

Havasız biyoreaktörlerde sintrofik bütiratı ayrıştıran topluluğun stabil izotop işaretlemesi ile tanımlanması

Mahmut ALTINBAŞ*, İzzet ÖZTÜRK, Alfons J.M. STAMS

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Bütirat, metanojenik şartlar altında organik madde dönüşümünde önemli bir ara ürün olup havasız biyoreaktörlerde metanojenenezin %60'ını kapsayabilen bir maddedir. Organik maddenin ayrışması sırasında oluşan hidrojen ve/veya format, ortamdaki uzaklaştırılmadığı sürece bütiratın ayrışması termodinamik açıdan mümkün değildir. Bütiratın ayrışması hidrojen tüketen organizmalarla yapılan sintrofik etkileşimlere dayalı olup ayrışma mekanizması ile ilgili bilgiler saf kültür çalışmalarıyla sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında, bütirat ayrışmasını yapan sintrofik bakterilerin çeşitliliği ve ekolojisi birçok bilinmeyen özelliği içermektedir. Bu kapsamda yeni bir teknik olan stabil izotop işaretlemesi kullanılarak havasız ortamlardaki bütiratı ayrıştıran aktif mikroorganizmaların kimliği tespit edilmiştir. Sintrofik bütirat ayrıştıran bu aktif türlerin, filogenetik olarak bir gruba ait olmadığı ve 9 farklı filum içerisinde yer aldığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada saf kültür tanımlaması yapılmamış türlerin varlığına rastlanmıştır. 16S ribozomal ribo nükleik asit sekans analizleri belirlenen klonların, veri bankalarında yapılan karşılaştırmalı analizinde bakteriyel türlerin çok çeşitli metabolik aktivitelere sahip olabileceklerini ve büyük bir kısmının havasız ortamlardan izole edilmiş klonlara benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Özellikle, Proteobacteria filumunda yer alan klonlara benzerlik gösteren türlerin baskın olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında sintrofik bütirat ayrışmasında başlıca Syntrophus sp. türünün önemli rol aldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, şimdiye kadar kabul gören bütiratı ayrıştıran Syntrophomonas türlerinin ait olduğu Firmicutes'ten farklı olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte sintrofik propiyonat oksitleyen Syntrophobacter türünün de bütirat gideriminde aktif rol oynadığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Havasız arıtma, moleküler biyolojik teknikler, stabil izotop işaretlemesi.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Mahmut ALTINBAŞ, maltinbas@ins.itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 42.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Programı'nda tamamlanmış olan "Population dynamics in syntrophic butyrate degrading communities in anaerobic bioreactors" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 29.01.2007 tarihinde dergiye ulaştı, 08.03.2007 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.06.2007 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Identification of syntrophic butyrate degrading community with stable isotope probing technique in anaerobic bioreactors

Extended abstract

Anaerobic treatment is presently accepted as a sustainable technology for a wide range of wastewater and waste types; and its applicability is growing each year. An important intermediate of organic matter conversion under methanogenic conditions is butyrate; which may account for up to 60 % of methanogenesis in anaerobic bioreactors. The degradation of butyrate is thermodynamically not favorable unless the H_2 and/or formate can be removed by one of the hydrogen consumers. To proceed this reaction, the hydrogen level should be kept below 10^{-4} to 10^{-5} atm. Butyrate oxidation requires syntrophic interactions between β -oxidizing, hydrogen producing bacteria and hydrogen and/or acetate utilizers. To date, several butyrate as well as some long-chain fatty acids (up to C18) oxidizing bacteria have been isolated in co-culture with hydrogen utilizing partner. This could be either methanogenic or sulfidogenic micro-organisms. The information on the degradation of butyrate is limited to the pure cultures. Diversity and ecology of syntrophic butyrate-degrading bacteria is sharing this unknown characteristic and is waiting to be explored. In this concept, the novel SIP technique was used in this study to identify the key microorganisms of the syntrophic butyrate degrading communities. The SIP incubation with ^{13}C labeled butyrate was carried out on the wild anaerobic granular sludge of Eerbeek paper mill wastewater treatment plant, in the presence of sulfate (3 mM). It is very difficult to assess the best method for observing the most active microorganisms in mixed cultures. In this study, to reveal the genetic diversity of the complex microbial diversity, the conceptual design of the experiments were conducted to mimic in situ conditions to approach more real conditions as much as possible. For example, the ^{13}C labelled butyrate was fed together with the actual wastewater, which was fed to the full scale anaerobic bioreactor. Since the feeding conditions were not changed from the actual situation, the syntrophic butyrate degraders would be selectively separated by the density of the nucleic acids. These results can be assigned directly to natural systems, assuming the same environmental conditions. Subsequently applied Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) profiling method was

also useful for following the changes of the presence of species along the centrifugation gradient, and was also helpful for observing the heavy and light fraction differences. The composition of the bacteria and archaea community in the syntrophic butyrate degradation environment in the full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor of paper mill wastewater was determined by the 16S rRNA phylogenetic analyses of clone libraries derived from RNA extracted from the density resolved gradient of the SIP. Around 120 bacterial and 24 archaeal clones from each heavy and light fraction of the enrichment 16S rRNA gene libraries constructed from the original sludge were analyzed by comparing the DGGE and Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) fragment patterns of the amplified 16S rRNA genes. This diverse active member of the syntrophic butyrate degraders were represented by grouping in 9 different phyla, which showed more diversity than recent studies of the bacteria capable of syntrophic metabolism in terms of both phylogenetics and physiology. This functional group of organisms did not fall into the phylogenetically consistent groups, rather, it spread out into several lineages. In most cases, the closest uncultured relatives have been identified from anaerobic ecosystems. These were the majority of the microbial community associated with deep subsurface aquifer, anaerobic dechlorinating mixed cultures equine fecal contaminated sites and bioreactors. Sequence representatives of several bacterial divisions have been identified in a wide range of habitats, suggesting the sophisticated distribution of the corresponding organisms in the environment and, potentially, their wide metabolic capabilities. The 16S rRNA gene clone library showed that the largest groups of clones belonged to the members of the Proteobacteria, which were not what was expected from the community of syntrophic butyrate degradation that belong to the phyla of Firmicutes. The main possible role of the butyrate degradation was attained to the *Syntrophus* sp., Sequence types associated with the genus *Syntrophus* sp. can produce energy from the anaerobic oxidation of organic acids, with the production of acetate and hydrogen. However, it was also found that the *Syntrophobacter* sp., known as propionate degrader, also played an active role in the butyrate degradation. By using these techniques, potential roles of the strain specific microorganisms involved in the syntrophic butyrate degradation were achieved.

Keywords: Anaerobic treatment, molecular biological techniques, stable isotope probing.

