyüme boyunca kimyasal reaksiyonların tüm potansiyometrik yoğunluklarını inceleyerek, ilk kez bakterilerle - elektrot arasındaki etkileşim çalışmalarını araştırmıştır (Cohen, 1931; Berk ve Canfield, 1964). O, bakteriyel kültürlerin bu işi yapabilecek elektriksel hücreler olduğunu göstermiştir. Yapay elektron medyatörlerinin (potasyum ferrisiyanid ve benzokinon) üretimiyle, Cohen; altı hücreyi seri olarak bağladığında, 35 V'luk bir gerilim üreterek, ilk bakteriyel bataryayı üretmiştir. 1950'lerin sonu ve 1960'lar boyunca, organik materyalin elektriksel enerji yüzeyine dönüşümüyle ilgilenilmiştir. ABD'nin uzay programı tarafından başlatılan, uzay görevleri süresince MYH'ler, güç üretebilen potansiyel atık tasarruf üniteleri olarak görülmüştür (Shukla ve ark., 2004; Bullen ve ark., 2006). Potansiyel olarak yeni uygulamaların yapılmasıyla mikroorganizmalar ve elektrotlar arasındaki elektriksel bağlantının daha iyi anlaşılmasına rağmen,

elektriksel enerjiye uygun bir kaynak olmak için yeteri kadar büyük miktarlarda ya da uygun bir oranda elektrik akımı üretilmeyeceği belirlenmiştir (Cohen, 1931; Lewis, 1966; Shukla ve ark., 2004; He ve Angenent, 2006; Lovley ve Nevin, 2008).

Organik bileşiklerin tam şekilde CO₂'e okside olmasıyla tüm mevcut elektronların akıma dönüştüğü ilk defa Bond ve ark. tarafından gözlemlenmiştir (Bond ve ark., 2002).

Elektronlar, bakteriler vasıtasıyla elde edilen nanoteller veya direkt olarak membran ve elektron medyatörleri aracılığı ile anoda iletilir. Bir çalışmada; sisteme; elektrotu kullanamayan bakterilerden elektrik üretimi sağlayacak, antraknon-2,6-disülfonat (AQDS) ve nötral kırmızısı gibi kimyasal medyatörler eklenerek elektrik üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, karışık kültürler kullanılarak çalıştırılan MYH'leri, saf kültürler kullanılarak çalıştırılan hücrelere göre daha yüksek miktarda elektrik akımı üretimini gerçekleştirmişlerdir (Logan BE ve ark., 2006).

MYH'lerinde kullanılacak mikroorganizmalara dair çalışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda elde edilen yeni bilgilere ve mevcut bilgilere dayalı olarak, anodofilik elektron (bir anoda elektron iletimi) ve hatta türler arası elektron iletebilen (herhangi formda bakteriler arasında iletilen elektronlar) çoğu yeni bakteri türleri keşfedilebileceğini düşündürmüştür (Logan BE ve ark., 2006).

Mikrobiyal yakıt hücreleri (MYH'ler), biyolojik olarak ayrışabilir, indirgenmiş bileşenlerden, sürdürülebilir enerji üretmek için yeni fırsatlar sunar. MYH'leri, karbonhidratlara ek olarak atık sulardaki kompleks substratlarda da fonksiyon gösterirler. Elektron alıcısı olarak anodu kullanan bakterilerin, doğası ve enerji metabolizması hakkında çok az şey bilinmektedir; birkaç araştırmacı bu bakterilere dair elektron transfer mekanizması önermişlerdir. MYH'leri vasıtasıyla enerji üretimini geliştirmek ve optimize etmek için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. MYH'nin işlemsel parametrelerine bağlı olarak, bakteriler tarafından farklı metabolik yollar kullanılır. Bir çalışmada, bakterilerin meydana getirdikleri elektriksel verimin büyüklüğünün ne olduğu ve elektron alıcısı olarak bir anodu nasıl kullandıkları araştırılmıştır. MYH teknolojisi, mevcut alternatiflerle ilgili olarak değerlendirilmiştir (Rabaey K ve Verstraete W, 2005).

Başka bir çalışmada ise sitokrom ya da ubikinon vasıtasıyla direkt şekilde elektron transferi yapabilen (ekzo-elektrojenik organizma) mikroorganizmalar içinde en etkili olduğu saptanmış *Enterobacter cloacae* SU-1 'i araştırılmıştır. Bu elektron taşıyıcıları, hücrelere toksik olmayan ve biyolojik olarak indirgenmemiş, sabit

tersinir redoks çiftleridir. Bu bakterilerde elektron transfer zinciri ile elektronların, trikarboksilik asit döngüsü ile ise; protonların açığa çıkarılmasıyla elektrik üretiminin gerçekleştiği gösterilmiştir (Samrot AV ve ark., 2010).

Diğer bir çalışmada MYH'de, mikroorganizmaların; bir elektrik döngüsü boyunca alınan ya da verilen elektronları kullanan elektrotlarla etkileşim halinde oldukları gösterilmiştir (Rabaey ve ark., 2007). MYH'ler, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri vasıtasıyla biyokütleyi kendiliğinden elektriğe dönüştüren biyoelektrokimyasal sistemlerin ana tipidirler. MYH'lerinin substratlar olarak atıksuları kullanmaları ile elektrik üretimine eş zamanlı olarak atıksu arıtımını yapabilen, artan enerji ihtiyaçlarını karşılayabilecek bir teknoloji oldukları düşünülmüş, bu sebeple atıksu arıtım tesislerinin işletme maliyetlerini telafi edilebilecekleri ileri sürülmüştür (Lu ve ark., 2009).

MYH'lerini beslemek için, daha önceki çalışmalarda asetat, glukoz ya da laktat gibi saf substratlar kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise 2000 kadar atıksu ve başka maddeler içeren diğer kompleks karışımli organik substratlar test edilmiştir. MYH ile atık arıtımının yapılabilmesi; bu teknolojiye olan ilgiyi arttırmıştır. Deneme amaçlı atıksu arıtımı için ilk MYH Avustralya'nın Brisbane eyaletinde bir bira fabrikasında kurulmuş ve bu MYH ile atık arıtımına eş zamanlı olarak enerji üretimi de gerçekleştirilmiştir (Guerrero AL ve ark., 2010).

Sıcaklık, anaerobik çürükçül bakteriler ve ona sıkı şekilde bağlı olan metan üretiminde önemli bir parametredir. Çoğu anaerobik çürükçül bakteriler, mezofilik aralıkta çalışırlar ve bu işlemin özellikleri oldukça iyi çalışılıp kaydedilmiştir. Çalışmalar sonucu MYH'lerinin sıcaklıktan yoğun şekilde etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır. Bakterilerin en iyi üreme gösterdikleri sıcaklık aralıklarında en yüksek elektrik üretim veriminin elde edildiği, bu sıcaklık değerlerinin üstündeki sıcaklık değerlerinde üreme azalmasına bağlı olarak elektrik üretim veriminin de düştüğü kaydedilmiştir (Guerrero AL ve ark., 2010).

MYH'lerinde katot bölümü, aerobik mikroorganizmaların bulunup bulunmamasına göre kategorize edilir. Katot bölümünde aerobik mikroorganizmaların bulunmasının MYH'ni nasıl etkilediğini saptamak için yapılan çalışmada, deniz suyunda, pH 8.2 ve 28°C'de çalıştırılan MYH'de katotta, karışık mikroorganizma kültürü kullanılmıştır (Bergel, 2005). Bir başka araştırmacı ise yaptığı çalışmada katot bölümünde *Shewanella oneidensis* DSP10 kullanmıştır (Biffinger, 2007) diğer bir araştırmacı ise yapay atık su ile yaptığı çalışmada katotta

Thiobacillus ferrooxidans türü mikroorganizma kullanmıştır (Prasad, 2006). Yapılan bu üç çalışmada ortak olarak katot bölümünde mikroorganizma varlığının daha düşük elektrik üretimine yol açtığı tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların bulunmadığı katot bölümünün kullanılması durumunda ise kimyasal katalizörün elektronların yüksek oranda transferini sağlayarak elektrik üretiminde daha fazla verim sağladığı kaydedilmiştir. Bu çalışmada kullanılan medyatörler; ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$), bilirubin/ lakkaz ve permanganat ($KMnO_4$)'dır (Sung Taek Oh, 2009).

Son zamanlarda, modifiye yakıt hücre yapısı ve materyalleri sayesinde, mikrobiyal yakıt hücrelerinin akım yoğunluklarında önemli gelişmelere varılmıştır. Mikrobiyal yakıt hücreleri mühendisliğinin yeni strateji geliştirme çalışmalarında cevap aranan önemli sorular şunlardır: 1) Mikroorganizmaların elektrot yüzeyleriyle etkileşimini sağlayan nedir? 2) Bu mikroorganizmaların büyüme ve metabolizmasını etkileyen faktörler nedir? 3) Elektrotlar ile mikroorganizmalar arasındaki elektronik haberleşme mekanizmaları nedir? Bu sorulara yanıt bulunmasıyla MYH performansı yükselecek ve MYH'ler daha yaygın kullanım sahası bulabilecektir (Lovley DR, 2008).

Çok az araştırmacı, mikrobiyal yakıt hücrelerini kullanarak elektrik akımı üretimini araştırmıştır. Yapılan bir çalışmada, elektrik üretimi için substrat olarak üniversitenin atık su arıtma tesisinden atık su alınmış seri bağlı hücrelerin etkinliği araştırılmıştır (Daniel DK ve ark., 2009). Substrat olarak atık su ve *Pseudomonas sp.*' in kullanıldığı tek bölmeli bir MYH sisteminde metilen mavisi ve nötral kırmızısının medyatör olarak etkinlikleri araştırılmıştır. Ölçümler metilen mavisi kullanan tek bölmeli MYH'deki açık devre potansiyelinin, nötral kırmızısı kullanıldığında üretilenin neredeyse iki katı olduğunu göstermiştir (Daniel DK ve ark., 2009).

Mohan Y ve ark., tarafından, *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 ve iki bölmeli MYH ile ilgili olarak yapılan farklı bir çalışmada, MYH' lerinde güç üretiminde anot ve katot bölümleriyle bağlantı kuran tuz köprüsünün yüzey alanının, ortamın iyonik gücünün, medyatörlerin konsantrasyonunun etkileri kaydedilmiştir. Elektron medyatörü olarak metil moru kullanılması durumunda, voltaj üretimi 0.4 V olarak belirtilmiş ancak akım belirlenmemiştir. Medyatör olarak metilen mavisinin farklı konsantrasyonları da çalışılmıştır. 0.03 mM metilen mavisi olması halinde maksimum voltaj 0.34 V, 0.05 mM metilen mavisi'nde ise maksimum voltaj 0.37 V olarak gözlemlenmiştir. Elektron medyatörü olarak metil moru kullanılması

durumunda, 0.1 mM'lık bir konsantrasyonda gözlenen maksimum bir gerilim 0.4 V'dur. Metil morunun 0.05 mM ve 0.5 mM'lık farklı konsantrasyonlarda kullanılması halinde ise maksimum gerilimin değişmediği gözlemlenmiştir. Medyatör olarak metilen mavisinin farklı konsantrasyonları kullanıldığında, elde edilen en yüksek gerilim 0.37 V'dur (Mohan Y ve ark., 2008).

Elektrik üretmek için bakterilerin kullanılması yenilenebilir bir enerji kaynağı olduğu için biyoenerji üretimi konusunda elverişli bir alan oluşturmaktadır. Bakteriyel reaksiyonlar; psikrofillerin büyüyebildiği düşük sıcaklıklara (<15 °C) hem oda sıcaklığı seviyesine (15–35 °C), hem de termofiller tarafından tolere edilen yüksek sıcaklıklara (50–60 °C) kadar uzanan geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleştirilebilir. MYH'de, uçucu asitler, karbonhidratlar, proteinler, alkoller ve hatta selüloz gibi zor ayrışabilir materyalleri içeren herhangi bir biyolojik organik madde kullanılabilir. Potter tarafından 1911'de yapılan çalışmada; *Saccharomyces cerevisiae* mayasının ve *Bacillus coli* (daha sonra *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır) gibi bakterilerin elektrik üretebilecek kadar bir gerilim meydana getirdikleri gösterilmiştir. Başka bir çalışmanın sonuçlarında ise; *E.coli* ve medyatörün etki mekanizmasının bilinmediği belirtilerek, mayaların medyatör yokluğunda elektrik üretmediği gözlenmiştir (Sharma V ve Kundu P, 2010). Bu çalışmada ayrıca; üretilen elektrik için direnç olarak kullanılan rezistanslı bir sistem kullanılmış; bir veri kazanım sistemine bağlı multimetre kullanarak rezistansa karşı gerilim düşüşünün ölçülmesine dayalı araştırma yapılmıştır ve dirence karşı voltajın düştüğü belirlenmiştir (Sharma V ve Kundu PP, 2010).

Bu zamana kadar araştırmaların büyük bir bölümü, *E.aerogenes*'in üretme şartlarını optimize ederek temelde hidrojen üretimini artırmaya bağlı olarak elektrik üretim etkinliğini artırmaya dayalı *E.aerogenes*'in yabancıl suşları üzerine odaklanmıştır (Tanisho ve ark., 1998; Kurokawa ve Tanisho, 2005; Yokoi ve ark., 1995, 1997; Rachman ve ark., 1997, 1998; Jayasinghearachchi ve ark., 2009; Palazzi ve ark., 2000; Converti ve Perego, 2002; Fabiano ve Perego, 2002; Palazzi ve ark., 2002; Converti ve ark., 2003; Jo ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda ise; *Enterobacter aerogenes* ve onun [pUC8], [pUC8:15] rekombinantları kullanılarak, MYH'de sıcaklık, pH, saat, elektrod gibi parametrelerin değişiminde elde edilen voltaj değerlerinin ölçülmesi ve rekombinant sistemlerin sürece uyumlarının incelenmesi hedeflenmiştir. Parametre değişimi ile öncelikle en yüksek voltaj değeri veren bakteri türü ve suşunun tespit edilmesi hedeflenmiş ve sonrasında da bu

organizmaların yüksek voltaj değeri verdiği sıcaklık, pH, elektrot ve zamanın belirlenmesi planlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada besiyeri hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; NaCl, agar, pepton, yeast ekstratı, tripton, KH₂PO₄, K₂HPO₄, HCl, NaOH analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden temin edilmiştir.

3.2. Araştırmada Kullanılan Bakteriler ve Saklanma Koşulları

Çalışmada laboratuvarımızda bulunan *Enterobacter aerogenes* ve bu bakterinin *vgb⁻* ve *vgb⁺* rekombinantları olan *Enterobacter aerogenes* (pUC8) ve *Enterobacter aerogenes* (pUC8:15) kullanılmıştır.

E.aerogenes'in *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşları kendi laboratuvarımızda elde edilen rekombinantlardır, bunlar sırasıyla Ea[pUC8], Ea[pUC8:15] olarak adlandırılmaktadır. Ea[pUC8:15] suşu 665 baz çiftine sahip olup pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3- Kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlaması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. [pUC8:15] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık olarak 5- Kb'dır (Erenler Ş, 2007).

Bu bakterilerin canlılığını sağlamak için *E. aerogenes* ve *E. aerogenes* [pUC8], *E. aerogenes* [pUC8:15] -20 °C'de gliserollü stokta saklanmıştır. Araştırmalarımızda kullandığımız *E.aerogenes* ve rekombinant suşları her 30 günde bir LB plaklarına öze yardımıyla pasaj yapılarak gece boyu üremeleri sağlanmış ve ertesi gün parafilmle plakların etrafı sarılarak 4 °C'de saklanmıştır. Deneyler süresince bu stoklar kullanılmıştır.

3.2.1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada zengin besi yeri olarak LB, TB, peynir altı suyu ve melas besi ortamları kullanıldı (Çizelgeler 3.1-3.3). Bu besi ortamlarının içeriği ileriki sayfalarda tablo halinde verilmiştir. Besi ortamlarının pH'ları çalışma adımlarına göre 6.0, 7.0 ve 8.0 olacak şekilde ayarlanmış ve 125 mL kapasiteli erlenlerde 20 mL besi ortamı olacak şekilde 25 dakika süresince otoklavda 120 °C'de 1 atm basınçta otoklav edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan besi ortamları ve içerikleri (g L⁻¹)

Lauria Broth (pH 7.5)	
Pepton	10
NaCl	10
Maya özütü	5
Terrific Broth (pH 7.5)	
Tripton	12
Maya özütü	24
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	9.4
Gliserol	4 ml

Çizelge 3.2. Melasın içeriği (g L⁻¹)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5
Na ₂ SO ₄	4.13
KH ₂ PO ₄	25.993
CaCl ₂	2.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.7
FeSO ₄ .H ₂ O	0.040
MnSO ₄ .H ₂ O	0.017
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.021
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00152
Pepton	2.67
H ₃ BO ₃	0.01
Pantotenik asit	0.0010
İnosit	0.125
Pridoksin	0.006
Biotin	0.00025

Çizelge 3.3. Peynir altı suyunun içeriği (g L⁻¹)

Kuru madde (%)	3.695
Su (%)	96.30
Yağ (%)	0.1
Yağsız Kuru madde (%)	3.595
Asitlik (%)	0.334
pH (%)	5.10
Protein (%)	0.880
Kül (%)	0.469
Laktoz (%)	3.60
N (%)	0.137
P (ppm)	36.30
Fe (ppm)	0.820
Zn (ppm)	4.316
Mn (ppm)	0.70
Mg (ppm)	41.75
K (ppm)	948.5
Ca (ppm)	280.4
Na (ppm)	233.8

3.2.2. Araştırmada kullanılan çözeltiler

Aşağıda deneyler süresince kullanılan çözeltiler ve içerikleri verilmiştir (Çizelge 3.4- 3.6).

Çizelge 3.4. 0.2 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)

Na ₂ HPO ₄	3.561 g - 100 mL
Na H ₂ PO ₄	3.121 g - 100 mL

Dibazik karışımdan 38 mL, monobazik karışımdan 12 mL alınıp 50 mL'lik tampon elde edildi.

Çizelge 3.5. 0.02 M Potasyum Ferrisiyanid Çözeltisi

Potasyum ferrisiyanid	0.65 g/100 mL
-----------------------	---------------

Çizelge 3.6. Metilen Mavisi

Metilen mavisi	0.375 g/ 25 mL
----------------	----------------

3.3. Hücre Kütlesinin (OD₆₀₀) Belirlenmesi

125 mL'lik erlenlere 20'şer mL olacak şekilde LB, TB, peynir altı suyu ve melas besiyerleri konuldu. Besiyerlerinin otoklavda steril edilmesinden sonra, *Enterobacter aerogenes* ve bunun [pUC8] ile [pUC8:15] suşları bu besiyerlerine ekildi. 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besiyerlerinden 200 µl pipetle çekilip yeni besiyerlerine inoküle edildi ve 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı etüve konuldu. 8. saat sonunda bu besiyerleri çıkarılıp spektrofotometre küvetlerine ekim yapılmayan besiyerlerinden 900 µl, bakteri kültürlerinden de 100 µl koyulup spektrofotometrede OD₆₀₀'de absorbansları okunup kayıt edildi.

3.4. Kültürlerin Asit Üretimi

"JENWAY 3010 pH meter" marka pH ölçer ile kültürlerin asit üretimi pH değeri olarak kaydedildi. Bunun için kültür ortamlarının başlangıç pH değerinin kültür süresi sonunda nasıl değiştiği belirlendi.

3.5. Kullanılan Yakıt Pili

Çalışmada modellenmesi özel olarak yaptırılan, yaklaşık anot + katot bölümü toplamı 10 mL olan yakıt hücresi kullanılmıştır. Şekil 3.1.'de yakıt hücresi gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deneyler süresince kullanılan yakıt pili. Sarı renk: katot bölümünü, mavi renk: anot bölümünü göstermektedir.

3.5.1. Kullanılan Elektrotlar ve Membran

Çalışmada bakır, karbon ve kompozit elektrotlar ve membran olarak; "NAFION 211 MEMBRANE 30×30 cm" kullanılmıştır.

