

## **BIOHYDROGEN PRODUCTION AND WASTEWATER TREATMENT VIA PURPLE NON-SULFUR BACTERIA IN A MULTI-STAGE PHOTOFERMENTATION SYSTEM**

Decrease in crude oil production leads to the need for alternative sources of energy and petroleum by-products. Photofermentation stands out as a viable option in both aspects, where hydrogen (H<sub>2</sub>) and poly-hydroxyalkanoates (PHA) can be produced sustainably, with the former being an environmentally benign energy carrier and the latter a substitute for petroleum-based plastics, serving as microbial energy storage material. Versatility and the ability to shift the metabolic pathways of the photofermentative processes allow for media with high nitrogen content to be utilized in a high biomass production phase, while high carbon application leads to production of H<sub>2</sub> and biomaterials. In this context, photofermentation is a strong candidate and an innovative approach for application in treatment of challenging wastewater types, such as high carbon or high nitrogen content.

The aim of this thesis study is to design a multi-stage fermentation system that optimizes both energy generation and pollutant degradation, paving the way for scalable and sustainable applications. Within the scope of the study, *Rhodobacter capsulatus* is to be utilized under various environmental conditions for the dual benefit of biohydrogen production and wastewater treatment.

The first aspect of the study compares two different scenarios, with the first scenario utilizing the wild-type (WT) strain of *R. capsulatus*, while the second scenario focuses on an uptake hydrogenase-deficient (hup-) mutant strain. It has been observed that the WT strain demonstrates robust H<sub>2</sub> production under nitrogen-limited conditions but exhibits competition between H<sub>2</sub> evolution and carbon storage (PHA production) pathways. In contrast, the hup- strain, lacking uptake hydrogenase activity, shows enhanced hydrogen yields by redirecting reducing equivalents from competitive pathways, highlighting its potential for biohydrogen production. In order to better understand the metabolic pathways and end-product distributions under these two scenarios, metabolic flux analysis (MFA) will be carried out. It is expected that the MFA will help reveal the differences in flux distributions and H<sub>2</sub> production efficiencies between the strains.

The second aspect of this study explores a multi-stage photofermentation system for the simultaneous removal of nitrogen and organic carbon from wastewater. Based on the results of MFA, nutrient loading, C/N ratio and environmental conditions (pH, salinity, temperature, light intensity, etc.) applied to the system are to be determined and system will be set-up in a way that maximizes H<sub>2</sub> and biomaterials production while degrading nitrogen and organic carbon. This integrated approach would address environmental concerns related to wastewater management, such as the energy spent for aeration and mixing of the bioreactors, as well as provide a renewable energy output, aligning with circular economy principles.

**By: Ertan Hoşafcı**

**Supervisor: Prof. Dr. Tuba Hande Ergüder Bayramoğlu**

**Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun Koku**

## **ÇOK AŞAMALI FOTOFERMANTASYON SİSTEMİ KULLANILARAK MOR KÜKÜRTSÜZ BAKTERİLER İLE BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ VE ATIKSU ARITIMI**

Ham petrol üretimindeki azalma, enerji ve petrol türevleri için alternatif kaynaklara olan ihtiyacı artırmaktadır. Fotofermantasyon, her iki açıdan da sürdürülebilir bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Fotofermantasyon ile çevre dostu bir enerji taşıyıcısı olan hidrojen (H<sub>2</sub>) ve petrol bazlı plastiklere alternatif olarak mikrobiyal enerji depolama materyali işlevi gören poli-hidroksialkanoatlar (PHA) üretilmektedir. Fotofermantasyon proseslerinin metabolik yollarının değiştirilebilirlik esnekliği yüksek azot içeriğine sahip ortamların biyokütle üretimi aşamasında kullanılmasına olanak sağlarken yüksek karbon içeriğine sahip ortamların uygulanması ise H<sub>2</sub> ve biyomalzeme üretimini sağlamaktadır. Bu bağlamda, fotofermantasyon, yüksek karbon veya yüksek azot içeriğine sahip zorlu atıksu türlerinin arıtımı için güçlü bir aday ve yenilikçi bir yaklaşımdır.

Bu tez çalışmasının amacı hem enerji üretimini hem de kirletici giderimini optimize eden çok aşamalı bir fermantasyon sistemi tasarlayarak ölçeklenebilir ve sürdürülebilir uygulamaların önünü açmaktır. Çalışma kapsamında, *Rhodobacter capsulatus* türü çeşitli çevresel koşullar altında hem biyohidrojen üretimi hem de atıksu arıtımı için kullanılacaktır.

Çalışmanın ilk aşaması, iki farklı senaryonun karşılaştırılmasını içermektedir. İlk senaryoda *R. capsulatus*'un yabancıl tipi (WT) suşu kullanılırken, ikinci senaryo, uptake-hydrogenase aktivitesinden yoksun bir mutant suş olan (hup-) suşuna odaklanmaktadır. WT suşunun, azot sınırlı koşullarda güçlü H<sub>2</sub> üretimi gösterdiği, ancak H<sub>2</sub> üretimi ile karbon depolama (PHA üretimi) yolları arasında rekabet yaşandığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık, uptake-hydrogenase aktivitesine sahip olmayan hup- suşunun, rekabetçi yolları devre dışı bırakarak daha yüksek hidrojen üretim verimleri sağladığı ve biyohidrojen üretimi için potansiyelini ortaya koyduğu görülmüştür. Bu iki senaryo altındaki metabolik yolları ve son ürün dağılımlarını daha iyi anlamak için metabolik akı analizi (MFA) yapılacaktır. MFA'nın, suşlar arasındaki akı dağılımı ve H<sub>2</sub> üretim verimliliklerindeki farkları ortaya koyması beklenmektedir.

Çalışmanın ikinci aşaması, atıksudan azot ve organik karbonun eş zamanlı olarak uzaklaştırılması için çok aşamalı bir fotofermantasyon sistemini incelemektedir. MFA sonuçlarına dayanarak sisteme uygulanacak besin yükü, C/N oranı ve çevresel koşullar (pH, tuzluluk, sıcaklık, ışık yoğunluğu vb.) belirlenecek ve sistem, azot ve organik karbon giderimi sırasında maksimum H<sub>2</sub> ve biyomalzeme üretimini sağlayacak şekilde kurulacaktır. Bu entegre yaklaşım, atıksu yönetimiyle ilgili çevresel kaygıları ele alarak biyoreaktörlerin havalandırılması ve karıştırılması için harcanan enerjiye çözüm sunacak ve yenilenebilir enerji üretimi sağlayarak döngüsel ekonomi ilkeleriyle uyumlu hale gelecektir.

**Sunucu: Ertan Hoşafçı**

**Tez danışmanı: Prof. Dr. Tuba Hande Ergüder Bayramoğlu**

**Tez eş danışmanı: Doç. Dr. Harun Koku**