Giriş

Havasız (anaerobik) arıtma günümüzde geniş bir atık ve atıksu türleri yelpazesi için kullanılan, uygulanabilirliği her yıl daha da büyüyen ve kabul gören bir teknolojidir. Atık maddelerin tamamen metana dönüşümü için kompleks mikrobiyal topluluklara ve farklı fizyolojik türlerdeki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen bir dizi reaksiyona ihtiyaç vardır. Bütirat, metanojenik şartlar altında organik madde dönüşümünde önemli bir ara ürün olup; havasız biyoreaktörlerde metanojenezin % 60'ını kapsayabilen önemli bir maddedir (Fang vd., 1995). Standart şartlar altında bütiratın ayrışması endojeniktir. Organik maddenin ayrışması sırasında oluşan H₂ ve/veya format, hidrojen tüketiciler tarafından ortamdan uzaklaştırılmadığı sürece bütiratın ayrışması termodinamik açıdan mümkün değildir (Schink ve Friedrich, 1994). Bu reaksiyonun gerçekleştirilmesi için hidrojen seviyesinin 10⁻⁴ ile 10⁻⁵ atm in altında tutulması gerekmektedir (McInerney vd., 1981).

Bütiratın ayrışması hidrojen tüketen organizmalarla yapılan sintrofik etkileşimlere dayalı olup; ayrışma mekanizması ile ilgili bilgiler saf kültür çalışmalarıyla sınırlıdır. Bütiratu ve bazı uzun-zincirli yağ asitlerini (C18 e kadar) oksitleyen birçok bakteri hidrojen tüketen bir mikroorganizma ile birlikte izole edilmiştir. *Syntrophomonas wolfei* (alt tür *wolfei*) hidrojen kullanan metanojenik arke veya sülfat indirgeyici bir bakteri ile birlikte izole edilen ilk türdür (McInerney vd., 1981). Daha sonra günümüze kadar *Syntrophosphora bryantii* (Stieb ve Schink, 1985; Zhao vd., 1990), *Syntrophomonas sapovorans* (Roy vd., 1986), *Syntrophus aciditrophicus* (Jackson vd., 1999), *Syntrophomonas TB-6* (Zou vd., 2003), *Syntrophomonas erecta* (Zhang vd., 2005), *Syntrophomonas curvata* (Zhang vd., 2004) ve diğer mezofilik β-oksidasyonu yapan saf kültürü günümüze kadar korunamamış sintrofik mikroorganizmalar da izole edilmiştir (Wu vd., 1992; Zhao vd., 1993).

Ekosistemin çok çeşitli olmasına rağmen izole edilmiş mikroorganizma sayısı çok azdır. Diğer yandan mikroorganizmayı izole etmek, emek ve

zaman isteyen bir çalışma olup; çalışmanın önceden elde edilmiş mikroorganizma ile sonuçlanması çok olası bir durumdur. Bu açıdan bakıldığında, bütirat ayrışmasını yapan sintrofik bakterilerin çeşitliliği ve ekolojisi birçok bilinmeyen özelliği içermektedir.

Günümüze kadar, kompleks ortamlardaki önemli biyodönüşümleri gerçekleştiren mikroorganizmaların kimliğini tespit etmek birçok çalışmanın asıl hedefi olmuştur. Ancak mikroorganizmaların tanımlanmasındaki en kısıtlayıcı adım; uygulanan tekniklerin gerçek ortam şartlarında yürütmedeki yetersizliklerdir. Bununla birlikte, mikrobiyolojik analizlerden elde edilen bilgilerin yorumlanmasında ve gerçek sistemlere uygulanmasında asıl sorun ne ölçüde ekolojik bir bilgiyi bize ulaştırdığıdır. Bu çerçevede, bu çalışmada, yukarıda bahsedilen sorunlara çözüm olarak bütiratu ayrıştıran sintrofik topluluğun tanımlanması için Stabil İzotop İşaretlemesi (Sİİ) tekniği uygulanmıştır. Sİİ tekniği aktif bakteriyel toplulukları belirlemek amacıyla işaretlenmiş substratların inkübasyonu ile uygulanan ve kültür çalışması gerektirmeyen bir tekniktir (Radajewski vd., 2000). Bu teknik ile, izotop (¹³C, ²H, ¹⁵N) ile işaretlenmiş substratların hücre içine asimilasyonu ve ardından işaretli nükleik asitlerin işaretli olmayan nükleik asitlerden izofinik yoğunluk-gradyan santrifüjü yoluyla ayrılması sağlanmaktadır. Sİİ ile elde edilen işaretli ve işaretli olmayan nükleik asitlerin Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGJE) veya Terminal-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (T-RPUP) gibi yöntemlerle parmakizleri (fingerprints) çıkartılabilmektedir. Ribozomal Ribo Nükleik Asit (rRNA)'in küçük alt birim genleri ise (Lu vd., 2005; Lueders vd., 2004b; Mahmood vd., 2005; Manefield vd., 2002;) ve/veya fonksiyonel genlerinin (Hutchens vd., 2004; Lin vd., 2004; Radajewski vd., 2002) sekans analiziyle karakterize edilebilmektedir. İzotopun mikroorganizmaların bütün genlerine ideal bir biçimde işlenmesi tüm aktif mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Böylece bu teknik organizmanın kimliğini ve fonksiyonunu eşleştirmede kullanılan diğer metotlara göre daha avantajlı hale gelmektedir. Bu teknik nükleik asitlerin

ağır (^{13}C) ve hafif (^{12}C) kısımlarını ayırmada çok hassas sonuçlar vermektedir. Ayırma işlemi ultrasantrifüj kullanarak ^{13}C ile ^{12}C arasındaki kütle farkına dayalı olarak yapılmaktadır. Tekniğin güvenilirliği açısından, bu ayırma işleminde ağır gradyan fraksiyonu sadece ^{13}C nükleik asitleri içermelidir. Daha düşük santrifüj hızı (140 000 g) ve daha uzun santrifüj zamanında (69 saat) ağır ve hafif kesitler verimli bir şekilde ayrılabilir (Hutchens vd., 2004). Öte yandan, hafif ve ağır kesitlerin ayrılma verimini organizmanın nükleik asitteki G+C içeriği gibi başka faktörler de etkilemektedir. İçinde yüksek oranda G+C bulunan organizmanın kütlesi artacağından organizma ^{13}C işaretli nükleik asitin kütlesine yaklaşarak gradyanın ağır tarafına doğru hareket edebilmektedir (Lueders vd., 2004a). Gradyanın ağır olan kesiti değerlendirirken bu olasılık dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmanın amacı, havasız biyoreaktörde bütiratın ayrışmasından sorumlu anahtar mikroorganizmaların kimliğini tespit etmektir. Bu kapsamda Eerbeek Kağıt Fabrikası (Hollanda)'nın atıksu arıtma tesisine ait havasız granüler çamur kullanılmıştır. Söz konusu çamurun ^{13}C işaretli bütirat ile inkübasyonu yapılmıştır. Atıksu içerisindeki mevcut sülfatın metanojenik mikrobiyal topluluğa olan etkisi de Sİİ inkübasyonuna sülfat eklenmesi ile incelenmiştir. ^{13}C işaretli bütirat ve sülfat inkübasyonunda, 5., 20., 30. ve 40. günlerde Sİİ analizi için örnekler alınarak en uygun inkübasyon süresi parmak izi profillerine göre belirlenmiştir. Sonrasında ise klonlama ve sekans analizleri ile aktif mikroorganizmalar tanımlanmıştır.