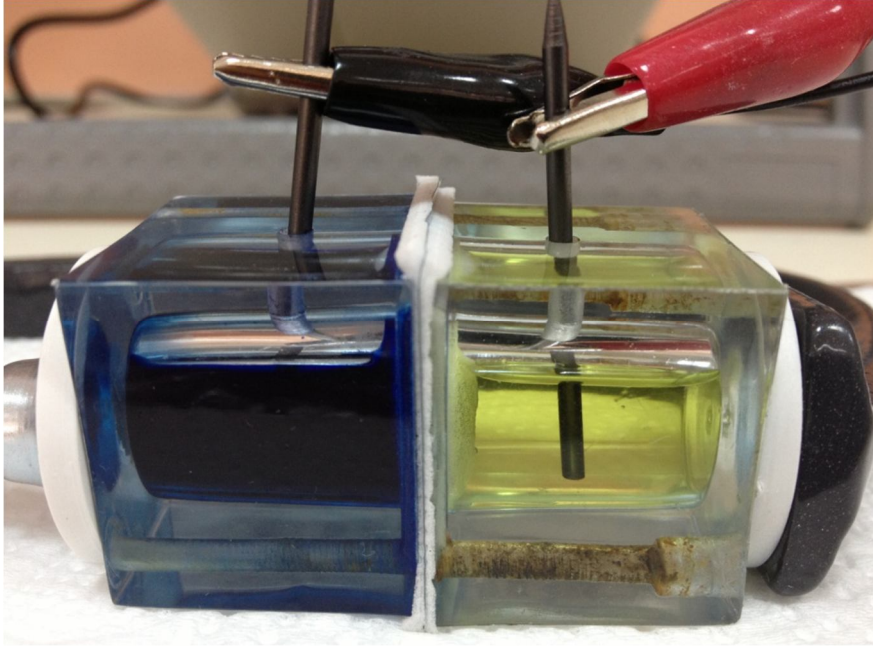
3.5.2. Yakıt Pilinin Doldurulması

Anot Bölümü;

- Potasyum fosfat tamponu (yaklaşık 1.2 mL)
- Metilen mavisi (yaklaşık 1.2 mL)
- Bakteri (sıvı besiyeri ortamından yaklaşık 2.3 mL)

Katot Bölümü;

- Potasyum ferrisiyanid çözeltisi (yaklaşık 4.5 mL) eklenerek toplam hacim yaklaşık 10 mL olacak şekilde doldurulmuştur. Şekil 3.2.'de yakıt pilinin doldurulmuş hali gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Kullandığımız MYH'nin anot ve katot bölümleri.

3.6. Elektrot Optimizasyonu

125 mL'lik erlenlere 20 mL'şer olacak şekilde LB (pH 7) besi yerine konulup, 120 °C'de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C'de petri kablarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Ancak rekombinant suşlar için besi ortamlarına 100µg/mL olacak şekilde stok antibiyotik solüsyonundan (100mg/mL) eklendi. Bunların 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde üremeleri sağlandı. Bakteri kültürleri 8. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, bakır, kompozit ve karbon elektrotlar kullanılarak her bir bakteri için üçer tekrarlı olmak üzere 24 saat boyunca elde edilen elektrik akımı "PICOTEST M3500A 61/2" markası ve modelinde olan bir multimetre vasıtasıyla ölçülüp yine aynı multimetre firmasına ait yazılımla veriler bilgisayara aktarılmıştır.

3.7. Zaman Optimizasyonu

125 mL'lik erlenlere 20 mL'şer olacak şekilde LB (pH 7) besiyerine konulup, 120°C'de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C'de petri kablarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden

ekim yapıldı. Ancak rekombinant suşlar için besi ortamlarına 100 µg/mL olacak şekilde stok antibiyotik solüsyonundan (100 mg/mL) eklendi. Bunların 37 °C’de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde üremeleri sağlandı. Bakteri kültürleri 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, karbon elektrot kullanılarak her bir bakteri için üçer tekrarlı olmak üzere 24 saat boyunca elde edilen elektrik akımı multimetre aracılığı ile ölçülüp veriler bilgisayara aktarılmıştır.

3.8. Besiyeri Optimizasyonu

125 mL’lik erlenlere 20 mL’şer olacak şekilde LB (pH 7), TB (pH 7), peynir altı suyu (pH 7) ve melas (pH 7) besi yerlerine konulup, 120°C’de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C’de petri kaplarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Bunların 37 °C’de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde üremeleri sağlandı. Bakteri kültürleri 8. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, karbon elektrot kullanılarak her bir bakteri için üçer tekrarlı olmak üzere 24 saat boyunca elde edilen elektrik akımı multimetre vasıtasıyla ölçülüp, veriler bilgisayara aktarılmıştır.

3.9. Sıcaklık Optimizasyonu

125 mL’lik erlenlere 20 mL’şer olacak şekilde melas (pH 7) besi yerlerine konulup, 120°C’de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C’de petri kablarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Bunların 30 °C, 37 °C ve 40 °C ’de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde gece boyunca üredikleri aynı sıcaklık değerinde üremeleri sağlandı. Bakteri kültürleri 8. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, karbon elektrot kullanılarak her bir bakteri için üçer tekrarlı olmak üzere 24 saat boyunca elde edilen elektrik akımı multimetre ile ölçülüp veriler bilgisayara aktarılmıştır.

3.10. pH Optimizasyonu

125 mL'lik erlenlere 20 mL'şer olacak şekilde melas (pH 6), melas (pH 7) ve melas (pH 8) besi yerlerine konulup, 120°C'de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C'de petri kablarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Bunların 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde gece boyunca üredikleri aynı sıcaklık değerinde üremeleri sağlandı. Bakteri kültürleri 8. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, karbon elektrot kullanılarak her bir bakteri için üçer tekrarlı olmak üzere 24 saat boyunca elde edilen elektrik akımı multimetre ile ölçülüp veriler bilgisayara aktarılmıştır.

3.11. Elde Edilen Voltaj Üretiminin Okunması

MYH'de elde edilen elektrik akımını ölçmek için veri toplama sistemi (PICOTEST M3500A 61/2 Digit Multimeter) kullanılmış ve 24 saat boyunca ortalama voltaj değerleri kaydedilmiş ve bu veriler "PICOTEST" firmasına ait bir yazılımla bilgisayara aktarılmıştır (Şekil 3.3.).

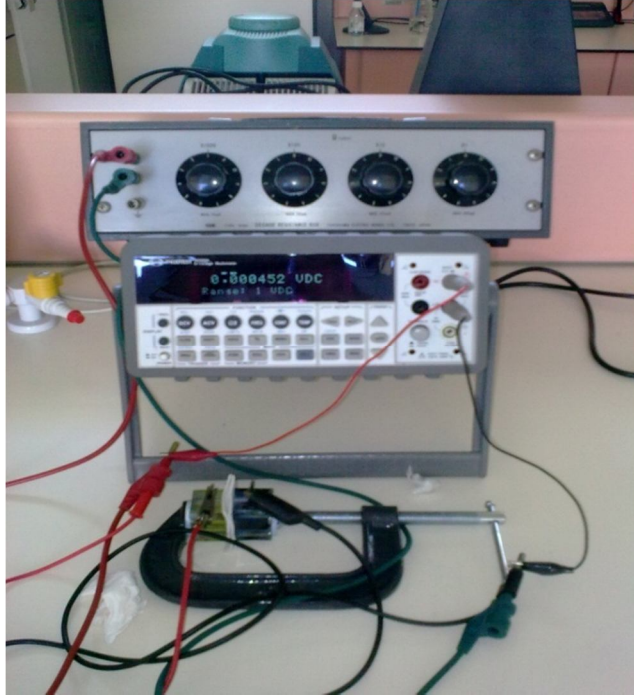


Şekil 3.3. Multimetre Sistemi.

3.12. Dirence Karşı Voltaj Değerinin Okunması

125 mL'lik erlenlere 20 mL'şer olacak şekilde melas (pH 7) besiyerlerine konulup, 120°C'de 1 atm basınçta 25 dakika süresince otoklav edildi. Daha sonra bu besi ortamlarına 4 °C'de petri kablarında muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Bunların 30 °C, 37 °C ve 40 °C 'de 200 rpm çalkalamalı etüvde gece boyunca üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreme gözlenen bu besi yerlerinden pipetle 200 µl çekilerek yeni besi ortamlarına ekim yapıp etüvde gece boyunca üredikleri aynı sıcaklık değerinde üremeleri sağlandı.

Mevcut sisteme ilave olarak bir "Direnç Ölçer" bağlandı (Şekil 3.4.). Bakteri kültürleri 8. saatlerinde mikrobiyal yakıt hücresine aktarılıp, karbon elektrot kullanılarak her bir bakteri için 1000-10000 Ω dirence karşılık gelen voltaj değeri okunup kaydedildi.



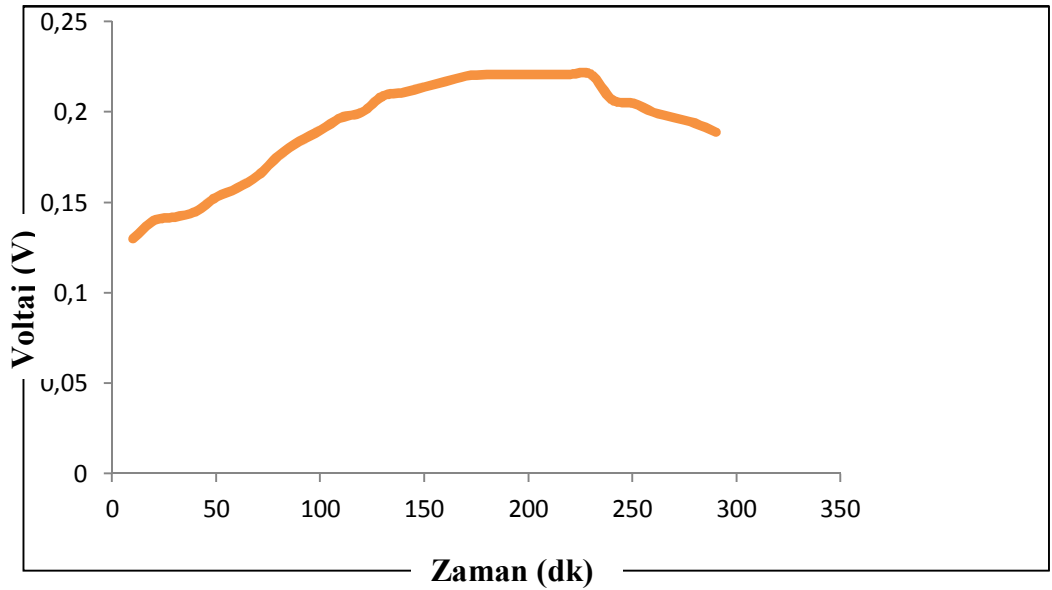
Şekil 3.4. Multimetre ve Direnç Ölçer.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

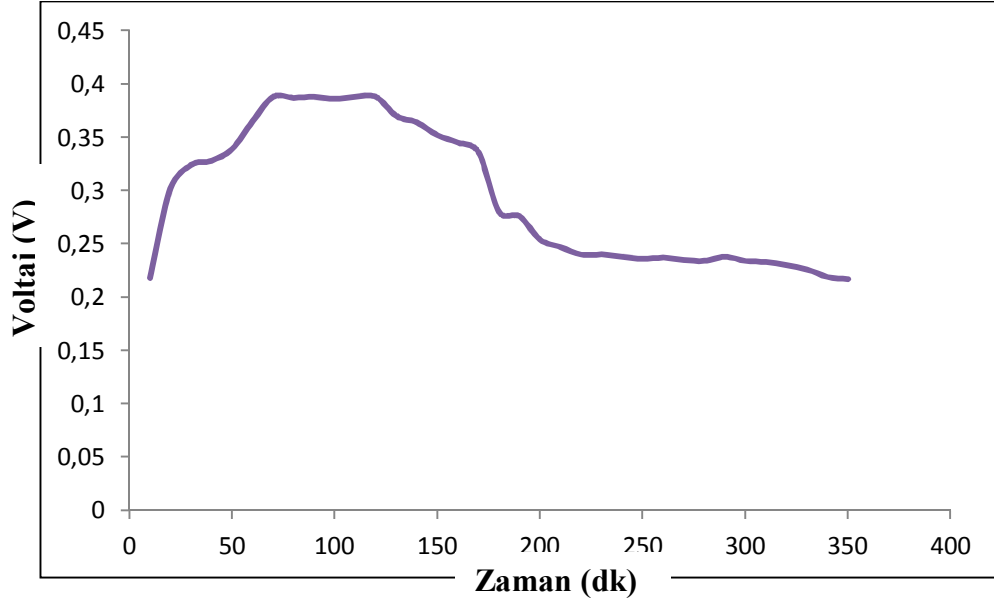
4.1. Elektrot Optimizasyonu

Mikrobiyal yakıt pillerinde kullanılan elektrot tipi; hem mikrobiyal yakıt pilinin performansını hem de bu yakıt pilinden elde edilecek voltaj miktarını önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışmamızın bu adımında, bize en iyi mikrobiyal yakıt pili performansını verecek olan elektrotu saptamak için üç çeşit elektrot kullanılarak deneme yapılmıştır. Bu denemelerden elde edilen sonuçlar, grafik olarak aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.1.-4.3).

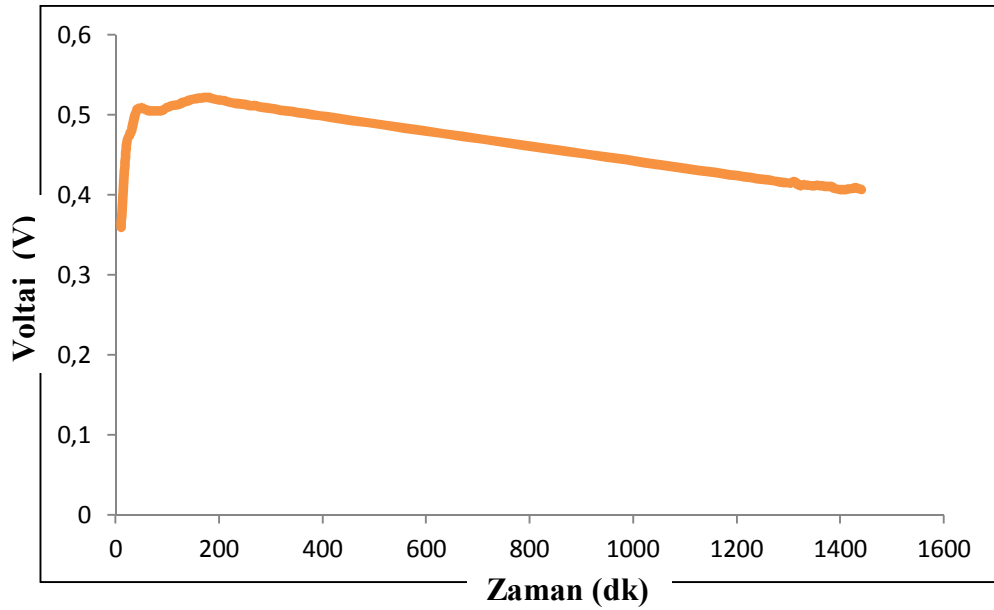
Deneyler esnasında aynı tür elektrotlar sırası ile *Enterobacter aerogenes* ve rekombinant suşu kültürlerinin bulunduğu mikrobiyal yakıt piline daldırılmış, en fazla voltaj üretimi LB besi ortamında 37 °C’de çoğaltılan *Ea* [pUC8:15] rekombinant suşunda gözlemlenmiştir. Bu yüzden elektrot araştırması; bu rekombinant suşta sürdürülmüştür.



Şekil 4.1. *Ea* [pUC8:15]’de bakır elektrotla yapılan deneysel veri grafiği



Şekil 4.2. E_a [pUC8:15]'de, kompozit elektrotla yapılan deneysel veri grafiği



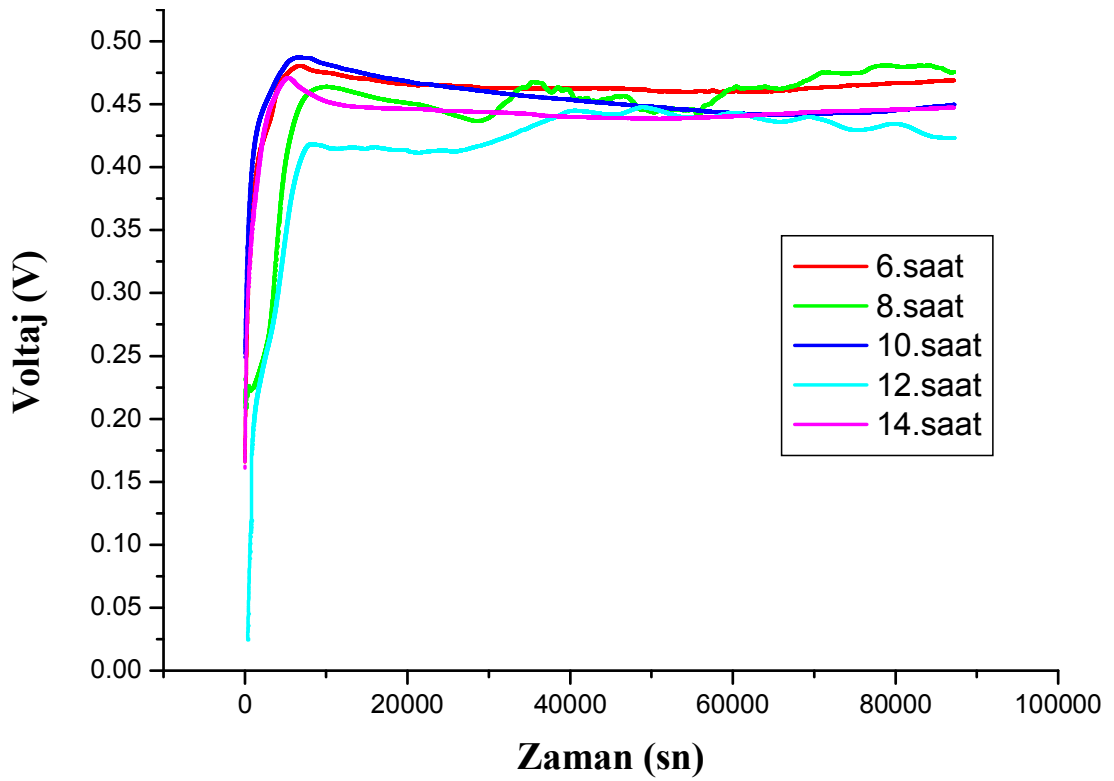
Şekil 4.3. E_a [pUC8:15]'de, karbon elektrotla yapılan deneysel veri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; bakır elektrotla yapılan denemede en yüksek voltaj değeri 0,23 V, kompozit elektrotta 0,38 V, karbon elektrotta ise 0,52 V olarak okunmuştur. En yüksek voltaj miktarını veren elektrotun **karbon elektrot** olduğu saptanıp, bundan sonraki çalışmalara bu elektrotla devam edilmiştir (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır).

4.2. Zaman Optimizasyonu

Kullandığımız bakterilerin en fazla voltaj miktarını verdikleri zaman aralığı bilinmemektedir. Bunu saptamak için, çeşitli zaman dilimleri kullanılarak mikrobiyal yakıt pilinin en iyi performansı gösterdiği zaman saptanmaya çalışılmıştır.

Bu aşamada; bir önceki çalışmada karbon elektrotla en yüksek voltaj verimini veren LB besi ortamında 37 °C’de çoğaltılan *Ea* [pUC8:15]’in 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerdeki kültürü kullanılarak en yüksek voltaj değeri belirlenmiştir. Deneysel veriler aşağıda grafikleştirilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *Ea* [pUC8:15]’in 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerdeki kültürü kullanılarak gerçekleştirilen saat optimizasyonu deneysel veri grafiği.

Yapılan ölçümlerde *Ea* [pUC8:15]’in 6. saatte verdiği en yüksek voltaj değeri 0,480 V, 8. saatte verdiği değer 0,494 V, 10. saatte verdiği değer 0,490 V, 12.saatte verdiği değer 0,453 V, 14. saatte verdiği değer ise 0,476 V olarak okunmuştur (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır).