Materyal ve yöntem

Aşı

Bu çalışmada kullanılan granüler yapıdaki aşı Eerbeek Kağıt Endüstrisi atıksuyunu arıtan Havasız Çamur Yataklı (HÇY) reaktörden alınmıştır (Paques Environmental Technology, BV, Balk, Hollanda). Bu reaktörde ~%70-80 KOİ giderimi ile birlikte metanojenik aktivite ve sülfat indirgenmesi gözlenmiştir. Reaktörde oluşan gazda %80 CH_4 , %19 CO_2 ve %1 H_2S tespit edilmiştir. Reaktöre beslenen atıksuyun KOİ/ SO_4^{2-} oranı ~9.5-10 olup; toplam KOİ'si 1700 mg/L'dir.

İnkübasyon

500 μL aşı, makro ve mikro besin maddelerini içeren 15 mL'lik sıvı hacime sahip 35 mL'lik serum şişelerine transfer edilmiştir (Plugge, 2005). Makro besin madde miktarları reaktörün içerisinde (mg/L); KH_2PO_4 : 408; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 534; NH_4Cl : 360; NaCl : 360; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 120; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 132; NaHCO_3 : 4 000, mikro besin madde miktarları ise; H_3BO_3 : 0.062; MnCl_2 : 0.061; FeCl_2 : 0.944; CoCl_2 : 0.065; NiCl_2 : 0.013; ZnCl_2 : 0.068; CuCl_2 : 0.05; AlCl_3 : 0.05; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: 0.05; Na_2SeO_3 : 0.017; Na_2WO_4 : 0.029; Na_2MoO_4 : 0.021 olacak şekilde hazırlanmıştır. Serum şişeleri bütiril tapan ile kapatılıp alüminyum kapaklar ile tapan sabitlenmiştir. ^{13}C -Bütirat (Sigma-Aldrich, İngiltere), inkübasyon başına 200 μmol olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha önce yapılmış çamur aktivite testlerine bağlı kalınarak substrat tamamen tükenmeden hemen önce serum şişelerine ^{13}C -Bütirat ilavesi yapılmıştır. Toplam dört farklı inkübasyon süresi seçilmiş ve her bir süre için farklı şişede inkübasyon tamamlanmıştır. İnkübasyon sonrası serum şişelerinden alınan 1 mL'lik gaz numunelerde metan konsantrasyonu belirlenmiştir. Metan, Packard-Becker 417 model gaz kromatograf (Chrompack B.V., Middelburg, Hollanda) De Bok ve diğerlerinin (2002) kullandığı yöntemle ölçülmüştür. Serum şişelerinden alınan 1 mL hacmindeki sıvı numuneler ise 10 dakika ve 14 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst fazdan alınan numunelerde sülfür, bütirat ve asetik asit konsantrasyonları belirlenmiştir. Sülfür, Truper ve Schlegel (1964)'de belirtildiği gibi ölçülmüştür. Bütirat ve asetat konsantrasyonları ise Stams ve diğerleri (1993) tarafından belirtilen yöntemle göre LKB model yüksek performanslı likit kromatograf (Chrompack B.V., Middelburg, Hollanda)ta ölçülmüştür. Serum şişelerinde kalan numuneler ise santrifüj (10 dakika ve 14000 rpm) edildikten sonra üst fazı atılmış ve -20°C 'de RNAlater® (Ambion Inc., Austin, Amerika) içerisinde üretici firmanın önerdiği şekilde saklanmıştır.

Nükleik asit ekstraksiyonu

Çamurdan RNA ekstraksiyonu TRIZOL® ile yapılmıştır (Invitrogen, Breda, Hollanda). Yaklaşık 25 mg çamur, 500 mg zirkonyum boncuk-

ları ve 1.5 ml TRIZOL[®] içeren 2-mL'lik tüplere transfer edilmiştir. Granüler çamur boncuklu dövücüde (45 s, 6.5 m/s) parçalandıktan sonra 18 000 g'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Sonrasında sıvı fazdaki RNA kloroform kullanılarak saflaştırılmıştır. Son olarak RNA 2-propanol kullanılarak çöktürülmüş ve 100 µl EB tamponu (EB, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5) kullanılarak tekrar sıvı faza geçirilmiştir. RNA Easy Kit (Qiagen, Hamburg, Almanya) kullanılarak RNA saflaştırmasına devam edilmiştir. Elde edilen RNA ürünü rutin olarak agaroz jelde kontrol edilmiştir. NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Intas, Göttingen, Almanya) kullanılarak miktarlar belirlenmiştir.

Santrifüjleme

Yoğunluk gradyan santrifüjü 11 mL'lik ultrasantrifüj tüpleri (Polyallomer, Sorvall, Minnesota, Amerika), Kontron TVF 65.13 düşey rotora sahip Centrikon T-1065 santrifüjü (Kontron Instruments, Bletchley, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi 20°C'de 65 saat ve 37 000 rpm'de (130 000 g_{av}) sezyum trifloroasetat (CsTFA) gradyanında yapılmıştır. rRNA, ortalama yoğunluğu 1.795 g/mL olan CsTFA gradyanında ayrılmıştır. Çözeltiler; 2 g/mL CsTFA stok çözelti (Amersham, Roosendaal, Hollanda), gradyan tamponu (0.1 M Tris-HCl, pH 8; 0.1 M KCl; 1 mM EDTA) ve rRNA (1000 ng)'nın son hacim 11 mL olacak şekilde karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Buna ilave olarak, RNA'nın stabilitesi için 350 µL formamit eklenmiştir.

Gradyanın fraksiyonlarına ayrılması

Santrifüj sonrası gradyan, tüpün alt tarafından başlayarak yukarı doğru peristaltik pompa (Watson Marlow, Rotterdam, Hollanda) kullanılarak 11 eşit hacimde fraksiyonlarına ayrılmıştır. Her bir fraksiyonun yoğunluğu, 75µL'lik numunelerin tartılmasıyla belirlenmiştir. CsTFA gradyan fraksiyonlarındaki nükleik asitler 1:1 hacimde iso-propanol eklenerek çöktürülmüştür. Çökelekler %70'lik etanol ile bir kere yıkanıp 30 µL'lik temizleme tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde sıvı faza geçirilmiştir. Toplam rRNA miktarları, RiboGreen[®] RNA Quantitation Kiti (Molecular

Probes, Leiden, Hollanda) kullanılarak belirlenmiştir.

Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) sentezi

16S rRNA'yı tamamlayıcı tek zincirli DNA, SuperScript[™] III RNase H⁺ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Breda, Hollanda) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlenmiştir. Ters Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizleri için hazırlanan 13 µL'lik reaksiyon karışımı, 10 ng toplam RNA, 10 pmol tüm organizmaları kapsayan ters primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991), 10 pmol dNTP karışımı ve steril RNaz-içermeyen su (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) ihtiva etmektedir. 16S rRNA'nın ikincil yapısını bozmak için karışım 65°C'de 5 dakika, hemen arkasından buz üzerinde 1 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında cDNA sentezi için 13 µL'lik reaksiyon karışımına 4 µL 5× Tekil zincir tamponu, 1 µL 0.1 M DTT, 1 µL (40 birim) RNaseOUT[™] RNase inhibitörü (Invitrogen, Breda, Hollanda), 1 µl (200 birim) Superscript III[™] RT eklenmiştir. Bu karışım 50°C'de 1 saat, arkasından reaksiyonu durdurmak için 15 dakika 70°C'de inkübe edilmiştir. cDNA'yi tamamlayıcı kısım olan RNA'yı gidermek için ise, reaksiyon karışımı RNase H (2 birim) ile 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.

Amplifikasyon

cDNA çözeltisinden 2 µL'lik kısım, bakteri ve arke PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. PCR 50 µL'lik reaksiyon karışımlarında *Taq* DNA polimerazı (Invitrogen, Breda, Hollanda) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon işlemi Roest ve diğerleri (2005) tarafından yürütülen çalışmada belirtildiği gibi yapılmıştır. Çoğaltma işlemi Biometra Thermocyclers (Goettingen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm primerler MWG-Biotech (Ebersberg, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Oluşan ürünün boyutu ve kalitesi % 1 (a/v)'lik agaroz jel ile elektroforez yapılarak belirlenmiştir.

Klonlama ve sekans analizi

PCR'de çoğaltılan bakteri ve arke ürünleri (~400 baz çifti) üretici firmanın talimatnamesine göre QIAquick PCR kiti (Qiagen, Hilden

Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünlerinin miktar ve kalitesi % 1 (a/v)'lik agaroz jel ile elektroforezde DNA işaretleyici (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas, Vilnius, Litvanya) ile birlikte elektroforezi yapılarak belirlenmiştir. Sonrasında ürünler pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, Amerika) kullanılarak vektöre bağlanmış ve arkasından XL1-Blue Compotent Cells (Stratagene, Amerika) hücrelerine üretici firmanın talimatnamesine göre klonlanmıştır. Klonlar amfisilin ve mavi-beyaz renk ayırımına dayanan yöntem ile 20 µl TE tampon çözeltisine aktarılarak 95°C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve hücreler parçalanarak DNA sıvı faza geçirilmiştir. DNA pGEM®-T spesifik PG1 (5'-TGGCGGCCGCGGGAA-3') ve PG2 (5'-GGCCGCGAATTCAGTAGTG-3') primerleri ile çoğaltılmış ve ürünlerin *Alu* I, *Cfo* I, ve *Msp* I (Promega, Madison, Amerika) restriksiyon enzim karışımı kullanılarak 37°C'de 90 dakika süreli inkübasyonu sonucunda fraksiyonlarına ayrılmıştır. Enzim reaksiyonu ile kısa zincirlerine ayrılmış klonları birbirinden ayırmak için Elchrom Submerged Gel Electrophoresis System (Elchrom, Cham, İsviçre) kullanılarak RPUP analizi yapılmıştır. Ürünler bu elektroforezde % 12 (a/v)'lik hazır agaroz jellerde DNA işaretleyici (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) kullanılarak 100 V, 55 °C'de 45 dakika süre ile koşurulmuştur. Sonrasında DNA etidyum bromit ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenmiştir. Farklı profile sahip klonlar DGJE ve sekans analizleri için seçilmiştir. DNA; QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan klonların sekans analizleri vektör üzerinde yer alan dizinlere uygun T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG G-3') ve Sp6 (5'-GATTTAGGTGACACTATA G-3') (Promega, Madison, Amerika) primerleri kullanılarak yapılmıştır. İki yönlü yapılan sekans analizleri DNA STAR, Seqman II program (expert sequence analysis software) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans analizlerin veri bankalarındaki homoloji araştırması BLAST (Altschul vd., 1997), dizinleme çalışmaları ise Clustal X (Chenna vd., 2003) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm se-

kans dizinleri CHIMERA_CHECK programı sürüm 2.7, Ribosomal Database Project II (RDP II) (Maidak vd., 2001) ile hatalı (chimeric) genlerin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

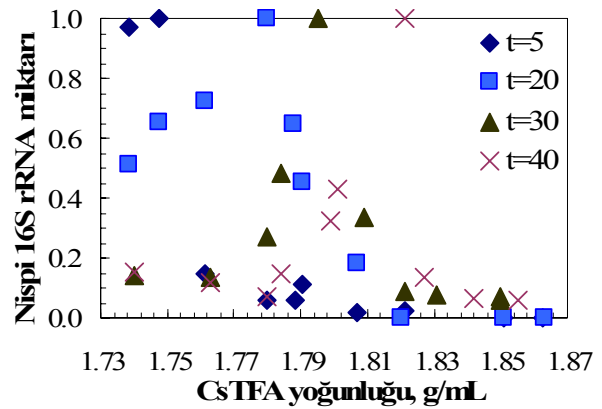
DGJE

Bakteri ve arke için GC ekli PCR ürünleri DCode™ System cihazında, (BioRad, Hercules, Amerika) üre ve formamit içeren % 8 poliakrilamit (37.5:1 akrilamit-bisakrilamit) jelde koşurulmuştur. Koşurulma ve jelin boyanması Roest ve diğerlerinde (2005) belirtildiği gibi yapılmıştır.