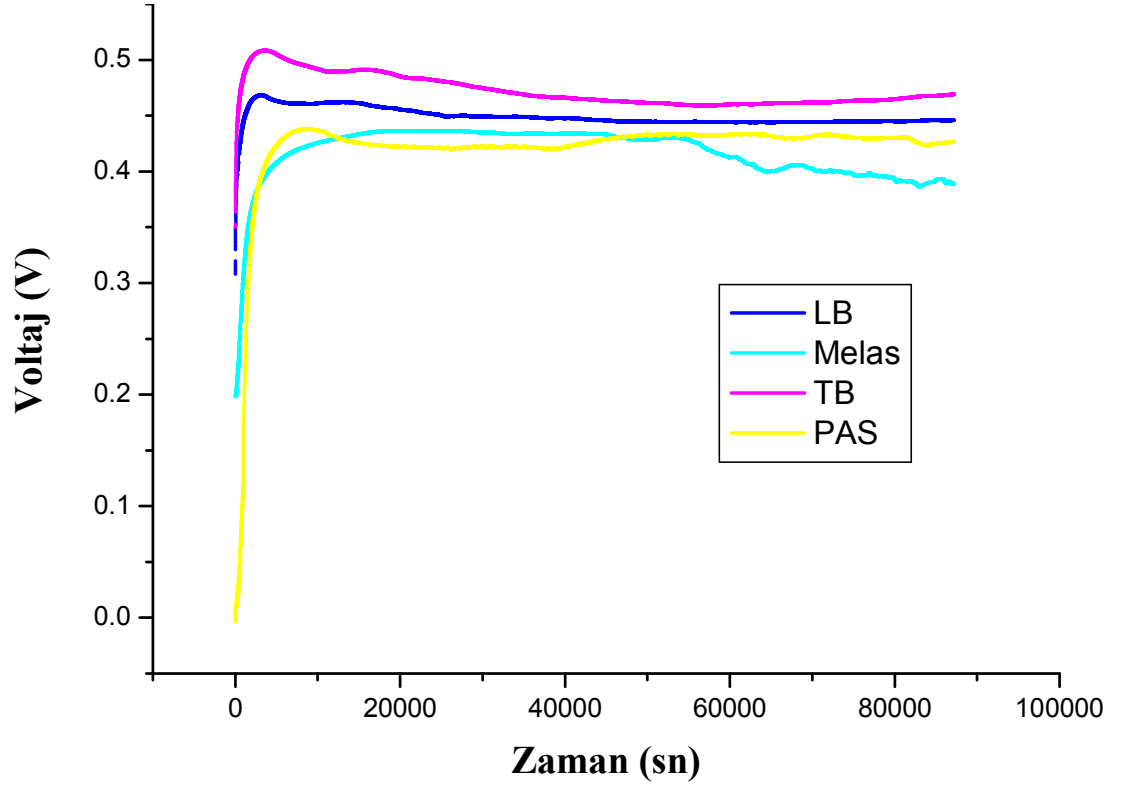
Bu verilerden ve grafikten yola çıkarak *Ea* [pUC8:15]’in 6. 8. 10. 12. ve 14.

saattlerdeki en yüksek voltaj veriminin 8. saatte olduğu saptanıp, araştırmanın bundan sonraki adımlarına bu saatte çalışılmaya devam edilmiştir.

4.3. Besiyeri Optimizasyonu

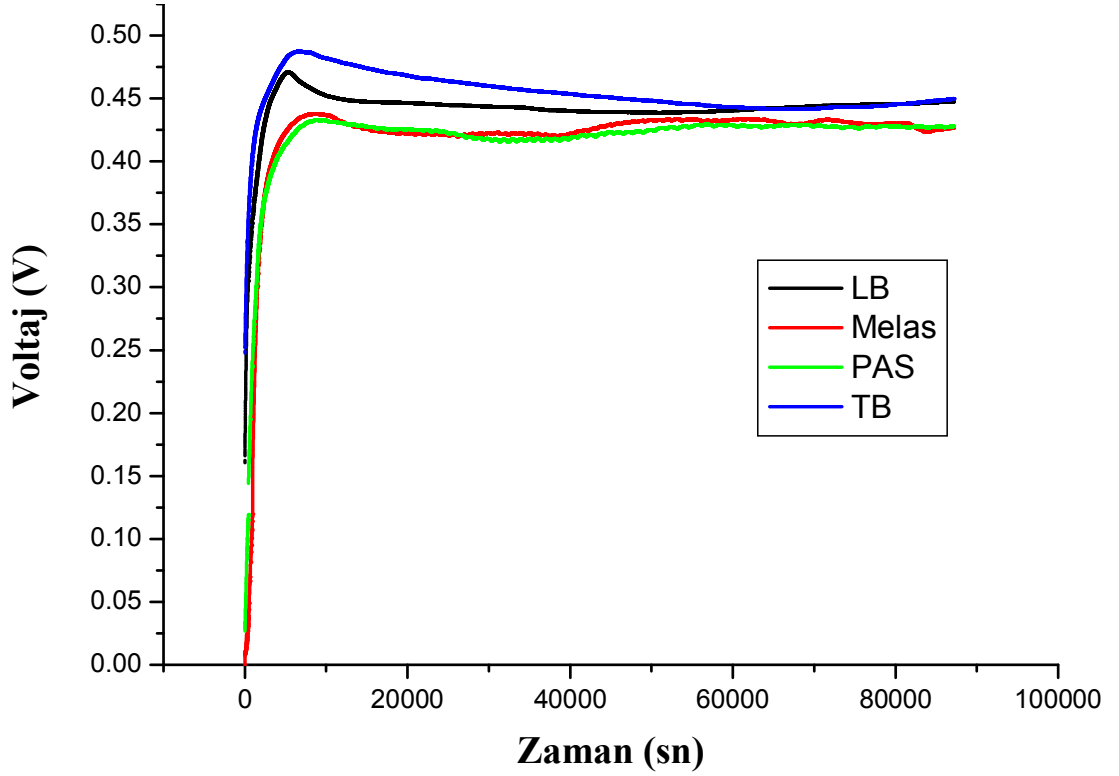
Kullandığımız bakterilerin hangi besi ortamlarında en yüksek voltaj miktarını verdiklerini saptamak için 4 ayrı besi ortamında çoğalmaları sağlanıp, bu besi ortamlarında verdikleri voltaj değerleri ölçölmüştür. En iyi ve en uygun besiyerini saptamada, elde edilen voltaj miktarının yanı sıra, seçilecek besi ortamının ekonomik olmasına da dikkat edilmiştir.

Enterobacter aerogenes ve onun [pUC8], [pUC8:15] rekombinant suşlarının her biri için 37 °C’de Melas, TB, PAS ve LB besi ortamlarında yapılan deneylerden elde edilen veriler, aşağıda grafik olarak sunulmuştur (şekil 4.5.– 4.7).



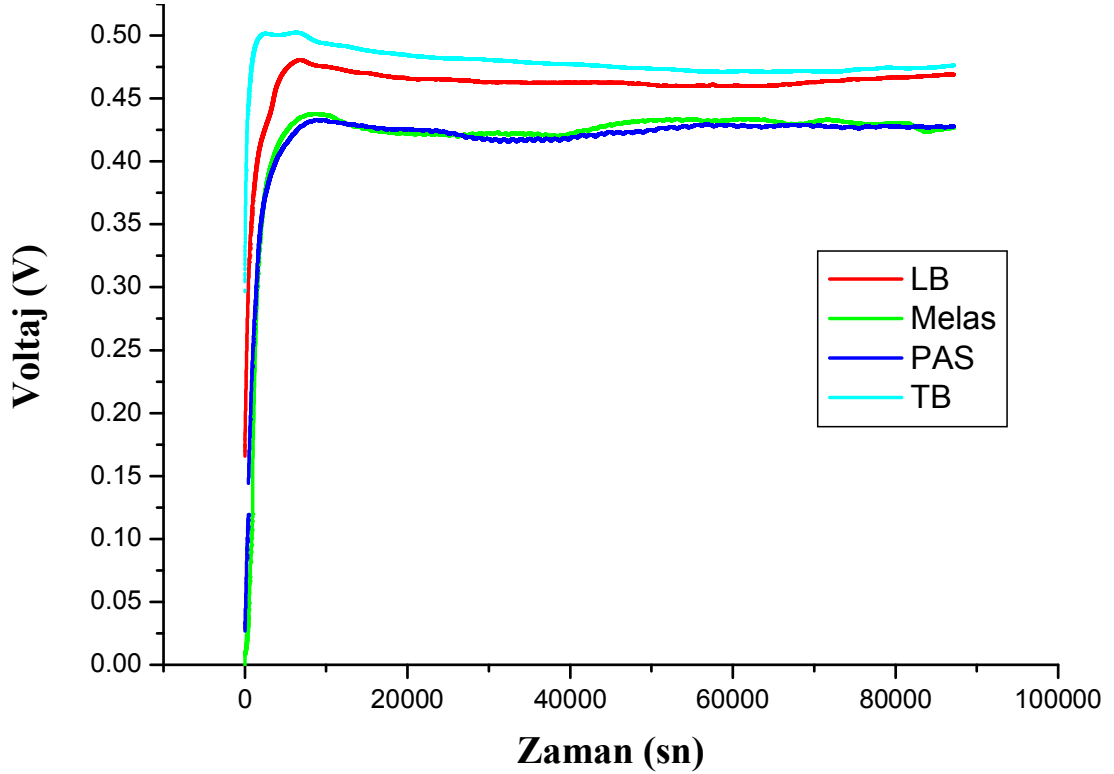
Şekil 4.5. *Enterobacter aerogenes*'in 4 ayrı besi ortamında gerçekleştirilen deneysel voltaj değerleri grafiği.

Yapılan çalışmada; *Ea* için, Melas'ta yapılan ölçümlerde en yüksek voltaj değeri 0,438 V, PAS'da yapılan ölçümlerde 0,436 V, TB'de yapılan denemelerde 0,508 V ve LB'de yapılan denemelerde ise bu değer en yüksek 0,476 V olarak okunmuştur (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* için en yüksek voltaj değerini veren besi ortamının **TB** olduğu gözlenmiş olup, en düşük voltaj değeri ise **PAS**'da okunmuştur.



Şekil 4.6. *Ea* [pUC8]'in 4 ayrı besi ortamında gerçekleştirilen deneysel voltaj değerleri grafiği

Yapılan çalışmada; *Ea* [pUC8] için, Melas'ta yapılan ölçümlerde en yüksek voltaj değeri 0,437 V, PAS'da yapılan ölçümlerde 0,435 V, TB'de yapılan denemelerde 0,487 V ve LB'de yapılan denemelerde ise bu değer en yüksek 0,462 V olarak okunmuştur (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8] için, en yüksek voltaj değerini veren besi ortamı **TB** ve **LB** olarak belirlenirken, en düşük değer **PAS**'da gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. *Ea* [pUC8:15]'in 4 aylı besı ortamında gerçekteşıtırılen deneysel voltaj değerleri grafiği.

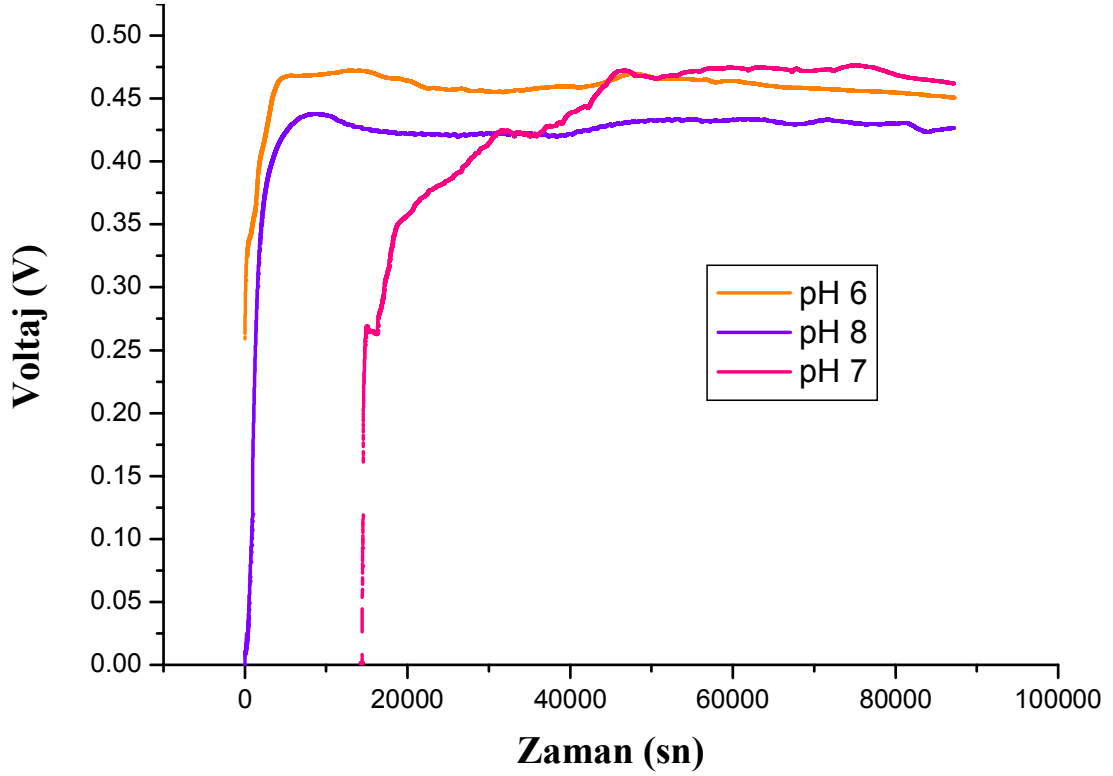
Yapılan çalışmada; *Ea* [pUC8:15] için, Melas'ta yapılan ölçümlerde en yüksek voltaj değeri 0,437 V, PAS'da yapılan ölçümlerde 0,436 V, TB'de yapılan denemelerde 0,502 V ve LB'de yapılan denemelerde ise bu değer en yüksek 0,480 V olarak okunmuştur (Deneyleler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8:15] için, en yüksek voltaj değerini veren besı ortamı **TB** olarak belirlenirken, en düşük değer **PAS**'da gözlemlenmiştir.

Çalışma bulguları tümüyle incelendiğinde; her üç bakteri için en yüksek voltaj değeri **TB**'de, en düşük voltaj değeri ise **PAS**'da gözlemlenmiştir. TB; ekonomik yönden maliyetli olması açısından TB'den sonra yüksek voltaj değerleri veren **LB** ve **Melas** değerlendirilmiş olup, hem atık değerlendirimi hem de ekonomik yönden uygunluğu ve ulaşılabilirliğinin kolay olması açısından bundan sonraki çalışmalar için en uygun besiyeri olarak **Melas** belirlenmiştir.

4.4. pH Optimizasyonu

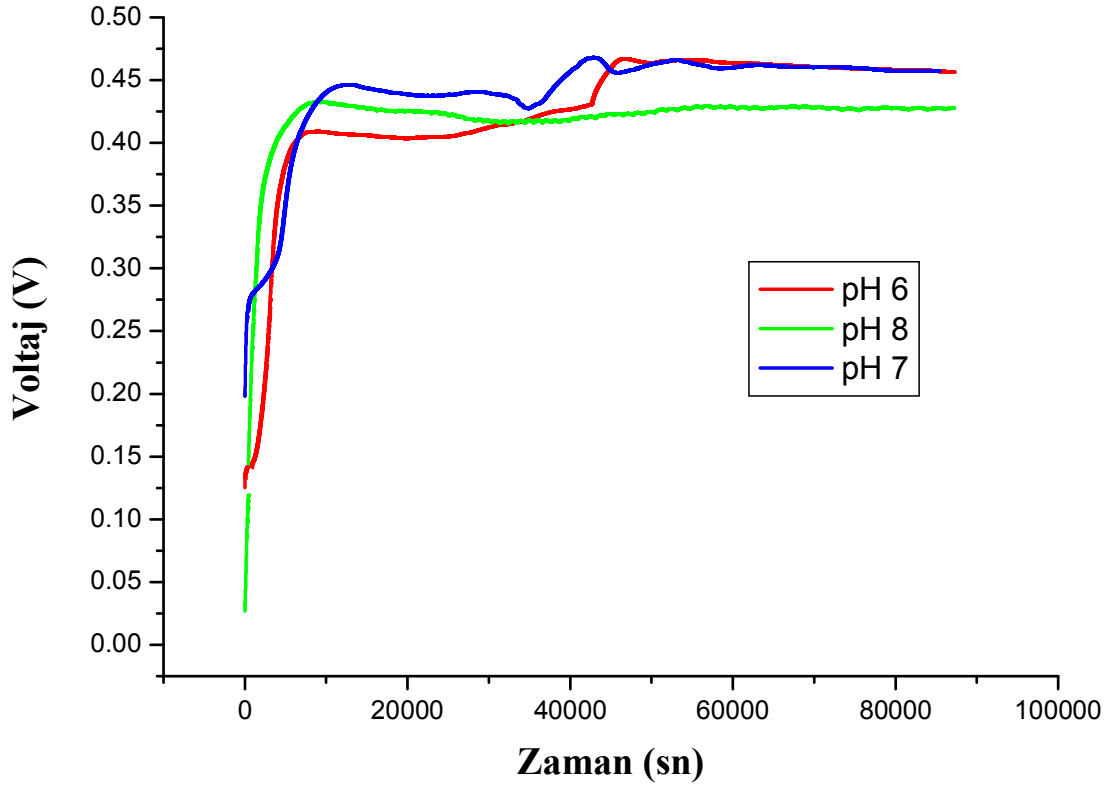
Bakterilerin voltaj üretimeine pH etkisi 3 aylı pH'da çalışılmıştır (pH 6.0 – 8.0).

Kültür ortamı olarak, bir önceki çalışmada en uygun besi ortamı olarak saptanan Melas kullanılmış ve her bakteri 37 °C’de Melas’ta bu 3 ayrı pH ortamında çoğaltılıp elde edilen voltaj değerleri grafiğe dökülmüştür (Şekil 4.8. – 4.10).



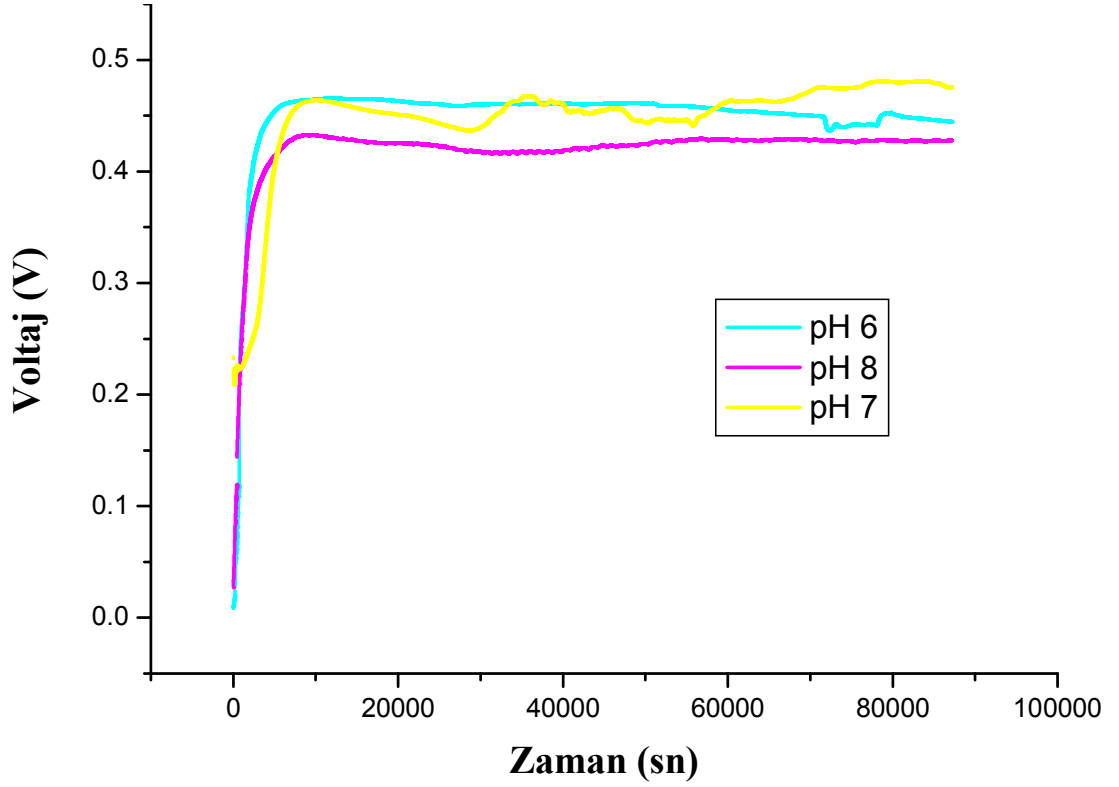
Şekil 4.8. *Ea* için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* için, Melas'ta 3 ayrı pH ile yapılan ölçümlerde pH 6.0 'da en yüksek voltaj değeri **0,472 V**, pH 7.0'da yapılan ölçümlerde **0,476 V**, pH 8.0'da yapılan denemelerde **0,438 V** olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* için, en yüksek voltaj miktarını veren pH değerinin **pH 7.0** olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. *Ea* [pUC8] için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* [pUC8] için, Melas'ta 3 ayrı pH ile yapılan ölçümlerde pH 6.0 'da en yüksek voltaj değeri 0,467 V, pH 7.0'da yapılan ölçümlerde 0,467 V, pH 8.0'da yapılan denemelerde 0,437 V olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8]'in,; **pH 7.0** ile **pH 6.0** da yüksek voltaj verdiği belirlenmiştir.