Deneysel çalışma sonuçları

Santrifüj gradyanlarında SSU rRNA dağılımı

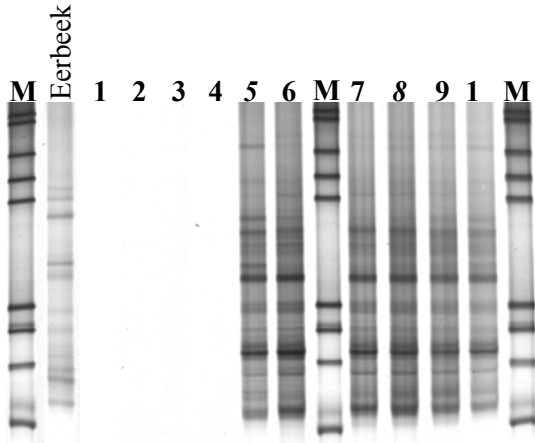
5, 20, 30 ve 40 günlük inkübasyon sürelerinin ardından ekstrakte edilen rRNA örnekleri, işaretli nükleik asitleri işaretli nükleik asitlerden ayırmak için CsTFA kullanılarak izofinik yoğunluk-gradyanı santrifüjüne tabii tutulmuştur. CsTFA ile santrifüjün ardından 10 ayrı tüpe bölünen rRNA örneklerinin yoğunluğu belirlenerek; elde edilen sonuçlar bir grafik üzerinde işaretlenmiş ve daha sonraki klonlama ve sekans işlemleri için hafif ve ağır fraksiyonlar değerlendirilmiştir. [¹³C] bütirat ve 3 mM sülfat karışımı ile 5, 20, 30, ve 40 günlük inkübasyonu sonunda çamurdan ekstrakte edilen rRNA'ların CsTFA yoğunluk gradyanı santrifüj sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir. Gradyanın ağır ve hafif bölümleri arasındaki belirgin farklılık bu şekilden gözlenmektedir.



Şekil 1. Çamurdan ekstrakte edilen rRNA'ların CsTFA yoğunluk gradyanı santrifüj sonuçları

40 günlük inkübasyonun “zaman serileri” ağır ve hafif fraksiyonlar arasındaki belirgin farkı ortaya koymaktadır. Genellikle, işaretli nükleik asit içermeyen hafif fraksiyon CsTFA sonuçlarında 1.79 g/mL’den daha az bir yoğunluk değeri gözlenmiştir (Lueders vd., 2004a). 40 günlük inkübasyon süreci sonrasında, ağır fraksiyonun yoğunluğu CsTFA’da ağır kısımlar için saptanan kritik değer üzerinde olan 1.82 g/mL değerine ulaşmıştır.

Fraksiyonlar arasındaki popülasyon değişimlerini gözlemlemek için, 40 gün [¹³C] bütirat ve 3 mM sülfat karışımı ile inkübasyona tabi tutulan çamurun, santrifüj gradyanlarının her bölümü DGJE parmakizi profilleri ile analiz edilmiştir (Şekil 2, 1-10 arası profiller, gradyanın ağırdan hafife giden fraksiyonlarına karşılık gelmektedir). DGJE profilinde görüldüğü gibi, 40 gün inkübasyona tabi tutulan çamurun fraksiyonları arasında çok az bir değişim olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. PCR ile çoğaltılan 16S rRNA'ların bakteriyel DGJE profilleri

DGJE profilindeki farklılıklar her bir fraksiyondaki bantların zayıflık ve kalınlıklarına bakılarak belirlenmiştir. Şekil 2’de, 5 numaralı fraksiyonda bantların kalınlığı göze çarparken, 8 numaralı fraksiyonda bu bantların zayıfladığı görülmüştür. Bu nedenle, DGJE jelinde 5 numara ile gösterilen fraksiyon, ağır kısım olarak kabul edilmiş ve bu kısımdaki mikroorganizma topluluğu filogenetik karakterizasyonda ele alınmıştır. Bu kriterler göz önünde bulundurularak, 8 numaralı fraksiyon da hafif olan kısım olarak ele alınmıştır.

Yoğunluğuna göre ayrılmış nükleik asitlerinin DGJE profilleri ve sekans analizleri

Çamurun incelenmesi için toplam 230 adet 16S rRNA bakteriyel gen klonu (116 hafif ve 114 ağır) analiz edilmiştir. 16S rRNA genlerinin RPUP analiz sonuçları 40 değişik grupta toplanmıştır. Analiz sonuçlarının veri bankasında karşılaştırılması sonucunda söz konusu 16S rRNA genlerinin 12 temel bakteriyel filum ile bağlantılı olduğunu tespit edilmiştir (Altschul vd., 1997). Tablo 1’de toplu halde verilen bu türler; δ , α , β , γ - *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae* ve *Chlorobi* olarak belirlenmiştir.

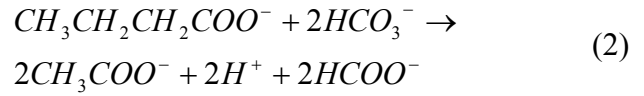
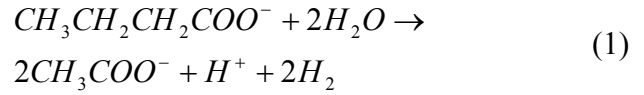
Tablo 1. Sintrofik bütirat ayrıştıran topluluğun filogenetik tanımlaması ve türlerin yüzde dağılımı

Taksonomik Sınıflandırma	Klonların dağılımı	
	Ağır	Hafif
Deltaproteobacteria	50 (43.1)	39 (%34.2)
<i>Syntrophobacter</i> sp.	4	14
<i>Desulfovibrio</i> sp.	20	13
<i>Desulforegula conservatrix</i>	1	-
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	-	3
<i>Desulfacinum</i> sp.	1	-
<i>Desulfomonile limimaris</i>	-	1
<i>Syntrophus</i> sp.	6	5
<i>Bacteriovorax</i> sp.	11	-
<i>Thermodesulforhabdus norvegicus</i>	3	-
Diğerleri	4	3
Gammaproteobacteria	6 (%5.2)	1 (%0.9)
Betaproteobacteria	1 (%0.9)	2 (%1.8)
Alphaproteobacteria	-	1 (%0.9)
Firmicutes	8 (%6.9)	8 (%7)
<i>Syntrophomonas</i> sp.	2	-
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	2	4
Diğerleri	4	4
Chloroflexi	23 (%19.8)	54 (%47.4)
<i>Anaerolinea thermophila</i>	13	49
<i>Caldilinea aerophila</i>	5	2
<i>Dehalococcoides</i> sp.	5	3
Bacteroidetes	19 (%16.4)	2 (%1.8)
Verrucomicrobia	-	1 (%0.9)
Acidobacteria	2 (%1.7)	1 (%0.9)
Actinobacteria	2 (%1.7)	-
Nitrospirae	-	3 (%2.6)
Chlorobi	5 (%4.3)	2 (%1.8)

Yoğunluğuna göre ayrılmış nükleik asitlerin ağır olan kısmı göz önüne alındığında klonlar 9 ana grupta toplanmıştır. Bu gruplar; δ , β , γ -*Proteobacteria* (sırasıyla %43.1, %0.9, ve %5.2), *Chloroflexi* (%16.4), *Firmicutes* (%6.9), *Bacteroidetes* (%16.4), *Acidobacteria* (%1.7), *Actinobacteria* (%1.7), *Chlorobi* (%0.9)'dir. Diğer yandan, hafif olan fraksiyonun klonları 11 ana grupta toplanmıştır. Bu gruplar; δ , α , β , γ -*Proteobacteria* (sırasıyla %34.2, %0.9, %1.8 ve %0.9), *Chloroflexi* (%47.4), *Firmicutes* (%7), *Verrucomicrobia* (%0.9), *Bacteroidetes* (%1.8), *Acidobacteria* (%0.9) *Nitrospirae* (%2.6), *Chlorobi* (%1.8)'dir.

Bütiratu ayrıştıran aktif mikrobiyal topluluğun önemli bir bölümünün sülfat indirgeyen bakteriler (SRB) olarak gruplandırılan *Desulfovibrio* türleriyle yakından ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu SRB popülasyonunun varlığı, bu popülasyonun hidrojen ve/veya format tüketen metanojenler ile iş birliği içinde proton indirgeyici olarak görev aldığını göstermektedir. Bütiratu ayrıştıran topluluğun yapısı fizyolojik açıdan incelendiğinde, SRB ve metanojenlerin varlığı daha net bir şekilde açıklanabilmektedir.

Teorik olarak 1 mol bütiratın havasız ortamda ayrışması ile açığa çıkan proton indirgeyici, 2 mol H_2 (Eşitlik 1) veya 2 mol formata (Eşitlik 2) eşdeğerdir. Bu çalışmada yapılan inkübasyonda verilen bütirat miktarının 18 mol olması ile 36 mol H_2 açığa çıkmaktadır. Termodinamik açıdan SRB'nin metanojene göre daha üstün olmasından dolayı açığa çıkan H_2 ilk önce SRB tarafından kullanılacaktır. Ancak ortamda bulunan 3 mol sülfat, mevcut bütiratın proton eşdeğerinden düşüktür. Çünkü 1 mol sülfatın indirgenmesi için 4 mol hidrojen gerekmektedir (Eşitlik 3). Bu nedenle bütiratın ayrışmasından açığa çıkan 36 mol H_2 'in sadece 12 mol'lük kısmını SRB'nin kullanabildiği görülmektedir. Sonuç olarak, bütün sülfatın indirgenmesi için hidrojenin bir kısmı yeterli olduğu düşünülürse, metanojen tarafından indirgenmek üzere ortamda 24 mol H_2 kalmaktadır. SRB'lerin oksitleyebileceği hidrojen miktarından daha fazla hidrojenin ortamda bulunmasından dolayı hidrojen kullanan metanojenler bütiratu ayrıştıran karışık kültürde tespit edilmiştir.



Syntrophobacter sp. (propiyonat oksitleyici bakteri) türü, gradyanın hafif fraksiyonunda 14 klon (%12.3), ağır fraksiyonda ise 4 klon (%3.5) gibi düşük bir oranda saptanmıştır. Klonların bu dağılımı propiyonat oksitleyici bakterilerin bütirat ayrışmasında rol aldığını fakat etkinliğinin az olduğunu göstermektedir. SRB'nin ağır fraksiyondaki azınlık grupları, *Desulforegula conservatrix* ve *Desulfacinum* sp. olarak ve hafif fraksiyondaki azınlık gruplar ise; *Desulfomonile limimaris* ve *Desulfobacterium ceticum* olarak tespit edilmiştir.

16S rRNA gen bankası, klonların büyük bir kısmının *Proteobacteria* grubunun üyesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunun yanında bütirat gideriminde başlıca *Syntrophus* sp. türünün görev aldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, şimdiye kadar kabul gören bütiratu ayrıştıran *Syntrophomonas* türlerinin ait olduğu *Firmicutes*'ten farklı olduğunu göstermiştir. Sekans analizi *Syntrophus* sp. geni ile benzerlik gösteren türler, organik asitlerin havasız oksidasyonu sonucunda asetat ve hidrojen gibi ara ürünler üretmektedir. Bununla birlikte sintrofik propiyonat oksitleyen *Syntrophobacter* türünün de bütirat gideriminde aktif rol oynadığı tespit edilmiştir.

Birçok yağ asidi kullanan bakterilerin; saf kültür içerisinde homoasetojen, sülfat indirgeyici veya fermentasyon ile çoğaldığı bilinmektedir (Beaty ve McInerney, 1987; Chen vd., 2005; Stams vd., 1993). Yağ asidi kullanarak çoğalan organizmaların bu özelliklerini, ortamın enerji seviyesine bağlı olarak, karışık kültürde de göstermesi mümkün olabilmektedir. Buna benzer olarak sintrofik bakterilerde, *Syntrophomonas wolfei* türünün krotonatı indirgemesi (Wallrabenstein ve Schink, 1994) gibi organizmaların ara ürün-

leri indirgenmesi ve elektron transfer zinciri ile ortaya çıkan enerjinin korunması söz konusu olabilmektedir. Sitokromların *Syntrophomonas wolfei* içinde bulunması bu mikroorganizmanın bir elektron transfer zincirine sahip olabileceğini de işaret etmektedir (McInerney ve Wofford, 1992).

Filogenetik gruplar içerisinde en çok bulunan ikinci türün (bütün rRNA gen klonlarının % 16.4'ü) ise *Chloroflexi* grubuna ait, hidrokarbonları ayrıştıran toplulukta bulunan klonlarla ilgili olduğu bulunmuştur. Ancak, *Chloroflexi* grubuna ait bakterilerin, gradyanın hafif kısmında artarak topluluğun % 47'sini oluşturduğu saptanmıştır. Değerlendirme yapılırken *Chloroflexi* grubunun birçok bilinmeyen tür içerdiği ve temsil edici türlerin azlığı göz önüne alınmalıdır. Bu yüzden, veri bankasından karşılaştırılarak belirlenen ve değerlendirilen organizmalar yanlış sonuçlara varılmasına neden olabilmektedir.

Gradyanın ağır kısmında % 16.4'lük oranda *Taxeobacter* sp., *Reichenbachia agariperforan*, *Rhodothermus marinus*, ve *Saprospira* türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu türler *Bacteroidetes* filumuna ait olup sakkarolitik özelliğe sahip bu türlerin sintrofik bir ortamda bulunması şüphe oluşturmaktadır.

Chlorobium filumuna ait olan klon, kağıt fabrikası atıksuları arıtma tesisinden ekstrakte edilen 16S rRNA'sına düşük bir oranda benzerlik göstermiştir (<93). Aynı zamanda bu klonların, petrol rafinerileri, diğer yüzey altı yaşam alanları ve hidrokarbon ile kirlenmiş alanlardan izole edilmiş *Chlorobium* sp türlerinin 16S rDNA dizinlerine olan benzerliği de oldukça düşüktür (Heising vd., 1999).