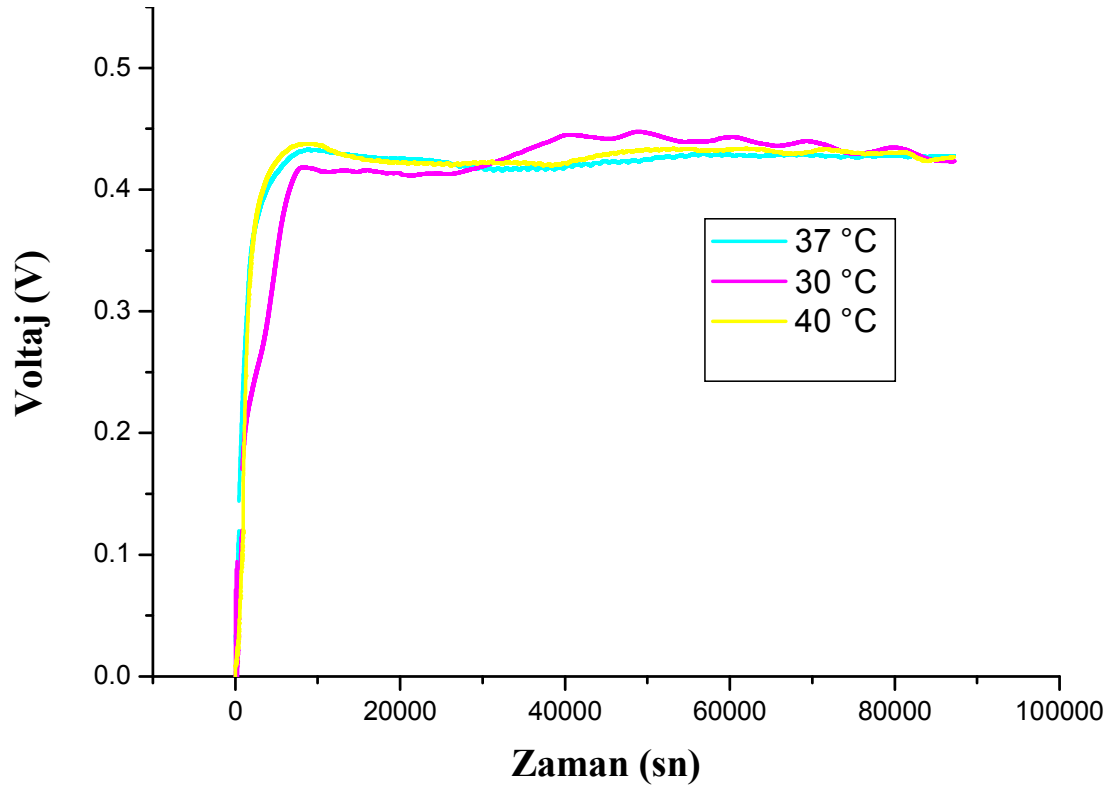
Şekil 4.10. *Ea* [pUC8:15] için Melas'ta 3 ayrı pH ortamından elde edilen voltaj değerleri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* [pUC8:15] için, Melas'ta 3 ayrı pH ile yapılan ölçümlerde pH 6.0 'da en yüksek voltaj değeri 0,465 V, pH 7.0'da yapılan ölçümlerde 0,480 V, pH 8.0'da yapılan denemelerde 0,437 V olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8:15] için, en yüksek voltaj miktarını veren pH değerinin; **pH 7.0** olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalar tümüyle incelenip her üç bakteri için en yüksek voltaj miktarını veren pH değeri **7.0** olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara pH 7.0'de devam edilmiştir.

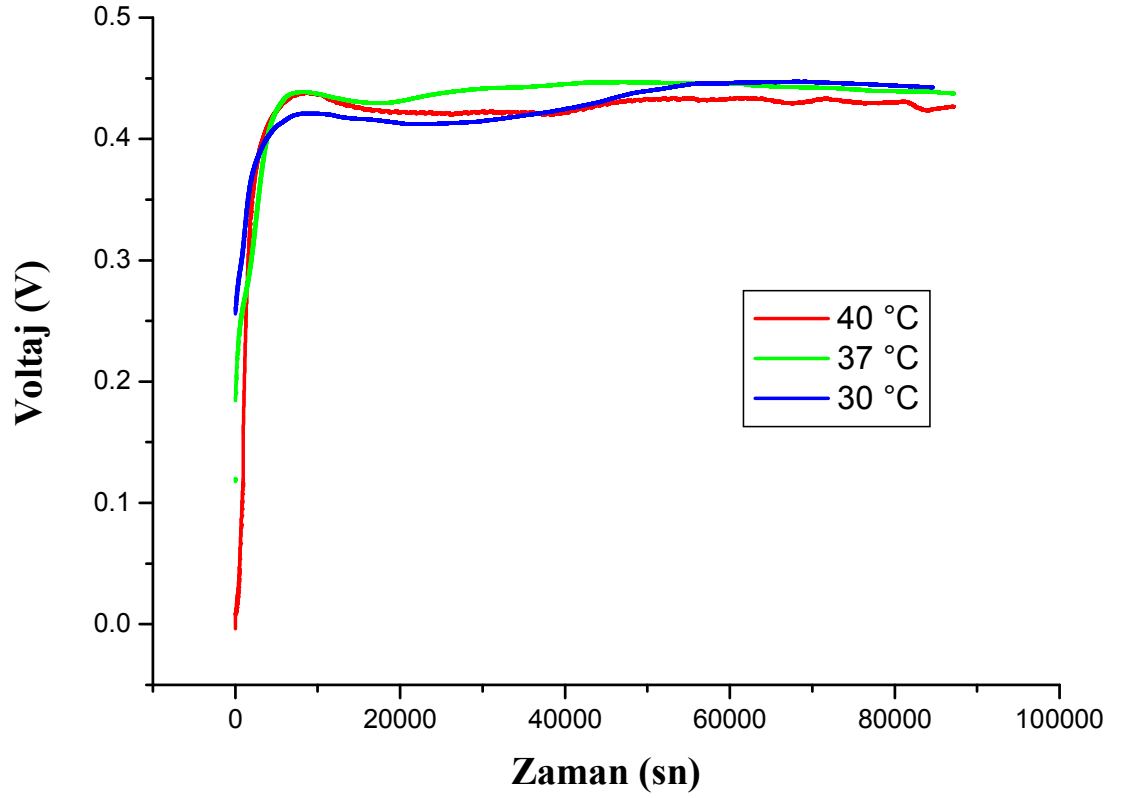
4.5. Sıcaklık Optimizasyonu

Bakterilerin istenen ölçülerde çoğalıp belli miktarda voltaj üretmeleri için besin kaynakları ve ortam pH'nın yanında ortam sıcaklığı da önemli bir dış etkidir. Değişik bakteriler değişik sıcaklıklarda çoğalma eğilimi gösterirler; buna bağlı olarak da ürettikleri voltaj da farklı olmaktadır. Bu nedenle *E. aerogenes* ve rekombinant suşlarının 30 °C, 37 °C ve 40 °C'de çoğalma karakteristiklerine bağlı olarak verdikleri voltaj değerleri çalışılmıştır. Besi ortamı olarak yine Melas kullanılmıştır.



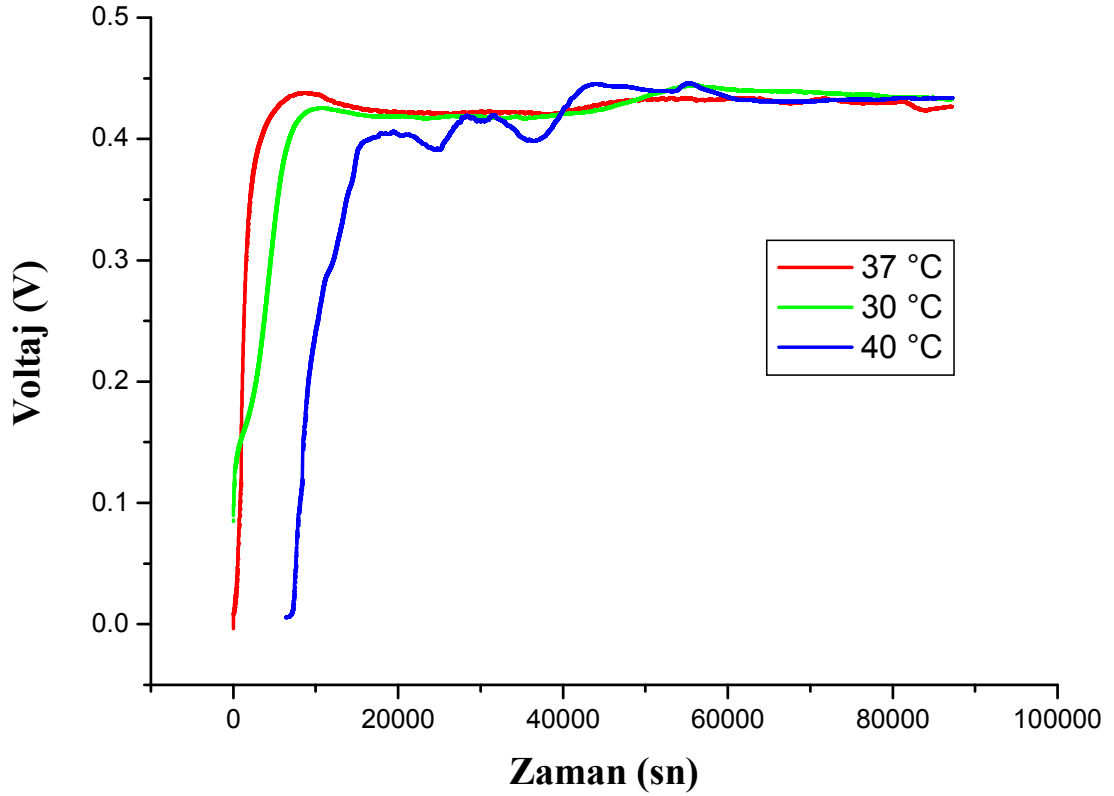
Şekil 4.11. *Ea* için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* için, Melas' da 3 ayrı sıcaklıkta yapılan ölçümlerde 37 °C'de en yüksek voltaj değeri 0,447 V, 30 °C'de yapılan ölçümlerde 0,438 V, 40 °C'de yapılan denemelerde ise 0,437 V olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* için, en yüksek voltaj miktarını veren sıcaklık değerinin; 37 °C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12. *Ea* [pUC8] için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* [pUC8] için, Melas'ta 3 ayrı sıcaklıkta yapılan ölçümlerde 37 °C'de en yüksek voltaj değeri 0,447 V, 30 °C'de yapılan ölçümlerde 0,446 V, 40 °C'de yapılan denemelerde ise 0,437 V olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8] için, en yüksek voltaj miktarını veren sıcaklık değerinin; 37 °C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *Ea* [pUC8:15] için 3 ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilen deneysel voltaj değeri grafiği.

Yapılan çalışma sonucu; *Ea* [pUC8:15] için, Melas'ta 3 ayrı sıcaklıkta yapılan ölçümlerde 37 °C'de en yüksek voltaj değeri 0,446 V, 30 °C'de yapılan ölçümlerde 0,444 V, 40 °C'de yapılan denemelerde ise 0,437 V olarak ölçülmüştür (Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, üç denemeden en yüksek değere sahip olanı en yüksek değer olarak yazılmıştır). *Ea* [pUC8:15] için, en yüksek voltaj miktarını veren sıcaklık değerinin; 37 °C olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalar tümüyle incelendiğinde, Melas'ta çoğaltılıp mikrobiyal yakıt pilinde ürettikleri voltaj miktarı okunan her üç bakteri için de en uygun sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir.

4.6. Melas Ortamında *E. aerogenes* Ve Rekombinant Suşlarının pH ve Spektrofotometrik Değerlerinin Analizi

Melas ortamında bakterilerin asit üretimi kültür pH'sının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bunun için, Melas ortamında büyütülen *E.aerogenes* ve rekombinant kültürlerin 8. Saatte pH değerleri ölçülüp tablo olarak aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.1.). Aynı zamanda 600 nm dalga boyundaki absorbansları da ölçülüp tablo devamında verilmiştir. Mikroorganizmaların buldukları ortamlardaki pH değerleri

özellikle enzimatik etkinlikler için önem taşır. Ortamın pH derecesi, bakterileri metabolitleri üzerinde etkili olur ve bu durum proton ve elektron miktarını etkileyeceğinden voltaj üretimi için önemi büyüktür.

Çizelge 4.1. *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının Melas kültür ortamında pH değişimi ve biyokütle oluşumu. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>E.aerogenes</i>	6.46 \pm 0.07	6.68 \pm 0.13	6.80 \pm 0.01
<i>Ea pUC8</i>	6.1 \pm 0.09	6.15 \pm 0.10	6.95 \pm 0.33
<i>Ea pUC8:15</i>	6.6 \pm 0.28	6.81 \pm 0.04	6.81 \pm 0.45
A₆₀₀ Değerleri			
<i>E.aerogenes</i>	0.197 \pm 0.1	0.146 \pm 0.3	0.158 \pm 0.2
<i>Ea pUC8</i>	0.205 \pm 0.2	0.173 \pm 0.2	0.158 \pm 0.2
<i>Ea pUC8:15</i>	0.185 \pm 0.1	0.140 \pm 0.3	0.161 \pm 0.3

Üç farklı pH değeri ile başlanan Melas kültür ortamlarında 24 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda; pH 6.0 başlangıç pH'lı kültürlerde genel bir artış varken, pH 7.0 ve 8.0 'da genel bir azalış vardır. En fazla pH değişiminin olduğu pH değeri 8.0 olan ortamda (yaklaşık 1 ünitelik pH azalışı) görünürken, en az pH değişimi ise başlangıç pH değeri 6.0 olan ortamda (yaklaşık 0.5 ünitelik pH artışı) kaydedilmiştir. En yüksek biyokütle oluşumu ise pH 7.0 ortamında gözlenmiş, bunu pH 6.0 ortamı izlemiştir.

Çizelge 4.2. *E. aerogenes* ve rekombinant suşlarının pH 7.0’da, 8. saat sonunda, LB, TB, PAS ve Melas ortamında pH değişimleri ve biyokütle oluşumu. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

pH 7.0				
	LB	TB	PAS	MELAS
<i>E.aerogenes</i>	7.95 \pm 0.13	6.85 \pm 0.22	4.67 \pm 0.45	6.68 \pm 0.13
<i>Ea pUC8</i>	7.88 \pm 0.22	6.80 \pm 0.07	4.64 \pm 0.72	6.15 \pm 0.10
<i>Ea pUC8:15</i>	7.93 \pm 0.05	6.89 \pm 0.16	4.93 \pm 0.86	6.81 \pm 0.04
A₆₀₀ Değerleri				
<i>E.aerogenes</i>	0.629 \pm 0.2	0.660 \pm 0.2	0.544 \pm 0.1	0.205 \pm 0.3
<i>Ea pUC8</i>	0.574 \pm 0.2	0.510 \pm 0.1	0.518 \pm 0.1	0.185 \pm 0.2
<i>Ea pUC8:15</i>	0.548 \pm 0.3	0.747 \pm 0.3	0.465 \pm 0.2	0.197 \pm 0.3

Başlangıç pH’sı 7.0 olan LB ortamında, kültür sonrası pH’larda genel bir artış varken, TB, PAS ve Melas ortamlarında pH değerlerinde genel bir azalış vardır. En fazla değişim PAS ortamında görünürken (yaklaşık olarak 2,5 ünitelik pH azalışı), en az değişim LB ve TB ortamlarında kaydedilmiştir (yaklaşık olarak 0,2 ünitelik pH değişimi). En yüksek biyokütle oluşumu TB ortamında gözlenirken, bunu LB, PAS ve Melas ortamları izlemektedir.

4.7. Direnç- Voltaj İlişkisi

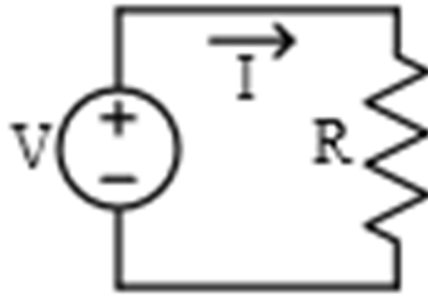
Bir elektrik devresinde iki nokta arasındaki iletken üzerinden geçen akım, potansiyel farkla (örn. voltaj veya gerilim düşümü) doğru; iki nokta arasındaki dirençle ters orantılıdır.

$$I = \frac{V}{R}$$

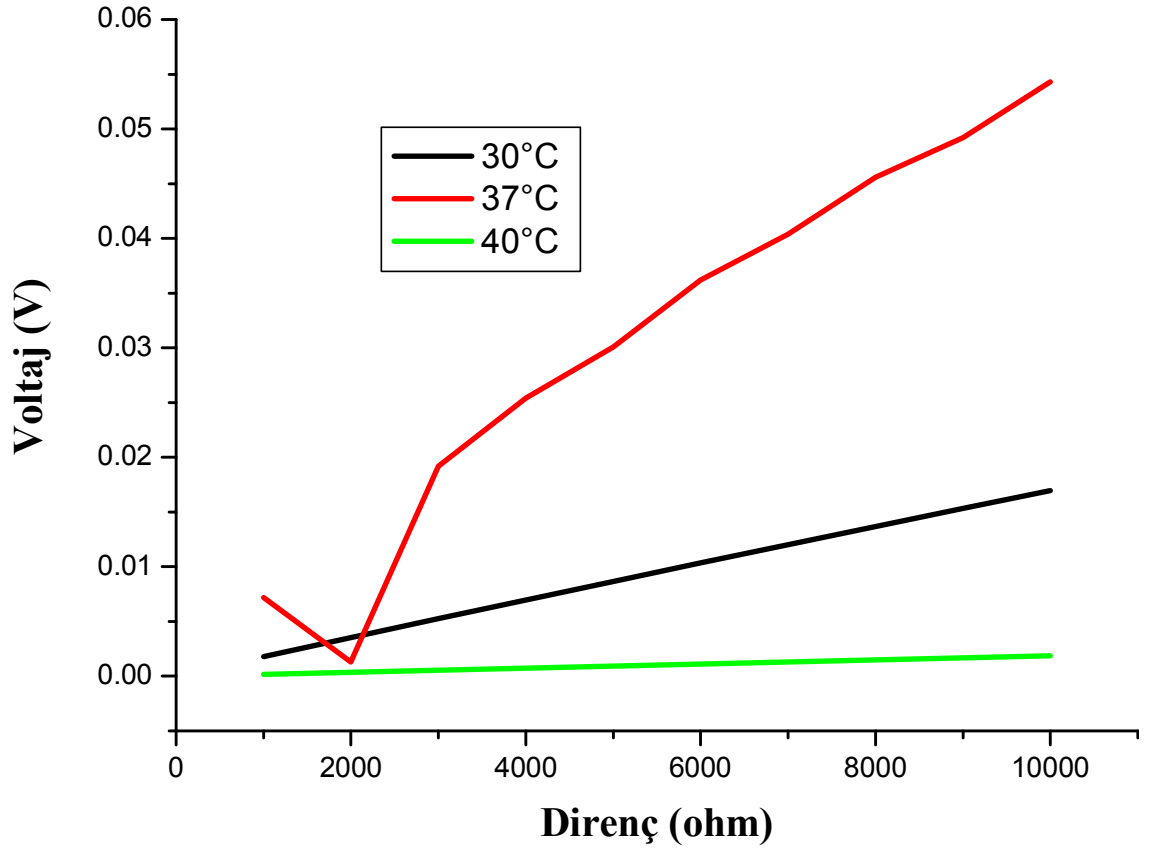
Burada, I akım amper, V referans alınan iki nokta arasındaki potansiyel fark volt ve R ohm olarak ölçülür ve direnç olarak adlandırılan devre değişkeni (volt/amper)’dir. Bu kanun basit elektriksel devrelerdeki telden geçen akım ve

gerilim miktarını açıklar. Gerilim kaynağının + veya pozitif ucu direnci önemsenmeyen bir iletkenle direnç uçlarının birine bağlanmıştır. Bu iletken den geçen akım I ve ok işareti akımın yönünü gösterir. Direncin ikinci ucu başka bir iletkenle voltaj kaynağının - ucuna bağlanır. Bu form kapalı devredir. Çünkü gerilim kaynağının bir ucundan çıkan akım diğer ucuna dönmüştür. Gerilim negatif yüklü elektronların iletken boyunca hareket ettiği bir elektriksel kuvvettir. Akım elektron akışına ters yönde akar ve direnç akıma karşı gösterilen zorluktur. Ohm Kanununda bahsedilen 'iletken' üzerinde gerilimin ölçüldüğü bir devre elemanıdır. Dirençler, üzerinden elektrik şarjının yavaşça aktığı iletkenlerdir.

Sistemimizde voltu ölçen multimetreye bir direnç ölçer bağlanarak, Melas'ta çeşitli sıcaklık ve pH aralıklarında dirence karşı gösterilen gerilim kaydedilmiştir. Direnç artışına voltajın gösterdiği tepki araştırılmıştır. MYH sistemine bir dış direnç uygulanmasının voltaj düşüşüne neden olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler grafiğe döküldüğünde dirençle voltaj arasında liner bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15.-4.20). Sistemde direnç ölçer multimetreye paralel olarak bağlanmıştır (Şekil 4.14.).

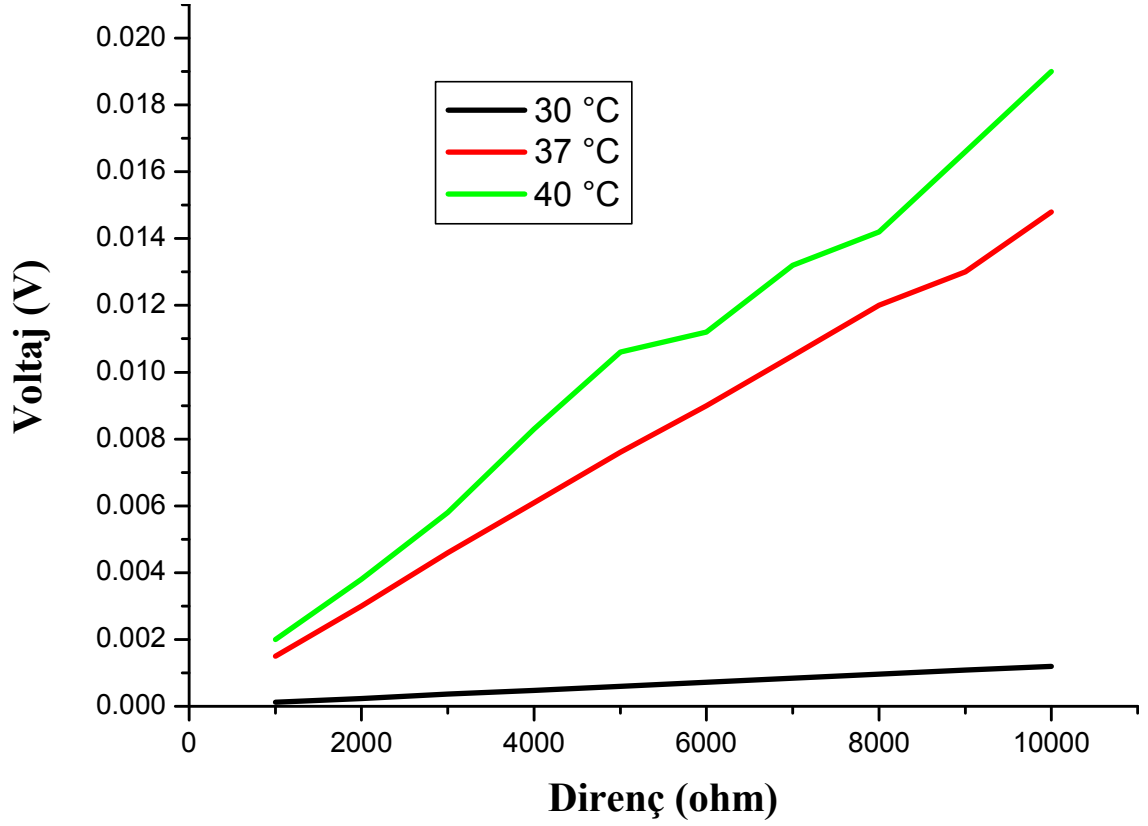


Şekil 4.14. Sisteme direnç-ölçer bağlanmasının şematik gösterimi.



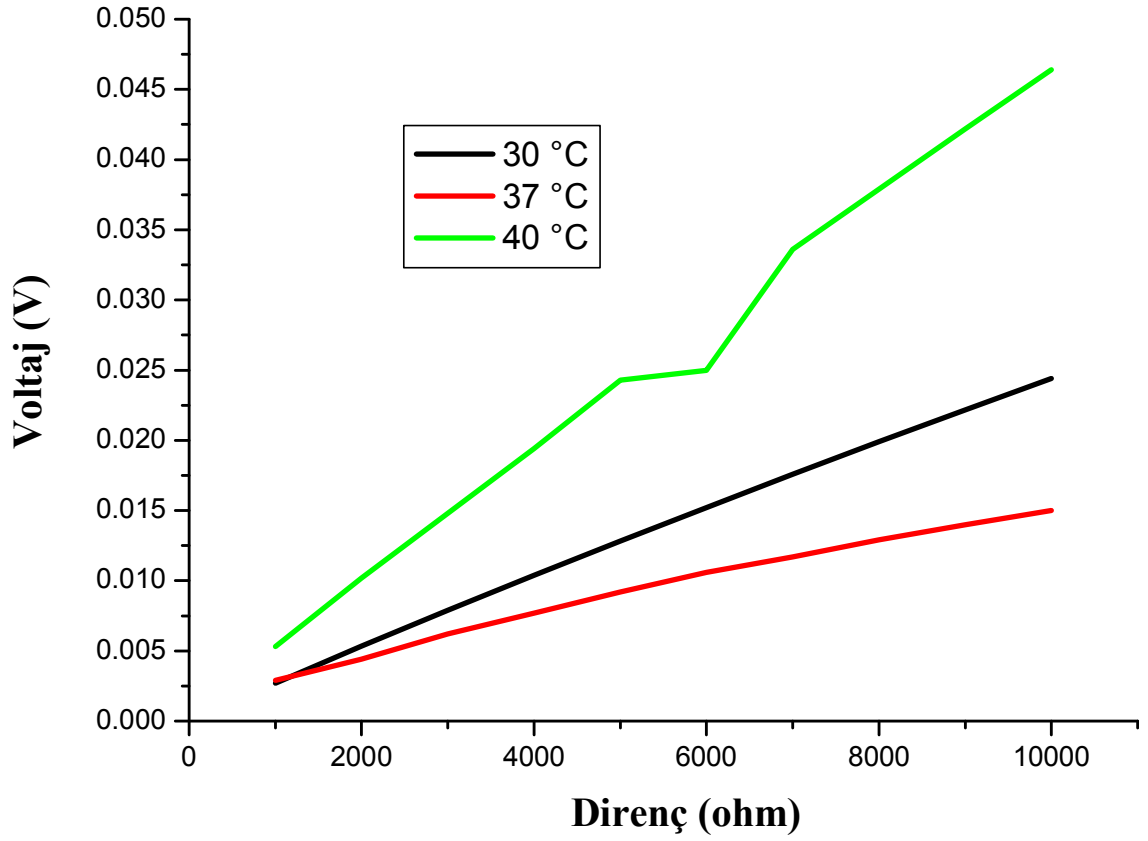
Şekil 4.15. *Ea* ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

Ea ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen çalışmada; dirençle voltaj arasında var olan doğrusal ilişki gözlemlenmiştir. 30°C’ de okunan en yüksek voltaj değeri 0.01695 V iken, 37°C’ de ve 40°C’ de okunan en yüksek voltaj değerleri sırasıyla 0.0543 ve 0.00188 V’dır.



Şekil 4.16. *Ea* [pUC8] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

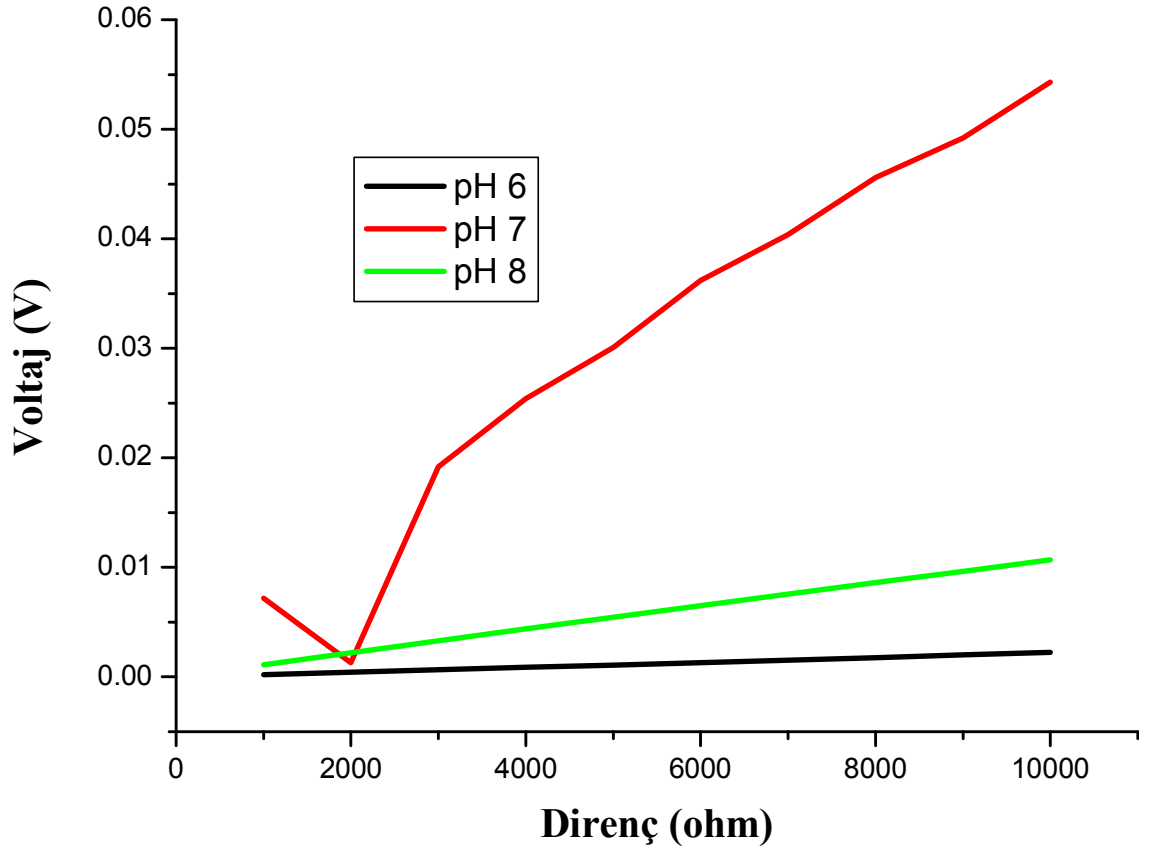
Ea [pUC8] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen çalışmada; sıcaklık artışının direnç –voltaj arasındaki doğrusal ilişkiyi desteklediği gözlenmiştir. 10000 Ω 'da 30°C'de okunan voltaj değeri 0,0012 V iken, aynı ohm'da 37°C'de ve 40°C'de okunan voltaj değerleri sırasıyla 0,0148 ve 0,0190 V'dır. Direncin artmasıyla voltaj değerinin de arttığı gözlenmiştir. En yüksek voltaj değeri ise 40°C'de okunmuştur.



Şekil 4.19. *Ea* [pUC8:15] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

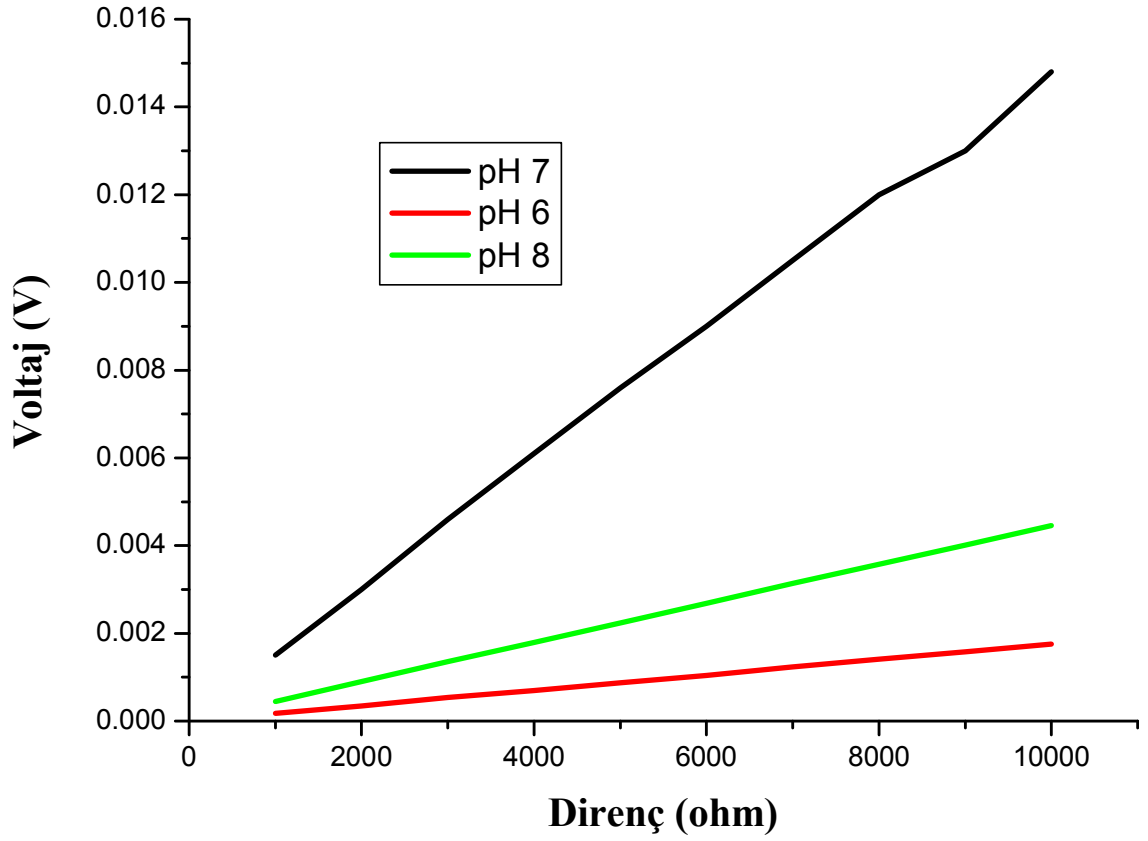
Ea [pUC8:15] ile 3 farklı sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen çalışmada; dirence karşı en yüksek voltaj değeri 30°C’ de 0,02441 V iken, 37°C’ de ve 40°C’ de okunan en yüksek voltaj değerleri sırasıyla 0,0150 ve 0,0464 V’dir. Dolayısıyla en yüksek voltaj değeri 40°C’ de okunmuştur.

Tüm bulgular bir arada değerlendirildiğinde MYH sistemimize bir dış direnç uygulanması; tüm sıcaklıklarda başlangıç voltaj değerini önemli ölçüde düşürmüştür. Başlangıç değeri yaklaşık olarak 0.430 V iken direnç uygulanmasıyla bu değer 0.00188 V’lara kadar düşmüştür.



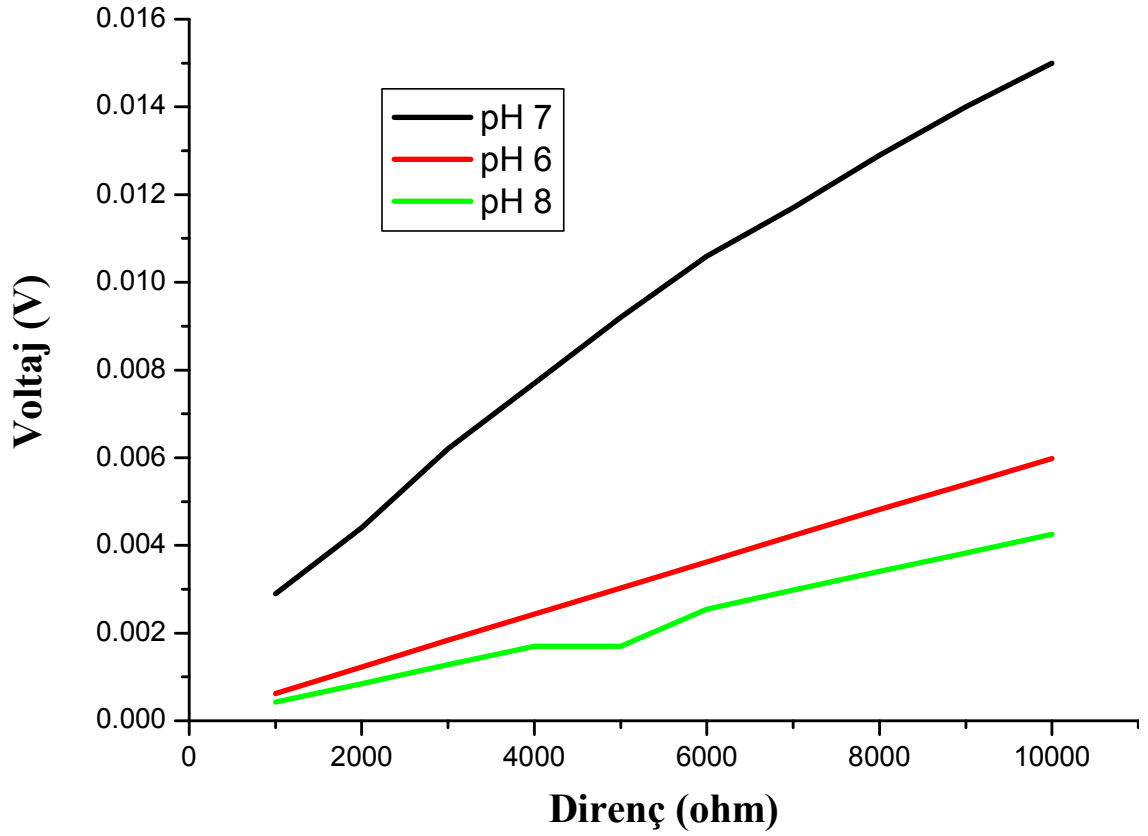
Şekil 4.20. *Ea* ile 3 ayrı pH’da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

Ea ile 3 ayrı pH’ da gerçekleştirilen deneyde; dirençle voltaj arasındaki doğrusal ilişki ile uyumlu değerler tespit edilmiş ve en yüksek voltaj değeri, pH 7.0’da 0.0543 V olarak ölçülmüştür. pH 6.0 ve pH 8.0’daki en yüksek voltaj değerleri ise sırasıyla; 0.00223 ve 0.01068 V’dır. Böylece dirence karşı en yüksek voltaj değerini veren pH’in 7.0 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.21. *Ea* [pUC8] ile 3 ayrı pH'da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

Ea [pUC8] ile 3 ayrı pH'da gerçekleştirilen deneyde; dirençle voltaj arasındaki doğrusal ilişki ile uyumlu değerler tespit edilmiş olup, en yüksek voltaj değeri, pH 7.0'da 0.0148 V olarak ölçülmüştür. pH 6.0 ve pH 8.0'daki en yüksek voltaj değerleri ise sırasıyla; 0.00175 ve 0.00445 V'dir. Böylece dirence karşı en yüksek voltaj değerini veren pH'ın 7.0 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.22. *Ea* [pUC8:15] ile 3 ayrı pH’da gerçekleştirilen, 1000-10000 Ω arasındaki dirence karşı voltaj grafiği.