Ağız bölgesinden izole edilmiş sakkarolitik olmayan *Eubacterium brachy* (Cheeseman vd., 1996), ağır fraksiyonda tespit edilen diğer bir klondur. Bu türe, aynı çamur üzerinde yürütülen asetat, propiyonat ve bütirat karışımından oluşan ve 25°C ve 37°C'de inkübasyonu yapılan bir başka kültür çalışmasında da rastlanmıştır (Altınbaş, 2007). Bu türler sülfat indirgeyen mikrobiyal toplulukta homoasetojenik bakteri gibi çalışarak aktivitelerini sürdürebilmektedir.

Homoasetojenik bakteriler; hidrojenin karbon-dioksit ile reaksiyona girerek asetat oluşturması için ortam hazırlama özelliğine sahip olan gruptur.

Deniz dibinde biriken sedimentte ve kağıt fabrikası çıkış suyu arıtma tesisinde tespit edilen 7 klon sekansının; *Proteobacteria* olmayan *Chloroflexi*, ve *Bacteroidetes* filumundan *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, ve sınıflandırılmamış OP8 grubunda bulunan bakterilere ait olduğu belirlenmiştir. Tanımlanmış türlerle benzerliği düşük olan *Acidobacteria/Holophaga* grubu klonlar, hava numunesinden ve derin yeraltı suyu 0.2 mikrometre'lik por çapına sahip filtreden geçen mikroorganizmalardan izole edilmişlerdir.

Gradyanın ağır kısmından elde edilen klonların izole edildikleri yaşam alanları ve klonların topluluk içerisindeki yüzdeleri Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 2. Gradyanın ağır fraksiyonunda bulunan türlerin yaşam alanlarına bağlı klon yüzde dağılımları (Altschul vd., 1997)

Yaşam Alanı	Oran (%)
Derin yüzey altı akiferi	17.1
2-dikloropropan ayrıştıran havasız reaktör	16.2
Ahr atığıyla kirlenmiş bölge	10.8
Yüzey altı toprak	6.3
Pirinç tarlaları	6.3
Kağıt fabrikası, havasız reaktör	4.5
Yağ asitlerini ayrıştıran havasız reaktör	3.6
Asetat indirgeyen metanojik topluluk	3.6
Asidik sedimentler	2.7
2,3,4,5-klorobifenil ayrıştıran sediment	2.7
Havasız domuz lagünleri	2.7
Proteini ayrıştıran havasız reaktör	2.7
Metan hidrat ile ilişkili deniz dibi sedimenti	2.7
Hidrotermal menfez	1.8
Amonyak oksidasyonu gözlenen anoksik deniz sedimenti	1.8

İzole edilen filototipler içerisinde varlığı sadece birer kez belirlenen klon türleri ise, hidrokarbon ve klorürlü çözelti ile kirlenmiş akifer, pilot ölçekli perklorat indirgeyici biyoreaktör, 4-

metilbenzoatı ayrıştıran metanojenik topluluk, trikloroetanla kirlenmiş derin akifer, dolgu alanı süzüntüleriyle kirlenmiş akifer, peyniraltı atıksularının psikofilik sıcaklıkta havasız biyoreaktörde arıtılan çamur, amonyak nişastası üretim atıksularını arıtılan granüler çamur, soda gölü, hava numuneleri ve derin yeraltı sularında yaşayan mikroorganizmalardır. Özetle, bütün klonlar farklı çoğunlukla havasız yaşam ortamlarından elde edilmiştir.

Sülfat indirgeyici bakteriler; başta delta-*Proteobacteria* olmak üzere, birçok taxonomic gruptan oluşmakla beraber bazı üyeler *Nitrospira* türüne aittir. Ancak, bu filum içinde bulunan klonlar hafif fraksiyonda gözlemlendiği için bu türlerin sintrofik bütirat giderilmesinde görev almadığı söylenebilir.

Arke nükleik asitlerin sekans analizleri

Arkeler *Euryarchaeota* filumu içinde yer alan 3 farklı tür ile temsil edilmiştir. Bu 3 arke türü; *Methanobacterium formicicum* (Bryant ve Boone, 1987), *Methanobacterium beijingense*, ve *Methanosaeta concilii* olarak tanımlanmaktadır. Bu türler hidrojen ya da format kullanan metanojenler (*M. Beijingense* ve *M. formicicum*) ve asetat kullanan metanojenler (*M. Concilii*) olmak üzere 2 fonksiyonel gruba ayrılmaktadır. Hidrojen kullanan metanojenler % 62.5 oranında iken, asetat kullanan metanojenler tüm klonların geri kalan kısmını oluşturmaktadır.

Sonuçlar

Kağıt fabrikası atıksu arıtma tesisine ait tam ölçekli HÇY reaktöründe, sintrofik bütirat gideren ortamda bulunan bakteri ve arke topluluklarının kompozisyonu; Sİİ yoğunluk gradyanından ayrılan ağır ve hafif fraksiyonlarından 16S rRNA sekans analizi yapılarak tespit edilmiştir. Sintrofik bütirat gideren bu aktif türler, 9 farklı filum içerisinde yer almaktadır. Bu daha önce, sintrofik metabolik aktiviteye sahip bakterilerle yapılan filogenetik ve fiziksel özellik çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre daha fazla çeşitlilik olduğunu göstermektedir.

Farklı besin grubuna ait mikroorganizmaların mevcut olduğu ortamda işaretlenmiş substratı

kullanan topluluğun yapısı tanımlanırken bunun dışındaki mikroorganizmalara da besin zinciri ile bulaşması Sİİ tekniğinde problem teşkil etmektedir. İşaretlenmiş substratın kullanılmasının ardından, organizma işaretlenmiş ara ürün üretilemekte ve bu ara ürün diğer besin grupları tarafından kullanılabilir. Bu özellik birçok çalışmada Sİİ tekniğinin dezavantajı olarak ifade edilirken; bu çalışmada tekniğin önemli üstün bir özelliği olarak kullanılmıştır. Bütiratı ayrıştıran bakterilerin oluşturduğu ürünler metanojenik arkeler tarafından kullanılmaktadır. Böyle bir besin zincirinin olması ile bütiratı ayrıştıran aktif bakteri ve arke türleri tanımlanabilmiştir.

Mikrobiyal topluluğun yapısını ve fonksiyonunu eşleştiren Sİİ tekniği; farklı mikrobiyal toplulukların özelliklerini açıklamak amacıyla tek başına ya da tamamlayıcı olarak kullanılabilen güçlü bir tekniktir. Bu yöntem doğal ortamlarında sintrofik bütiratı ayrıştıran mikroorganizmalarla ilgili etkili bir bakış açısı sağlamıştır. Bununla birlikte, aktif popülasyonda yer alan türlerin metabolik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılacak saf kültür çalışmalarında da kullanılacak bilgiler bu teknik ile ortaya çıkarılmıştır.