Ea [pUC8:15] ile 3 ayrı pH’da gerçekleştirilen deneyde; sonuçların direnç – voltaj arasındaki doğrusal ilişkiyi desteklediği gözlenmiş olup, en yüksek voltaj değeri, pH 7.0’da 0.015 V olarak ölçülmüştür. pH 6.0 ve pH 8.0’daki en yüksek voltaj değerleri ise sırasıyla; 0.0059 ve 0.0042 V’dır. Böylece dirence karşı en yüksek voltaj değerini veren pH’ın 7.0 olduğu bulunmuştur.

Tüm bulgular bir arada değerlendirildiğinde, 3 pH’da da sisteme bir dış direnç uygulanması başlangıç voltaj değerini önemli ölçüde düşürmüştür. Başlangıç voltaj değeri yaklaşık olarak 0.450 V’dan 0.0042 V’lara kadar düşmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmalarla, MYH sistemleri ile elektrik üretiminde bakterilerin avantajlı sistemler olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda *Geobacter* (Richter ve ark., 2008), *Enterobacter* (Rezaei ve ark., 2009), *Shewanella* (Watson ve Logan, 2010) ve *Bacillus* (Nimje ve ark., 2009) türü bakterilerin MYH'deki maksimum güç çıkışları ve elektrik enerjisi üretimleriyle ilgili deneyler yapılmıştır. MYH çalışmalarında saf kültürlerden çok karışık kültürler tercih edilmektedir. Karışık kültürlerin strese karşı daha dirençli olmaları ve besinsel adaptasyonlarının yüksek olması kararlı olmalarını sağlamaktadır. Ancak saf kültür çalışmalarının da hem mekanistik hem de fizyolojik detayları doğrudan gözlemlemeye izin verme gibi bir avantajı vardır (Lanthier ve ark., 2008). Kiely ve ark.(2010) tarafından oluşturulan çalışmada da *Shewanella* (MR-1)'in karışık bir kültürden daha fazla güç yoğunluğu ürettiği gösterilmiştir. Çalışmamızda rekombinant sistemlerin elektrik üretimine etkisinin gözlenmesi hedeflendiği için saf kültür uygulaması tercih edilmiştir.

E. aerogenes; fermentatif hidrojen üretiminde en yaygın çalışılan türlerden biridir (Tanisho ve ark., 1983). Tanisho ve ekibi, *E.aerogenes*'in iyi bir hidrojen üreticisi olduğunu keşfetmişlerdir ve 1980 ile 1990' lar boyunca hidrojen üretiminde *E.aerogenes*'in temel fermentasyon özelliklerini çalışmışlardır (Tanisho, 2000; Tanisho ve ark., 1987). *E. aerogenes* MYH sisteminde, substrat olarak kullanılan glukozun 1 molüne karşılık 10 mol hidrojen açığa çıkarmaktadır. Bu nedenle enerji çalışmalarında tercih edilen bir bakteri türüdür (Zhang C ve ark., 2011). Tez çalışmamızda; *Enterobacter aerogenes* ile onun rekombinant suşları (*Ea puc8*, *Ea puc8:15*) kullanılmıştır. Rekombinant suşlardan *Ea [pUC8:15]* suşu, 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3- Kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlaması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. *Ea [pUC 8]* suşu ise sadece pUC8 plazmidini taşımaktadır. *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni (*vgb*) promotör- operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotörü oksijene duyarlı bir promotör olup aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotör üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar

(Erenler Ş, 2007).

VHb sentezinin oksijene duyarlı *vgb* promotoru nedeniyle, doğal konakçıklarında ve klonlandığı organizmalarda düşük oksijenli ortamlarda yüksek oranda gerçekleştiği ve VHb senteziyle beraber organizmaların büyüme ve gelişimlerinin arttığı kaydedilmiştir. İlave olarak, üretimleri belli seviyede oksijen gerektiren çeşitli metabolitler ve rekombinant proteinler de VHb/*vgb* sistemi taşıyan organizmalarda önemli artışlar göstermiştir (Gould JL, 1999; Zhang Y ve ark., 2002). Dolayısıyla endüstriyel kullanımda bu proteinin özellikle bazı mikroaerobik fermentasyonlar için etkili bir ajan olarak kullanılabilceği ortaya atılmıştır.

Genel olarak, MYH'lerin çift bölmeli ve katot elektrotun doğrudan hava ile temas ettiği tek bölmeli iki tasarımı mevcuttur. Çalışmamızda kullandığımız MYH'si çift bölümlü MYH tasarımıdır. Böyle MYH'leri genellikle bir proton değişim membranıyla ayrılmış aerobik bir katot bölümünden ve anaerobik bir anot bölümünden oluşurlar. Deneylelerimizde bakterileri anot bölümüne enjekte ettik ve bu bölümde substratın bakteriler tarafından okside olup elektronların MYH sistemi sayesinde yakalanıp voltaj olarak okunması gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada; anot bölümünde elektron ve protonları meydana getiren bakteriler tarafından substratın okside olduğu rapor edilmiştir (Li ve ark., 2010). Yapılan bir başka çalışmada; çift bölmeli MYH'si ve atık su arıtma tesisinden alınan çamur kullanılarak elektrik üretimi gerçekleştirilmiştir, bu çalışmada maksimum voltaj 250 mV olarak elde edilmiştir (Çavdar P ve ark., 2011). Bir diğer başka çalışmada ise sentetik atıksu kullanılmış, laboratuvar ölçekli ve iki bölmeli kübik-MYH (KMYH) reaktöründe organik madde giderimi ile birlikte, elektrik enerjisi üretme çalışmaları yapılmıştır. Glikozun elektron verici olarak kullanıldığı çalışmada, KMYH reaktörde üretilen voltaj değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada maksimum voltaj 26 mV'a ulaşmıştır (Kılıç A ve ark., 2011). Grzebyk ve Po'zniak; benzer MYH reaktörü kullanarak yaptıkları çalışmada, düşük yoğunluklu polimerden üretilen interpolimer katyon değiştirici membranın elektrik üretimine etkisini araştırmışlardır. Glikozun elektron verici olarak kullanıldığı bu çalışmada farklı yoğunlukta membranlar kullanılmıştır. % 1'lik DVB membran ile voltaj max. 50 mV olurken, % 20'lik DVB membran kullanıldığında max. voltaj 70 mV'a yükselmiştir. Bu çalışma ile MYH'de kullanılan membran yapısının önemli olduğu vurgulanmıştır (Grzebyk ve Po'zniak, 2005). Bizim çalışmamızda kullanılan daha ucuz bir membran olan Nafion membran ile bu çalışmada elde edilen değerlere yakın değerlerde elektrik üretilbildiği ortaya

konmuştur. Dolayısıyla, iki bölmeli MYH reaktörlerde kullanılan membran türü de önemli bir etkidir. Membranlar; MYH sisteminde anot ve katot bölümleri arasındaki iyonik akışı düzenlemek için kullanılırlar, bunların görevi anot ve katot bölümlerini birbirinden ayırmaktır. Membranlar genellikle Nafion ya da Ultrex gibi kation değişim zarı veya tuz köprüsü şeklindedir (Kılıç A ve ark., 2011). Nafion TM; yüksek iyonik iletkenlik sağlayan olarak, en yoğun şekilde çalışılan yakıt hücre membranıdır (10^{-2} S cm^{-1}). Nafion TM; sınırlı sıcaklık aralığında hassas çalışma özelliği (100°C 'den daha az; Basura ve ark., 1998) ve oksijen geçirgenliği (9.3×10^{-12} mol cm^{-1} s^{-1} ; Basura ve ark., 1998) nedeniyle kısıtlı bir çalışma alanına sahiptir. Çalışmamızda sisteme sağladığı avantajlar nedeni ile Nafion membran kullanımı tercih edilmiştir.

MYH reaktörlerde kullanılan elektrot ve membran yüzey alanları ile reaktör hacmi arasındaki oranın önemli olduğu görülmüştür. KMYH reaktörü hacimce küçük olmasına rağmen, elektrot ve membran yüzey alanının eşit oluşunun elektrik üretim performansını olumlu etkilediği düşünülmektedir. Benzer reaktörler kullanılarak yapılan çalışmalarla kıyaslandığında, elde edilen bulguların literatürdeki bilgileri doğruladığı görülmüştür. Özellikle membran yapısı ve reaktör modeli modifiye edilerek, uygun ucuz bir kimyasal mediyatör ile enerji üretim veriminin artırılmasına yönelik araştırmaların sürdürülmesi önerilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız reaktörün modellemesi MYH çalışma prensipleri dikkate alınarak tarafımızdan yapılmıştır.

Mikroorganizmaların çoğu elektrokimyasal olarak inaktiftirler. Mikroorganizmalardan elektrota elektron transferinin; tionin, metil moru, metil mavisi, humik asit, nötral kırmızısı vb. mediyatörler sayesinde kolaylaştığı gösterilmiştir (Delaney ve ark., 2008). Bu tip MYH sistemleri; mediyatörlü- MYH sistemi olarak adlandırılır. Sistemimizde mediyatör kullandığımız için bu çalışmada işletilen MYH'si de mediyatörlü-MYH'dir. Mevcut mediyatörlerin çoğu pahalı ve toksiktir. (Rabaey ve ark., 2003). Çalışmamızda MYH sistemimizle uyumlu olduğu için mediyatör olarak metilen mavisi tercih edilmiştir. Metilen mavisinin performansının nötral kırmızısı ile kıyaslandığı bir çalışmanın sonucunda, metilen mavisi kullanılan tekli bir MYH' deki açık devre potansiyeli, mediyatör olarak nötral kırmızısı kullanıldığında üretilenin neredeyse iki katı olduğu bildirilmiştir (Daniel David K. ve ark., 2009).

MYH teknolojisinin pratik uygulamalarda kullanımından önce, performansını optimize etmeye dayalı daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmamızda MYH performansını etkileyen parametreler üzerinde çalıştık. MYH performansını etkileyen çeşitli faktörler arasında; elektrot seçimi oldukça önemlidir. Mikrobiyal yakıt pillerinde kullanılan elektrot tipi; hem mikrobiyal yakıt pilinin performansını hem de bu yakıt pilinden elde edilecek voltaj miktarını önemli ölçüde etkilemektedir. Kullanılan elektrotun sadece MYH performansını artırması özelliğine bakılmaz aynı zamanda elektrotun maliyet açısından da uygun olması gerekir. Bu amaçla son yıllarda çeşitli karbon ve metal materyaller geliştirilmiştir. Araştırmamızda bakır, grafit ve karbon elektrotları kullanılmış olup voltaj değeri karbon elektrotta ölçülmüştür.. Karbon elektrotla yaptığımız çalışmada maksimum voltaj 0.5 V olarak tespit edilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ise; platin elektrotla yapılan çalışmada 0.5 V (Sun ve ark., 2009), karbon elektrotla yapılan da 250 mV (Liu ve ark., 2009), düz karbon elektrotla yapılan çalışmada 360 mV (Li ve ark., 2010), platin elektrotla yapılan bir başka çalışmada 0.4 V (Cao ve ark., 2010) ve gözenekli karbon elektrotla yapılan diğer bir çalışmada 0.33- 0.57 V arasında bir değer elde edilmiştir (Sun ve ark., 2011). Karbon elektrotla yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz voltaj değeri, verimli düzeyde olup maliyeti yüksek olan platin elektrotlarla yapılan çalışmalarla (Sun ve ark., 2009; Cao ve ark., 2010) elde edilen sonuca benzerdir. Ayrıca karbon elektrotlarla yapılan diğer çalışmalara (Li ve ark., 2010; Sun ve ark., 2011; Liu ve ark., 2009) göre de elde ettiğimiz değer yüksektir. Bu durum; kullandığımız bakterilerin yüksek hidrojen üretim etkinliğine bağlı olarak MYH sistemimizin performansının yüksek olduğunu göstermektedir.

Kullandığımız bakterilerin en fazla voltaj miktarını verdikleri zaman aralığı bilinmemektedir. Bunu saptamak için, çeşitli zaman dilimleri kullanılarak mikrobiyal yakıt pilinin en iyi performansı gösterdiği zaman saptanmaya çalışılmıştır. Bu aşamada; bir önceki çalışmada karbon elektrotla en yüksek voltaj verimini veren LB besi ortamında 37 °C'de çoğaltılan *Ea* [pUC8:15]'in 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerdeki kültürü kullanılarak en yüksek voltaj değeri belirlenmiştir. Yapılan ölçümlerde *Ea* [pUC8:15]'in 6. saatte verdiği en yüksek voltaj değeri 0,480 V, 8. saatte verdiği değer 0,494 V, 10. saatte verdiği değer 0,490 V, 12. saatte verdiği değer 0,453 V, 14. saatte verdiği değer ise 0,476 V olarak okunmuştur Bu verilerden ve grafikden yola çıkarak *Ea* [pUC8:15]'in 6. 8. 10. 12. ve 14. saatlerdeki en yüksek voltaj veriminin 8. saatte olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalar bu bakteri grubu için en

elverişli üreme saatinin 8-10. saatler arasında olduğunu göstermektedir. Ölçüm sonuçlarımız bu anlamda literatür ile paraleldir (Erenler Ş. 2000).

Bakterilerimizin en yüksek voltaj verdikleri besi ortamını belirlemek için ayrı besi ortamında çoğalmaları sağlanıp, bu besi ortamlarında verdikleri voltaj değerleri ölçülmüştür. Her üç bakteri için en yüksek voltaj değeri TB'de, en düşük voltaj değeri ise PAS'da gözlemlenmiştir. TB besiyerinin hem zengin besinsel içeriği hemde yapısında bulunan tampon bileşikleri sayesinde ortam pH'sını dengede tutabilme avantajı nedeni ile beklenen bir sonuçtur. Yapılan farklı çalışmalarda da *E.aerogenes* ve *E.coli* bakterilerinin her ikisinde de farklı zengin besi ortamlarına göre TB de 4 kata varan yüksek üreme ve enzim değerleri tespit edilmiştir (Geckil 1995, Erenler 2007.). TB besiyerinde bulunan gliserolün bir karbon ve enerji kaynağı olarak, *E.aerogenes* türleri tarafından membran içine kolaylaştırılmış difüzyonla alınması, Melas gibi yüksek glikoz içeren besi ortamlarında bu maddenin taşınımının grup translokasyonu gibi daha yüksek enerji sarfiyatı gerektiren bir şekilde olduğunda göz önüne alındığında daha yüksek üreme ve buna bağlı olarak da yüksek voltaj değerleride şaşırtıcı değildir. Çizelge 4.2 incelendiğinde bu etkiler açıkça görülmektedir. TB besiyeri pH değişimine en fazla direnç gösteren ve en yüksek OD değerlerinin ölçüldüğü besi ortamıdır. PAS tüm besiyerleri içinde en az voltaj veren besi ortamıdır Çizelge 4.2 incelendiğinde PAS ortamında bakterilerin yoğun asidik şartlar nedeniyle istenen OD değerlerine ulaşmaması bu sonuçları açıklamaktadır. PAS içeriğinde laktoz bulunduran bir atıktır. *E.aerogenes* ise laktozu metabolize ederken asit çıkarmaktadır, ortamdaki pH düşüşü bununla açıklanabilir, düşük pH ise düşük OD yani biyokütleye neden olacaktır. TB ve LB besi ortamları mikrobiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan içeriği zengin, maliyeti yüksek sentetik besiyerleridir. MYH çalışmalarında ekonomik ve çevresel önemi nedeni ile atık kullanımı tercih edildiğinden, çalışmamızın biyoteknolojik yararına vurgu yapmak adına hem atık değerlendirimi hem de ekonomik yönden uygunluğu ve ulaşılabilirliğinin kolay olması açısından tezin kalan kısımlarında çalışmak için besiyeri olarak Melas tercih edilmiştir. Çizelge 3.2 de belirtildiği gibi Melas yapısında yüksek oranda glikoz içeren bir şeker fabrikası atığıdır. Elde edildiği işletmeler arasında da fark gösteren bir metal yapısına ve yoğun organik bir yüke sahiptir. Çalışmamızda atıkların elementel analizi yapılmadığı için bu konuda kesin bir yargıya varılamayacaktır. Çizelge 4.2 dikkatli bir şekilde incelendiğinde Melas ortamında şiddetli bir pH değişimi olmamasına karşın biyokütle değerlerinde önemli

bir sınırlama olduğu anlaşılmaktadır. Fakat hücresel bazda OD değerleri ile voltaj değerleri birlikte ele alındığında Melas ortamında hücre başına voltaj üretiminin diğer ortamlara göre oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre, bundan sonraki çalışmalarımızda Melasın elementel yapısı dikkatli bir şekilde analiz edilerek, çeşitli iyileştirme şartları uygulandığında MYH sisteminde kullanımı ile zengin sentetik besiyerlerinden çok daha yüksek voltaj değerleri saptanabileceği öngörülmektedir. Bu noktada bundan sonraki çalışmalarda daha ekonomik ve çevre dostu substratların kullanımı için daha elverişli ortamlar hazırlamada bu sonuçlar yol gösterici olacaktır.

Besiyerlerinde voltaj değeri, pH ve biyokütle değerleri, suşlar için ayrı ayrı değerlendirildiğinde doğal bakteri ile vgb^+ rekombinant sistemin birbirine yakın değerler verdiği, vgb^- rekombinantın ise daha düşük voltaj değerleri verdiği tespit edilmiştir. Bu koşullarda vgb^- rekombinantın düşük aktivitesinin plazmid varlığından kaynaklanan metabolizma ek yükü ve buna bağlı olarak düşük biyokütle değeri ile açıklanabilecektir. Gliserol içeren TB ortamında doğal suş ile vgb^+ suşunun sırası ile 0,508 ve 0,502 V ile birbirine yakın değerler verdiği belirlenmiştir. Bu koşullarda vgb^+ suşunda entegre rekombinant sistemin avantajı ile yüksek biyokütle oluşumu tespit edilmiştir. Bu avantajın sisteme daha fazla kültür ilavesi, ortamda sirkülasyonun sağlanması veya medyatörün farklı konsantrasyonlarının denenmesi ile daha fazla gözlenebilmesi mümkün olabileceği ön görülmektedir. vgb geninin dahil olduğu bakterinin metabolizmasında önemli değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Daha önceki çalışmalar *Vitreoscilla* hemoglobini taşıyan rekombinant bakterilerin kontrol konakçılara göre on kata varan daha yüksek oksijen alımı yaptıkları ve hücrelerin daha okside durumda olduklarını göstermiştir (Tsai PS ve ark., 1996; Zhang Y ve ark., 2002). VHb içeren hücrelerin kontrollere göre daha okside durumda olmaları, bu hücrelerin daha etkin bir solunuma sahip olmasına ve TCA gibi metabolik yolları ve solunum zincirini daha etkin kullanmasına bağlanmıştır (Tsai PS ve ark., 1996). Bu anlamda, VHb içeren bakterilerin kontrollerine göre daha yüksek bir ATP düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. vgb 'nin bakterilerde önemli bir etkisi de metabolik yol açısından olmuştur. vgb taşıyan bakteriler pentoz fosfat yolunu tercih etmektedirler ve yüksek hücre yoğunluğu göstermektedirler (Erenler Ş, 2007). Bu avantajları dikkate alındığında vgb 'nin MYH sistemine çok daha büyük avantajlar sağlayabileceği açıktır. Farklı MYH reaktörlerinde rekombinant sistem için çok daha uyumlu bir yapı oluşturulabileceği açıktır. Düşük oksijen şartlarında

bakterinin etkin TCA kullanımını sağlayarak kültür süresini uzatabilen bu sistem tamamen oksijensiz koşulların oluşturduğu kullandığımız MYH modelinde muhtemelen bakterinin pentoz fosfat yolu ile enerji elde etmesini sağlamaktadır Bu yol da TCA'ya göre oldukça düşük bir enerji verimine sahiptir. Voltaj oluşumuna yol açan elektron ve proton akışı da bu metabolik yolda TCA kadar yüksek değildir.

Melas ortamındaki doğal suş ve *vgb*⁻ rekombinant ile hemen hemen aynı voltaj değerini vermesi sistemin etkisiz olduğu izlenimi verse bile *vgb* promotorunun glikoz varlığında baskılandığı ve sistemin negatif yönde etkilendiği düşünüldüğünde, düşük OD değerlerine ve asidik pH koşullarında karşın bakteriye kazandırdığı avantajlar anlaşılabilir. Atık besiyeri kullanımını MYH sistemlerinde düşük maliyeti ve biyoteknolojik önemi açısından değerlidir. Elektrik üretiminin organizmanın ürettiği H ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir. *vgb* sisteminin ise organizmaların TCA döngüsünü daha etkin kullanmasını sağlayarak daha yüksek ATP sentezi sağladığı bilinmektedir. Bu mekanizma tam olarak anlaşılammışsa da NAD⁺/NADH oranlarında önemli değişimler oluşturarak bunu sağladığı düşünülmektedir (Roos V ve ark., 2004). Bahsedilen bu özellikleri ile *vgb*⁺ bakterilerin bu sisteme kazandırabileceği avantajlar açıktır.

Çalışmamızda sonraki aşamada suşlarımızın 37 °C'de Melas ortamında 3 ayrı pH derecesinde üremeleri sağlanmıştır. Çalışmalardan elde edilen bilimsel bulgular, pH'nin önemli bir parametre olduğunu ve anot bölümünde glikozun indirgenmesi sonucunda açığa çıkan H⁺ iyonlarının pH'nin yükselmesine neden olduğunu göstermektedir. Deneyler sonucunda her üç bakteri için en yüksek voltaj miktarını veren pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara pH 7.0'de devam edilmiştir. Bakterilerin optimum büyümesi için genellikle nötre yakın pH değerine ihtiyaçları vardır, bakteriler iç ve dış pH'daki değişikliklere aktivitelerini ayarlayarak cevap verirler (He Z ve ark., 2008; Puig S ve ark., 2010). Bakterilerin büyüme şartlarına bağlı olarak oluşan pH değişiklikleri; biyofilm oluşumu, proton-hareket ettirici güç, membran potansiyeli, iyonların konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelerde değişimlere neden olabilmektedir (Patil SA ve ark., 2011; Jung S ve ark., 2011). Anodik pH ortamı, substrat aktivitesini ve dolayısıyla elektron/proton üretim mekanizmasını etkileyebilen önemli faktörlerden biridir. Asidik anot; bakteriyel aktiviteyi azaltabilir (Behera M ve Ghangrekar M, 2009; Yuan Y ve ark., 2011). Bu nedenle, anot bölümündeki pH değeri, mikroorganizmaların elektrik üretimi ve gelişimi için çok önemli bir rol oynar. (Nimje VR ve ark., 2011). Bu

çalışmalara paralel olarak bizim çalışmalarımızda da nötral pH da optimum voltaj değerleri gözlenmiş, anodik pH da azalan voltaj etkinliği tespit edilmiştir. Anottaki bakteri aktivitesi; yalnızca anotun pH' dan etkilenmez, aynı zamanda protonların tükenmesi ya da sağlanması yoluyla değişen elektrolit pH' sından da etkilenir. Sonuçlar göstermiştir ki; anodik bakteriyel aktivite nötral bir pH'da en iyi değerleri verirken, katodik reaksiyon optimum aktivite için daha yüksek bir pH'ya ihtiyaç duymaktadır (Raghavulu ve ark., 2009). Melas ortamında bakterilerin asit üretimi kültür pH'sının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bunun için, Melas ortamında büyütülen *E.aerogenes* ve rekombinant kültürlerin 8. Saatte pH değerleri ölçülüp tablo olarak çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1.). Aynı zamanda 600 nm dalga boyundaki absorpsanları da ölçülüp tablo devamında verilmiştir. Mikroorganizmaların buldukları ortamlardaki pH değerleri özellikle enzimatik etkinlikler için önem taşır. Ortamın pH derecesi, bakterileri metabolitleri üzerinde etkili olur ve bu durum proton ve elektron miktarını etkileyeceğinden voltaj üretimi için önemi büyüktür.

MYH'nin elektrot, bakteri ve membranla etkileşimi ve kimyasal bileşimi nedeniyle, tampon; MYH performansını etkiler. Ayrıca, tampon; solüsyon pH'sında meydana gelen değişimleri azaltmaya yardım eder, ve buna bağlı olarak mikroorganizmaların büyümesi için pH'yı dengede tutar. İdeal bir tampon; solüsyon geçirgenliğini artıran ve yüksek güç yoğunluğu elde etmek için elektroda proton transferini kolaylaştıran mikrobiyal fizyolojiye ya da kimyasal reaksiyonlara müdahale etmeden pH'yı sabit tutabilmelidir (Qiang L ve ark., 2011). MYH' lerinde en yaygın kullanılan tamponlar; fosfat tamponlarıdır (Cheng S ve Logan BE, 2007). Belli oranlarda artan fosfat konsantrasyonuyla güç çıkışının da artacağı gösterilmiştir (Min B ve ark., 2008). Çalışmamız da MYH' de tampon olarak fosfat tamponu (pH: 7) kullanılmıştır. Fosfat tamponu ideal bir tampon olup bir çok uygulamada kullanılmaktadır. Ancak aktif bir bileşen olduğu için birçok biyolojik reaksiyonlarda inhibitör, metabolit, aktivatör olarak etki etmesi olumsuzluk yaratır. Çok değerlikli kationları bağlar veya çöktürür.

Bakterilerin istenen ölçülerde çoğalıp belli miktarda voltaj üretmeleri için besin kaynakları ve ortam pH'nın yanında ortam sıcaklığı da önemli bir dış etkidir. Değişik bakteriler değişik sıcaklıklarda çoğalma eğilimi gösterirler; buna bağlı olarak da ürettikleri voltaj da farklı olmaktadır. Bu nedenle *E. aerogenes* ve rekombinant suşlarının 30 °C, 37 °C ve 40 °C'de çoğalma karakteristiklerine bağlı olarak verdikleri voltaj değerleri çalışılmıştır. Besi ortamı olarak yine Melas kullanılmıştır.

Sonuçta tüm suşlarda en yüksek voltaj miktarını veren sıcaklık değerinin; 37 °C olduğu belirlenmiştir.

Sıcaklıktaki değişimler; sistem kinetiklerini, kütle transferini(aktivasyon enerjisi, kütle transfer faktörü ve solüsyonun iletkenliği), termodinamiği (serbest Gibbs enerjisi ve elektrot potansiyelleri) ve mikrobiyal topluluğun dağılımı ve doğasını (farklı türler farklı optimum sıcaklıklara sahip olacaktır) etkileyebildiği için mikrobiyal yakıt hücreleri sıcaklıktan önemli şekilde etkilenirler (Tang Y ve ark., 2012; Liu ZH ve ark., 2012). Bu alanda son yıllarda artan araştırmalara rağmen, mikrobiyal yakıt hücrelerinde sıcaklık etkisine ilişkin yeterli bilgi mevcut değildir. Herhangi bir sıcaklık etkisiyle COD (chemical oxygen demand) giderimi ve güç eldesinde bir artış meydana geldiğinden, hem COD giderimi ve elektrik üretimi için, hem de MYH performansı için sıcaklığın önemli bir faktör olduğu gözlemlenmiştir (Wang XL ve ark., 2011; Campo AG ve ark., 2012). Bir araştırmanın sonuçlarına göre sıcaklık artışıyla beraber güç yoğunluğunun artışı; mikrobiyal metabolizmanın artışı, membran geçirgenliği ve sıvı solüsyonun oldukça yüksek iletkenliği nedeniyle ohm direncinin azalması ile ilişkili olabilir (Guerrero AL ve ark., 2010).

Yüksek sıcaklıkların; MYH'nin hızlı bir sürede çalışmasına ve sonuç olarak da daha yüksek bir performansa neden olduğu gözlemlendiği çalışmayla (Michie IS ve ark., 2011; Cheng S ve ark., 2011) ilişkili başka bir araştırmada ise daha düşük ve daha yüksek sıcaklıkların ise; bakteriyel metabolik aktivitenin inaktivasyonuna yol açan daha düşük metabolik oranlara ve tek yönlü denatürasyon işlemlerine yol açması nedeniyle MYH performansında bir azalışa neden olduğu gösterilmiştir (Patil SA ve ark., 2010). Çalışmamızın sonuçlarında da literatürle uyumlu olarak optimum sınırların dışında MYH performansının azaldığı tespit edilmiştir.

Farklı elektrojenik bakterileri farklı uygun sıcaklık oranlarına özelleştikleri ve farklı sıcaklıklarda büyüdüklerinden dolayı, bakterilerin ilk büyüme fazı boyunca sıcaklık; mikrobiyal türlerin çokluğunu da belirler. (Liu L ve ark., 2012). Çalışmamızın sonuçlarına göre sıcaklığın bakterinin optimum üreme sıcaklığı ile paralel olduğu 37 °C de voltaj değerinin maksimum olması, bakterinin doğal üreme sıcaklığı ile uyumlu MYH sistemlerinin daha verimli olacağını düşündürmektedir. Yapılan başka çalışmalarda bakteri yaşamı ile uyumlu sınırlarda sıcaklık derecelerinde çalışan MYH sistemlerinde daha yüksek verim alındığı konusundaki tespitimizle paralel sonuçlar rapor edilmiştir (Wei L ve ark., 2013, Min ve ark., 2008, Zhan ve ark., 2008, Liu ve ark., 2005).

Bir elektrik devresinde iki nokta arasındaki iletken üzerinden geçen akım, potansiyel farkla (örn. voltaj veya gerilim düşümü) doğru; iki nokta arasındaki dirençle ters orantılıdır. Dirençler, üzerinden elektrik şarjının yavaşça aktığı iletkenlerdir. Sistemimizde voltu ölçen multimetreye bir direnç ölçer bağlanarak, Melas'ta çeşitli sıcaklık ve pH aralıklarında dirence karşı gösterilen gerilim kaydedilmiştir. Direnç artışına voltajın gösterdiği tepki araştırılmıştır. Elde edilen veriler grafiğe döküldüğünde dirençle voltaj arasında lineer bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızın son bölümünde 3 farklı sıcaklık ve 3 farklı pH derecesinde hazırlanan melas ortamında büyüyen bakterilerin inoküle edildiği MYH sistemlerinde gerçekleştirilen çalışmada; dirence karşı voltaj değerleri ölçülmüştür. Direnç uygulanarak, MYH'sinin buna ne tepki verdiği, voltajı ne derece sabit tutabildiği saptanmaya çalışılmıştır. *Ea* için yüksek voltaj değeri 37°C'de okunurken, *Ea* [pUC8] ve *Ea* [pUC8:15]'de en yüksek voltaj değeri ise 40°C'de okunmuştur. Tüm suşlarda 3 ayrı pH' da gerçekleştirilen deneyde; dirençle voltaj arasındaki doğrusal ilişki ile uyumlu değerler tespit edilmiş ve *Ea*, *Ea* [pUC8] ve *Ea* [pUC8:15] için dirence karşı en yüksek voltaj değerini veren pH'ın 7.0 olduğu bulunmuştur. Başka bir araştırmanın sonuçlarına göre çalışma pil voltajı sabitlendiğinde 0.453 V iken direnç uygulanan bir çalışmadır. Fakat 1000-10000 ohm arasında uygulanan dirençle MYH'de pil voltajının 0.453'den 0.0543 V'a kadar düştüğü gözlemlenmiştir. Yani MYH; uygulanan dış dirence voltajı düşürerek cevap vermiştir bu da MYH'sinin pil voltajını sabit tutmada yetersiz olduğunu göstermiştir bu alanda daha çok araştırılma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bir çalışmada MYH'lerine bir dış direnç uygulanmasıyla voltaj değerinin oldukça düştüğü kaydedilmiştir (Borole ve ark., 2010).

Tüm çalışmamız boyunca kullanmayı tercih ettiğimiz fakültatif anaerob *Enterobacter aerogenes*ler, zorunlu anaeroblara nazaran oksijensiz şartlar altında Fe-hidrojenaz aktivitesini yeniden kazanabilen ve hızlı şekilde oksijeni tüketebilen (Zhao ve ark., 2009) etkili hidrojen üreticileri olarak bilinirler (Jo JH ve ark., 2008). Ayrıca, *E. aerogenes* fermentasyonunda hidrojen oluşum oranının nispeten yüksek olması nedeniyle bu organizma büyük ölçekli hidrojen üretimi için yüksek bir potansiyel gösterir buna bağlı olarak da elektrik üretim etkinliği fazladır (Zhao ve ark., 2009). Araştırmamızda bu bakteriyi kullanarak elde ettiğimiz pil voltajı maksimum 0.5 V olmuştur. *Enterobacter aerogenes* kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise maksimum voltaj değeri 800 mV olarak ölçülmüştür (Li Zhuang ve

ark., 2011). Bu durum; MYH sistemimizin oldukça verimli olduğunu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, *Enterobacter aerogenes* ve *vgb⁻* ve *vgb⁺* rekombinant suşlarının MYH sisteminde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için gerekli fiziksel koşullar tam olarak belirlenmiştir. Bakteri suşlarının benzer ortam koşulları istemleri belirlenmiş fakat MYH sisteminde daha bireysel istemler dikkat çekmiştir. Yani aynı bakteri türünün farklı suşlarında bile tamamen aynı MYH sistemi uygulamasının verimli olamayacağı, her suş için ayrı ayrı değerlendirme yapmanın gerekli olduğu anlaşılmıştır. İçinde bulunduğumuz yüzyılın acil çağrılı çalışma başlıklarından biri alternatif enerjidir. Hızlı büyüme ve çoğalma karakteristikleri ile bakterilerin bu konuda sağlayabileceği avantajlar açıktır. MYH sistemine uygun rekombinant organizmaların geliştirilmesi mutlak gerekliliktir. Bu çerçevede *Enterobacter aerogenes* yüksek voltaj aktivitesi ile bu konuda çalışılabilecek en avantajlı türlerden biridir. *vgb* ise entegre olduğu sistemlere önemli avantajlar sağlayan bir genidir. Sistemimizde bu genin etkinliğinin hücre başına aktivite göz önüne alındığında görülebilmiş olması bundan sonraki çalışmalarımız için umut verici olmuştur. Sonuçlar bize, optimizasyon çalışmalarını MYH sistemi içine yoğunlaştırdığımızda yani elektrot, membran, tampon ve farklı MYH modellemeleri yapıldığında özellikle de sisteme eklenen kültür hacminin artırılması durumunda çok daha verimli bir voltaj aktivitesi gözlenebileceğini düşündürmüştür. Ayrıca kullanılan atıkların çeşitlendirilmesi, elementel analizinin yapılması ve *vgb* sisteminin katabolik represyonunu sağlayan faktörlerin minimize edilmeside *vgb* sisteminin etkinliğini mutlaka arttıracaktır. Sonraki çalışmalarımızda $NAD^+/NADH$ ve ATP oranlarında voltaj ölçümleriyle paralel yürütülmesi ile bakteri metabolizması ve voltaj arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi ümit edilmektedir. MYH sistemine bakteri entegrasyonu konusunda kat edilecek çok yol olmasına karşın bakterilerin yaşamsal uyum ve yüksek performanslarının sisteme sağlayacağı katkılarda açıktır.

6. KAYNAKLAR

- Aldrovandi Aba, Marsili Enrico, Stante Loredana, Paganin Patrizia, Tabacchioni Silvia, Giordano Andrea. Sustainable power production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell. *Bioresource Technology* **100** (2009) 3252–3260.
- Andújar J.M., Segura F. Fuel cells: History and updating. A walk along two centuries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **Volume 13**, Issue 9, December 2009, Pages 2309–2322.
- Anonymous. (2013). <http://www.fuelcells.org/basics/how.html> (on-line access on 20 May, 2013).
- Anonymous. (2013). <http://www.lowcarbonturkey.com/?p=440> (on-line access on 20 May, 2013).
- Anonymous. (2013). <http://www.muendisforum.net/index.php?topic=703.0> (on-line access on 20 May, 2013).
- Ateş Seçer Açelya. *Eppg ve nano-metal yüklü eppg elektrotların mikrobiyal elektrolizdeki etkinliklerinin araştırılması*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- Balat M. Microbial Fuel Cells as an Alternative Energy Option. *Energy Sources, Part A*, **32**:26–35, 2010.
- Barbir Frano. Chapter Five – Fuel Cell Operating Conditions. *PEM Fuel Cells (Second Edition)*. 2013, **Pages 119–157**.
- Basura, V.I., Beattie, P.D., Holdcroft, S. Solid-state electrochemical oxygen reduction at Pt/Nafion^R 117 and Pt/ BAM3GTM 407 interfaces. *J. Electroanal. Chem.* **458** (1998) 1–5.
- Behera M., Ghangrekar M.M. Performance of microbial fuel cell in response to change in sludge loading rate at different anodic feed pH. *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 5114–5121.
- Bergel A, D Feron, et al. (2005) Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications* **7(9)**:900-904.
- Berk, R.S., Canfield, J.H. Bioelectrochemical energy conversion. *Appl. Microbiol.* **12** (1964) 10-12.
- Bıyıkoğlu, A., "Yakıt Hücrelerin Tarihsel Gelişimi, Çalışma Prensipleri ve Bugünkü Durumu", *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, **16(3)**:523-512, 2003.
- Biffinger JC, Pietron J, Ray R, Little B, Ringeisen BR. *Biosen Bioelectron* 2007;**22**:1672.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295** (5554), 483-485.
- Borole, A., Aaron, D., Hamilton, C.Y., Tsouris, C., 2010. Understanding long-term changes in microbial fuel cell performance using electrochemical impedance spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2740–2745.
- Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B., Walsh, F.C., 2006. Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* **21** (11), 2015-2045.

- Cai Jing, Zheng Ping , Zhang Jiqiang, Xie Zuofu, Li Wei, Sun Peide. Simultaneous anaerobic sulfide and nitrate removal coupled with electricity generation in Microbial Fuel Cell. *Bioresource Technology* **129** (2013) 224–228.
- Call, D., Logan, B.E., 2008. Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ. Sci. Technol.* **42** (9), 3401-3406.
- Campo A.G., Lobato J., P. Cañizares, Rodrigo M.A., Morales F.J.F., *Short-term effects of temperature and COD in a microbial fuel cell*, Appl. Energy (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.02.064>.
- Cao, Y., Hu, Y., Sun, J., Hou, B., 2010. Explore various co-substrates for simultaneous electricity generation and Congo red degradation in air-cathode single-chamber microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry* **79**, 71–76.
- Cavdar Pelin, Tugtas Adile Evren, Calli Baris. Continuous flow membrane-less air cathode microbial fuel cell with spunbonded olefin diffusion layer. *Bioresource Technology*. **Volume 102**, Issue 22, November 2011, Pages 10425–10430.
- Cheng S., Logan B.E., Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells, *Electrochem. Commun.* **9** (2007) 492–496.
- Cheng S., Xing D., Logan B.E. Electricity generation of single-chamber microbial fuel cells at low temperatures, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2011) 1913–1917.
- Cheng, S., Logan, B.E., 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (47), 18871-18873.
- Cohen, B., 1931. The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol.* **21** (1) 18-19.
- Converti, A., Perego, P., 2002. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 303–309.
- Converti, A., Perego, P., Del Borghi, M., 2003. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 370–377.
- Daim Tugrul U., Li Xin, Kim Jisun, Simms Scott. Evaluation of energy storage technologies for integration with renewable electricity: Quantifying expert opinions. *Environmental Innovation and Societal Transitions*. **Volume 3**, June 2012, Pages 29–49.
- Daniel David K., Mankidy Bijith Das, Ambarish K., Manogari R.. Construction and operation of a microbial fuel cell for electricity generation from wastewater. *Int J Hydrogen Energy* **34** (2009) 7555 – 7560.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales- Colunga, L.M., de Leon-Rodriguez, A. and Flores, E.R. 2009. Continuous Biohydrogen Production Using Cheese Whey: Improving the Hydrogen Production Rate. *International Journal of Hydrogen Energy* (34), 4296-4304.
- Debabov V. G.. Electricity from Microorganisms. *Microbiology*, 2007, **Vol. 77**, No. 2, pp. 123–131.
- Delaney, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L., Thurston, C.F., 2008. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. Performance of fuel-cells containing selected microorganism–mediator–substrate combinations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **34**, 13–27.