Kaynaklar

- Altınbaş, M., (2007). Population dynamics in butyrate degrading communities in anaerobic bioreactors, *Doktora tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Altschul, S.F., Stephen, F., Thomas, L., Madden, L., Alejandro, A., Schaffer, A., Zang, J., Zhang, Z., Miller, W. ve Lipman, D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, **25**, 17, 3389-3402.
- Beatty, P.S. ve McInerney, M.J., (1987). Growth of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture on crotonate, *Archives of Microbiology*, **147**, 4, 389-393.
- Bryant, M.P. ve Boone, D.R., (1987). Isolation and characterization of *Methanobacterium formicicum* MF, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**, 2, 171-173.
- Cheeseman, S.L., Hiom, S.J., Weightman, A.J. ve Wade, W.G., (1996). Phylogeny of oral asaccharolytic Eubacterium species determined by 16S Ribosomal DNA sequence comparison and proposal of *Eubacterium infirmum* sp. nov. and

- Eubacterium tardum* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**, 4, 957-959.
- Chen, S., Liu, X. ve Dong, X., (2005). Syntrophobacter sulfatireducens sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 3, 1319-1324.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. ve Thompson, J.D., (2003). Multiple sequence alignment with the clustal series of programs, *Nucleic Acids Research*, **31**, 13, 3497-3500.
- De Bok, F.A.M., Luijten, M.L.G.C. and Stams, A.J.M., (2002). Biochemical evidence for formate transfer in syntrophic propionate-oxidizing cocultures of Syntrophobacter *fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 9 4247-4252.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. ve Li, Y.Y., (1995). Anaerobic degradation of butyrate in a UASB reactor, *Bioresource Technology*, **51**, 1, 75-81.
- Heising, S., Richter, L., Ludwig, W. ve Schink, B., (1999). *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a "*Geospirillum*" sp. strain, *Archives of Microbiology*, **172**, 2, 116-124.
- Hutchens, E., Radajewski, S., Dumont, M.G., McDonald, I.R., Murrell, J.C. ve Hutchens, E., (2004). Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing, *Environmental Microbiology*, **6**, 2, 111-120.
- Jackson, B.E., Bhupathiraju, V.K., Tanner, R.S., Woese, C.R. ve McInerney, M.J., (1999). *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen- using microorganisms, *Archives of Microbiology*, **171**, 2, 107-114.
- Lane, D.J., (1991). *16S/23S rRNA sequencing*, in *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, eds, Stackebrandt E. and Goodfellow M., John Wiley & Sons, 115-1745, Chichester, United Kingdom.
- Lin, J.L., Radajewski, S., Eshinimaev, B.T., Trotsenko, Y.A., McDonald, I.R. ve Murrell, J.C., (2004). Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikal soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing, *Environmental Microbiology*, **6**, 10, 1049-1060.
- Lu, Y., Lueders, T., Friedrich, M.W. ve Conrad, R., (2005). Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing, *Environmental Microbiology*, **7**, 3, 326-336.
- Lueders, T., Friedrich, M.W. ve Manefield, M., (2004a). Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients, *Environmental Microbiology*, **6**, 1, 73-78.
- Lueders, T., Pommerenke, B. ve Friedrich, M.W., (2004b). Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 10, 5778-5786.
- Mahmood, S., Paton, G.I. ve Prosser, J.I., (2005). Cultivation-independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil, *Environmental Microbiology*, **7**, 9, 1349-1360.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M. ve Tiedje, J.M., (2001). The RDP-II (Ribosomal Data Project), *Nucleic Acids Research*, **29**, 1, 173-174.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I. ve Bailey, M.J., (2002). RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 11, 5367-5373.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B. ve Costerton, J.W., (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 4, 1029-1039.
- McInerney, M.J. ve Wofford, N.Q., (1992). Enzymes involved in crotonate metabolism in *Syntrophomonas wolfei*, *Archives of Microbiology*, **158**, 5, 344-349.
- Plugge, C.M., (2005). *Anoxic media design, preparation and considerations*, in *Methods in Enzymology: Environmental Microbiology*, eds, Leadbetter J, Academic Press, 3-16, USA.
- Radajewski, S., Murrell, J.C., Ineson, P. ve Parekh, N.R., (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology, *Nature*, **403**(6770), 646-649.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D.S., Morris, S.A., Ineson, P., Nedwell, D.B., Prosser, J.I. ve Murrell, J.C., (2002). Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing, *Microbiology*, **148**, 8, 2331-2342.

- Roest, K., Altınbaş, M., Paulo, P.L., Heilig, H.G., Akkermans, A.D.L., Smidt, H., De Vos, W.M., ve Stams, A.J., (2005). Enrichment and detection of microorganisms involved in direct and indirect methanogenesis from methanol in an anaerobic thermophilic bioreactor, *Microbial Ecology*, **50**, 3, 440-446.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H.C. ve Albagnac, G., (1986). *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids, *Archives of Microbiology*, **145**, 2, 142-147.
- Schink, B. ve Friedrich, M., (1994). Energetics of syntrophic fatty acid oxidation, *FEMS Microbiology Reviews*, **15**, 2-3, 85-94.
- Stams, A.J.M., Van Dijk, J.B., Dijkema, C. ve Plugge, C.M., (1993). Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 4, 1114-1119.
- Stieb, M. ve Schink, B., (1985). Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacteria, *Archives of Microbiology*, **140**, 4, 387-390.
- Truper, H.G. ve Schlegel, H.G., (1964). Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae*. 1. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**, 1, 225-238.
- Wallrabenstein, C. ve Schink, B., (1994). Evidence of reversed electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophus buswellii*, *Archives of Microbiology*, **162**, 1-2, 136-142.
- Wu, W.M., Jain, M.K., Macario, E.C., Thiele, J.H. ve Zeikus, J.G., (1992). Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**, 2, 282-290.
- Zhang, C., Liu, X. ve Dong, X., (2004). *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens, *International Journal of Systematic and Bacteriology*, **54**, 3, 969-973.
- Zhang, C., Liu, X. ve Dong, X., (2005). *Syntrophomonas erecta* sp. nov., a novel anaerobe that syntrophically degrades short-chain fatty acids, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 799-803.
- Zhao, H., Yang, D., Woese, C.R. ve Bryant, M.P., (1990). Assignment of *Clostridium bryantii* to *Syntrophosphora bryantii* gen. nov., comb. nov. on the basis of a 16S rRNA sequence analysis of its crotonate-grown pure culture, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40**, 1, 40-44.
- Zhao, H., Yang, D., Woese, C.R. ve Bryant, M.P., (1993). Assignment of fatty acid-B-oxidizing syntrophic bacteria to *Syntrophomonadaceae* fam. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analyses, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**, 2, 278-286.
- Zou, B.Z., Takeda, K., Tonouchi, A., Akada, S. ve Fujita, T., (2003). Characteristics of an anaerobic, syntrophic, butyrate-degrading bacterium in paddy field soil, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 10, 2059-2067.