- Dikshit K.L., Spaulding D., Braun A. and Webster D.A. Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*. *J.Gen.Microbiol.*, **135**:(1989) 2601-2610.
- Du, Z., Li, H. and Gu, T. 2007. A state of art review on microbial fuel cells: A promisig technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. **(25)** 464-482.
- Elsharnouby Omneya, Hafez Hisham, Nakhla George, Naggar M. Hesham El. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal Of Hydrogen Energy* **XXX**(2013) 1-22.
- Erenler Özalp Şebnem. *Bakteri Hemoglobin Geninin Enterobacter aerogenes'in Fizyolojik Ve Metabolik Aktiviteleri Üzerine Etkileri*. İnönü Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 2001.
- Erenler Özalp Şebnem. *L- Asparaginaz Geninin (ANSb) Farklı Gram-Negatif Bakterilere Klonlanması, İzolasyonu Ve Ekspresyonu*. İnönü Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2007.
- Fabiano, B., Perego, P., 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy* **27**, 149–156.
- Farres J. and Kallio P.T. Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla hemoglobindagger*. *Biotechnol. Prog.*, **2** (2002) 229-233.
- Fıçıcılar Berker. *Yakıt pilleri*. Yakıt Pili Araştırma Merkezi ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü 12 Mayıs 2008.
- Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., Nealon, K. H., Osterman, A. L., Pinchuk, G., Reed, J. L., Rodionov, D. A., Rodrigues, J. L. M., Saffarini, D. A., Serres, M. H., Spormann, A. M., Zhulin, I. B. And Tiedje, J. M. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Micro*, **6**, 592-603.
- Gandía Luis M., Arzamendi Gurutze, Diéguez Pedro M. Chapter 1 – Renewable Hydrogen Energy: An Overview. *Renewable Hydrogen Technologies*. 2013, **Pages 1–17**.
- Geckil H, “ *Effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and butanediol production by Enterobacter aerogenes*” PhD Thesis, Illinois Institute of Technology USA, May 1995.
- Gezginci Mehmet, Uysal Yağmur, Kılıç Arzu, Çınar Özer. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Ekstraselüler Elektron Transferleri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* **4 (2)**: 81-85, 2011.
- Gould J.L. *Olağandışı yaşamlar*, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara (1999)61-74.
- Grove, W.R., 1839. *Philos. Magaz. Ser.* **3 (14)**, 127.
- Grzebyk Michał, Poźniak Gryzelda. Microbial fuel cells (MFCs) with interpolymer cation exchange membranes. *Separation and Purification Technology*. **Volume 41**, Issue 3, 15 February 2005, Pages 321–328.
- Guerrero A. Larrosa, Scott K., Head I.M., Mateo F., Ginesta A., Godinez C.. Effect of temperature on the performance of microbial fuel cells. *Fuel* **89** (2010) 3985–3994.

- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H. and Steyer, J.P. 2010. Hydrogen Production from Agricultural Waste by Dark Fermentation: A Review, *International Journal of Hydrogen Energy*. **(35)**, 10660-10673.
- He Z., Huang Y., Manohar A.K., Mansfeld F. Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry* **74** (2008) 78–82.
- He, Z., Angenent, L.T., 2006. Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis* **18** (19-20), 2009-2015.
- Helton Jose' Alves, Cícero Bley Junior, Rafael Rick Niklevicz, Elisandro Pires Frigo Michelle Sato Frigo, Carlos Henrique Coimbra-Arau' jo. Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. *International journal of hydrogen energy* **38** (2013) 5215-5225.
- Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E. and Bulow L., Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production, *Nat. Biotechnol.*, **3**(1997) 244-247.
- Hu, Liu, H., H., Fan, Y., 2008. Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Water Res.* **42 (15)**, 4172-4178.
- Ieropoulos, I. A., Greenman, J., Melhuish, C. and Hart, J. 2005. Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 238-245.
- Jayasinghearachchi, H.S., Sarma, P.M., Singh, S., Aginihotri, A., Mandal, A.K., Lal, B., 2009. Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. *International Journal of Hydrogen Energy* **34**, 7197–7207.
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Choe, W.S., Park, J.M., 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology* **99**, 2061–2066.
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Choe, W.S., Park, J.M., 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology* **99**, 2061–2066.
- Jung S., Mench M.M., Regan J.M. Impedance characteristics and polarization behavior of a microbial fuel cell in response to short-term changes in medium pH, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 9069–9074.
- K. P. Nevin, Lovley D. R., 2002. Mechanisms for Accessing Insoluble Fe(III) Oxide during Dissimilatory Fe(III) Reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68(5)**, 2294-2299.
- Khosla C. and Bailey J.E., Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*, *Nature* **331**(1988) 633-635.
- Kılıç Arzu, Uysal Yağmur, Çınar Özer. Electricity Generation From Synthetic Wastewater in a Laboratory Scale Microbial Fuel Cell. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi Cilt 17*, Sayı 1, 2011, Sayfa 43-49.
- Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2010. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 371–380.
- Kipnis, N., 1987. Luigi Galvani and the debate on animal electricity, 1971-1800. *Ann. Sci.* **44**, 107-142.
- Kurokawa, T., Tanisho, S., 2005. Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Marine Biotechnology* **7**, 112–118.

- Lanthier, M., Gregory, K.B., Lovley, D.R., 2008. Growth with high planktonic biomass in *Shewanella onseidenis* fuel cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 29–35.
- Lay, C.H., Wu, J.H., Hsiao, C.L., Chang, J.J., Chen, C.C. and Lin, C.Y. 2010. Biohydrogen Production from Soluble Condensed Molasses Fermentation Using Anaerobic Fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy.* **35** (24), 13445-13451.
- Lengeler, J.W., et al., Eds., Stuttgart: Georg Thieme, Biology of the Prokaryotes, 1999 [Russ. Transl. *Sovremennaya mikrobiologiya, Moscow: Mir, 2005, vol. 1*].
- Lewis, K., 1966. Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms. IV. Biochemical fuel cells. *Bacteriol Rev.* **30** (1), 101-113.
- Li Wei, Cai Jing, Zheng Ping, Zhang Jiqiang, Xie Zuofu, Sun Peide. Simultaneous anaerobic sulfide and nitrate removal coupled with electricity generation in Microbial Fuel Cell. *Bioresour. Technol.* **129** (2013) 224–228.
- Li Y., Zhuang L., Zhou S., Yuan Y. Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 3514–3519.
- Li Zhuang, Shungui Zhou, Yong Yuan, Tinglin Liu, Zhifeng Wu, Jiong Cheng. Development of *Enterobacter aerogenes* fuel cells: From in situ biohydrogen oxidization to direct electroactive biofilm. *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 284–289.
- Li, C. and Fang, H.H.P. 2007. Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures, Critical Reviews in *Environmental Science and Technology.* (37), 1-39.
- Li, Z., Zhang, X., Lin, J., Han, S., Lei, L., 2010. Azo dye treatment with simultaneous electricity production in an anaerobic–aerobic sequential reactor and microbial fuel cell coupled system. *Bioresour. Technol.* **101**, 4440–4445.
- Liang S., Thomas C. S., John M. Z., James K. F., 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. *Molecular Microbiology*, **65**(1), 12-20.
- Liling Wei, Hongliang Han, Jianquan Shen. Effects of temperature and ferrous sulfate concentrations on the performance of microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy* **XXX** (2013) 1-7.
- Liu H, Logan BE. Power generation in Fed Batch MFC as a function of ionic strength and reactor configuration. *Environ Sci Technol* 2005;**39**:5488–93.
- Liu L., Tsyganova O., Lee D.J., Suc A., Chang J.S., Wang A., Ren N. *Anodic biofilm in single-chamber microbial fuel cells cultivated under different temperatures*, *Int J Hydrogen* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.084>.
- Liu Z.H., Li X.M., Zheng F.L., Yang Q. Operating characteristics of microbial fuel cell using sludge, *China Environ. Sci.* **32** (2012) 268–273.
- Liu, H., Grot, S., S.A., Logan, B.E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science & Technology.*
- Liu, H.; Logan, B. E. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol.* 2004, **38**, 4040-4046.
- Liu, L., Li, F.B., Feng, C.H., Li, X.Z., 2009. Microbial fuel cell with an azo-dye-feeding cathode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 175–183.
- Logan Bruce E . et al. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. **VOL. 40**, NO. 17, 2006 / *Environmental Science & Technology.*

- Logan, B. E.; Murano, C.; Scott, K.; Gray, N. D.; Head, I. M. Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Res.* 2005, **39**, 942-952.
- Logan, B.E., 2008. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Lovley Derek R. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*. **Volume 19**, Issue 6, December 2008, Pages 564–571.
- Lovley, D.R., , K.P. Nevin, 2008. *Electricity production with electricigens*. In: Wall, J.D., Harwood, C.S., Demain, A. (Eds.), *Bioenergy*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 295-306.
- Lu L, Ren NQ, Xing DF, Logan BE: Hydrogen production with effluent from an ethanol-H₂ coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. *Biosensors Bioelectron* 2009, **24**:3055-3060.
- Magnolo S.K., Leenutaphong D.L., Modena J.A. De, Curtis J.E., Bailey J.E., Galazzo J.L. and Hughes D.E., Actinohordin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin, *Biotechnology (NY)*, **5**(1991) 473-476.
- Mathe Mkhulu K, Mkwizu Tumaini, Modibedi Mmalewane. Electrocatalysis Research for Fuel Cells and Hydrogen Production. *Energy Procedia*. **Volume 29**, 2012, Pages 401–408.
- Mekhilef S., Saidur R., Safari A. Comparative study of different fuel cell Technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **Volume 16**, Issue 1, January 2012, Pages 981–989.
- Michie I.S., Kim J.R., Dinsdale R.M., Guwy A.J., Premier G.C. The influence of psychrophilic and mesophilic start-up temperature on microbial fuel cell system performance, *Environ. Sci. Technol.* **4** (2011) 1011–1019.
- Min B., Román O.B., Angelidaki I. Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance, *Biotechnol. Lett.* **30** (2008) 1213–1218.
- Min, B.; Cheng, S.; Logan, B. E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res.* 2005, **39**, 1675-1686.
- Mohan Y., Kumar S. Manoj Muthu, Das D. Electricity generation using microbial fuel cells. *Int J Hydrogen Energy* **33** (2008) 423 – 426.
- Narbel Patrick A. What is really behind the adoption of new renewable electricity generating technologies? *Energy for Sustainable Development*. **Volume 17**, Issue 4, August 2013, Pages 386–390.
- Nathan Wrana, Richard Sparling, Nazim Cicek, David B. Levin. Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrohydrogenesis. *Journal of Cleaner Production* **18** (2010) S105-S111.
- Newman D. K., Kolter R., 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, **405(6782)**, 94-97.
- Nielsen Jens R. Rostrup-and Thomas Rostrup-Nielsen, "Large Scale Hydrogen Production" , *CATTECH*, **Volume 6**, No.4, 2002.
- Niessen, J., Schroder, U., Scholz, F., 2004. Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation – a bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochem. Commun.* **6**, 955–958.

- Nimje V.R., Chen C.Y., Chen C.C., Tsai J.Y., Chen H.R., Huang Y.M., Jean J.S., Chang Y.F., Shih R.C. Microbial fuel cell of *Enterobacter cloacae*: effect of anodic pH microenvironment on current, power density, internal resistance and electrochemical losses, *Int. J. Hydrogen Energy* **36** (2011) 11093–11101.
- Nimje, V.R., Chen, C.Y., Chen, C.C., Jean, J.S., Reddy, A.S., Fan, C.W., Pan, K.Y., Liu, H.T., Chen, J.L., 2009. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *J. Power Sources* **190**, 258–263.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G. and Lyberatos, G. 2010. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review, *Waste Biomass Valor.* **(1)**, 21–39.
- Oh S, Min B, Logan BE. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* 2004;**38**:4900–4.
- Ossieur W.; Rabaey, K.; Verhaege, M.; Verstraete, W. Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity. *Water Sci. Technol.* 2005, **52**, 515–523.
- Palazzi, E., Fabiano, B., Perego, P., 2000. Process development of continuous hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* in a packed column reactor. *Bioprocess Engineering* **22**, 205–213.
- Palazzi, E., Perego, P., Fabiano, B., 2002. Mathematical modelling and optimization of hydrogen continuous production in a fixed bed bioreactor. *Chemical*.
- Park, D.H., Laivenieks, M., Guettler, M.V., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1999. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2912–2917.
- Patil S.A., Harnisch F., Kapadnis B., Schröder U. Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of temperature for biofilm formation and performance, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2011) 803–808.
- Patil S.A., Harnisch F., Kapadnis B., Schröder U. Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of temperature for biofilm formation and performance, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2010) 803–808.
- Pham, C.A., Jung, S.J., Phung, N.T., Lee, J., Chang, I.S., Kim, B.H., 2003. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 129–134.
- Potter, M.C., 1911. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **84 (571)**, 260–276.
- Prasad D, T K Sivaram, et al. (2006) Microbial fuel cell constructed with a micro-organism isolated from sugar industry effluent. *Journal of Power Sources* **160(2)**:991-996.
- Puig S., Serra M., Coma M., Cabré M., Balaguer M.D., Colprim J. Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 9594–9599.
- Qiang L., Yuan L.J., Ding Q. Influence of buffer solutions on the performance of microbial fuel cell electricity generation, *Huanjing Kexue/Environ. Sci.* **32** (2011) 1524–1528.
- Rabaey K., Boon N., Hfte M., Verstraete W., 2005. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology*, **39(9)**, 3401–3408.
- Rabaey Korneel and Verstraete Willy. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology* **Vol.23** No.6 June 2005.

- Rabaey Korneel, Freguia Stefano, Yuan Zhiguo, Keller Jürg. Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*. **Volume 53**, Issue 2, 1 December 2007, Pages 598–603.
- Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W., 2003. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1531–1535.
- Rachman, M.A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**, 358–363.
- Rachman, M.A., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., 1998. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 450–454.
- Raghavulu S.V., Mohan S.V., Goud R.K., Sarma P.N. Effect of anodic pH microenvironment on microbial fuel cell (MFC) performance in concurrence with aerated and ferricyanide catholytes, *Electrochem. Commun.* **11** (2009) 371–375.
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Ferig, S., Wang, W., 2001. Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 192–195.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y. and Liu, S. 2006. Biohydrogen Production from Molasses by Anaerobic Fermentation with a Pilot-Scale Bioreactor System, *International Journal of Hydrogen Energy*. **(31)**, 2147-2157.
- Rezaei, F., Xing, D., Wagner, R., Regan, J.M., Richard, T.L., Logan, B.E., 2009. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3673–3678.
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R., 2008. Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir* **24**, 4376–4379.
- Roos V, Andersson CI, Bülow L. Gene expression profiling of *Escherichia coli* expressing double *Vitreoscilla haemoglobin*. *J Biotechnol.* 2004 Oct **19**;114(1-2):107-20.
- Rosenbaum, M.; Schroder, U.; Scholz, F. In situ electrooxidation of photobiological hydrogen in a photobioelectrochemical fuel cell based on *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ. Sci. Technol.* 2005, **39**, 6328-6333.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V., Molenkamp, R.J., Buisman, C.J., 2007. Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion Exchange membranes. *Water Res.* **41 (9)**, 1984-1994.
- Sakdaronnarong Chularat Krongtaew, Thanosawan Sirinna, Chaithong Suthinee, Sinbuathong Nusara, Jeraputra Chuttchaval. Electricity production from ethanol stillage in two-compartment MFC. *Fuel* **107** (2013) 382–386.
- Samrot Antony V., Senthilkumar P., Pavankumar K., Akilandeswari G.C., Rajalakshmi N., Dhathathreyan K.S.. Electricity generation by *Enterobacter cloacae* SU-1 in mediator less microbial fuel cell. *Int J Hydrogen Energy* **35** (2010) 7723 – 7729.
- Sharma Vinay, Kundu P.P. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology* **47** (2010) 179–188.

- Shukla, A.K., Suresh, P., Berchmans, S., Rajendran, A., 2004. Biological fuel cells and their applications. *Curr. Sci.* **87** (4), 455-468.
- Sieniutycz Stanisław, Jeżowski Jacek. 10 – Fuel cells and limiting performance of electrochemobiological systems. *Energy Optimization in Process Systems and Fuel Cells (Second Edition)* 2013, **Pages 373–428**.
- Solanki Komal, Subramanian Sindhu, Basu Suddhasatwa. Microbial fuel cells for azo dye treatment with electricity generation: A review. *Bioresource Technology* **131** (2013) 564–571.
- Sun, J., Bi, Z., Hou, B., Cao, Y., Hu, Y., 2011. Further treatment of decolorization liquid of azo dye coupled with increased power production using microbial fuel cell equipped with an aerobic biocathode. *Water Res.* **45**, 283–291.
- Sun, J., Hu, Y., Bi, Z., Cao, Y., 2009. Simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation using a microfiltration membrane air-cathode single chamber microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* **100**, 3185–3192.
- Sung Taek Oh. *Trends in Microbial Fuel Cells for the Environmental Energy Refinery from Waste/Water*. Department of Civil Engineering, University of Glasgow, UK (2009).
- Tang Y., He Y., Yu P., Sun H., Fu J. Effect of temperature on electricity generation of single-chamber microbial fuel cells with proton exchange membrane. *Adv. Mater. Res.* **393–395** (2012) 1169–1172.
- Tanisho, S., 2000. A strategy for improving the yield of hydrogen by fermentation. Hydrogen Energy Progress Xiii, **Vols. 1 and 2**, *Proceedings*, pp. 370–375.
- Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N., 1998. Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* **23**, 559–563.
- Tanisho, S., Suzuki, Y., Wakao, N., 1987. Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E-82005. *International Journal of Hydrogen Energy* **12**, 623–627.
- Tanisho, S., Wakao, N., Kosako, Y., 1983. Biological hydrogen-production by *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **16**, 529–530.
- Tsai P.S., Nageli M. and Bailey J.E., Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome o. *Biotechnol. Bioeng.* **49** (1996) 151-160.
- Turick C. E., Tisa L. S., Caccavo F., Jr., 2002. Melanin Production and Use as a Soluble Electron Shuttle for Fe(III) Oxide Reduction and as a Terminal Electron Acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68(5)**, 2436-2444.
- Velasquez-Orta S., Head I., Curtis T., Scott K., Lloyd J., von Canstein H., 2009. The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85(5)**, 1373-1381.
- Von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J. R., 2008. Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74(3)**, 615-623.
- Wang X.L., Wu C., Zhang J.Q., Chi Q.L., Tian S.S. Acclimation stage on the performance of microbial fuel cells subjected to variation in COD, temperature, and electron acceptor. *Adv. Mater. Res.* **183–185** (2011) 2346–2350.
- Wang Yun, Chen Ken S., Mishler Jeffrey, Cho Sung Chan, Adroher Xavier Cordobes. A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology,

- applications, and needs on fundamental research. *Applied Energy* **88** (2011) 981–1007.
- Watson, V.J., Logan, B.E., 2010. Power production in mfc's inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 489–498.
- Wei Liling, Han Hongliang, Shen Jianquan. Effects of cathodic electron acceptors and potassium ferricyanide concentrations on the performance of microbial fuel cell. *Int J Hydrogen Energy* **37** (2012) 12980 – 12986.
- Xia Xue, Cao Xiao-xin, Liang Peng, Huang Xia, Yang Su-ping, Zhao Gen-gui. Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells. *Bioenergy and Biofuels. Appl Microbiol Biotechnol* (2010) **87**:383–390.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takahashi, Y., 1995. Hydrogen production by immobilized cells of aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**, 481–484.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y., 1997. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters* **20**, 143–147.
- Yuan Y., Zhao B., Zhou S., Zhong S., Zhuang L. Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 6887–6891.
- Zhan YL, Wang Q, Zhang PP, Yan GX, Guo SH. Investigation on influence factors and mechanism of microbial fuel cell. *Chem J Chin U* 2008;**29**:144-8 [in Chinese].
- Zhang Chong, Lv Feng-Xiang, Xing Xin-Hui. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology* **102** (2011) 8344–8349.
- Zhang Y., Yu H., Shi Y., Yang S. and Shen Z. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Escherichia coli* on production of poly(β -hydroxybutyrate) and fermentative parameters, *FEMS Microbiology Letters* **214** (2002) 223-227.
- Zhao, H., Ma, K., Lu, Y., Zhang, C., Wang, L., Xing, X.H., 2009. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H₂-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 186–194.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ESRA NEZAFED GÜÇLÜ

Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya - 07.05.1989

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : Özel İdare İlköğretim Okulu (SİVAS, 1994–1999)

Ortaokul : Özel İdare İlköğretim Okulu (SİVAS, 1999–2001)

Lise : Atatürk Kız Lisesi (MALATYA, 2001–2004)

Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, (MALATYA, 2004–2008)

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya, 2010–2013)

BİLİMSEL FAALİYETLER

- Mutant G Protein Eşlikli Reseptörler ve Neden Oldukları Hastalıklar (Seminer, 2011)
- Mikrobiyal Hidrojen Enerjisi Ve Yakıt Pili Teknolojisi (Seminer, 2012)
- ICOEST Kapadokya Enerji Kongresi, Poster Sunumu (2013)