

Kâğıt endüstrisi atıksularında anaerobik mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi

Şükriye ÇELİKKOL^{1*}, Bahar KASAPGİL İNCE², Mustafa KOLUKIRIK^{1,3}, Zeynep ÇETECİOĞLU¹, Orhan İNCE¹

¹ İTÜ İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

² Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek, İstanbul

³ İTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Bu çalışmada, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan gerçek ölçekli bir anaerobik kontak reaktörün 3 farklı yüksekliğinden 2 farklı zamanda alınan çamur numunelerinin mikrobiyal komünite yapıları Denatüran Gradyan Jel Elektroferez (DGGE) yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. 2 aylık izleme dönemi içinde sistem 2 hafta süreyle bakıma alınmıştır. Kontak reaktörün 1.6-1.8 kg KOİ/m³.gün organik yükleme hızında, KOİ giderim verimi % 47-55, metan üretim verimi 0.18-0.20 m³CH₄/kgKOİ_{giderilen} aralığında değişmiştir. DGGE analizleri sonucu, arkeyal popülasyona ait 31, bakteriyel popülasyona ait 57 farklı tür tespit edilmiştir. Arkeyal popülasyona ait 3 farklı tür Ağustos 2005'te tespit edilememiş, buna karşın 6 yeni tür gözlenmiştir. Bakteriyel popülasyonda ise Temmuz 2005 numunesine ait 10 farklı tür Ağustos 2005 numunesinde tespit edilemezken Ağustos 2005'te 10 yeni türün varlığı gözlenmiştir. Bu çalışmada incelenen reaktöre ait asetoklastik metan üretim kapasitesi önceki bir çalışmada Spesifik Metan Aktivite (SMA) test düzeneği kullanılarak ölçülmüş ve potansiyel metan üretiminin yaklaşık % 45 azaldığı tespit edilmiştir. Sistemde bulunan metanojenlerin ve Sülfat İndirgeyici Bakterilerin (SRB) tür ve sayıları Floresanlı Yerde Hibritleme (FISH) yöntemi ile belirlenmiştir. SMA testi ve FISH tekniği ile tespit edilen mikrobiyal komünite değişimi DGGE yöntemi ile de doğrulanmıştır. DGGE yöntemi, iki farklı zamanda alınan numunelere ait komünite değişimini açıkça yansıtmakla birlikte sayısal değerlendirmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, anaerobik reaktörlerin mikrobiyal komünite yapılarının gerek DGGE gibi detaylı kalitatif sonuç veren gerekse FISH gibi mikroskopik sayıma dayalı, kültürden bağımsız yöntemlerle çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Denatüran gradyan jel elektroforezi, arkeyal popülasyon, bakteriyel popülasyon, anaerobik kontak reaktör, kâğıt endüstrisi atıksuları.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Şükriye ÇELİKKOL. celikkolsu@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 72 55.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Determination of the microbial community in pulp and paper mills effluents

Extended abstract

The use of anaerobic technologies in the fields of wastewater treatment, sludge stabilization, bioremediation and management of hazardous and solid wastes has grown in importance during the last few decades. Although the general processes occurring in anaerobic biological wastewater treatment plants, such as hydrolysis, fermentation, acetogenesis, methanogenesis and sulfidogenesis are well understood, the microbial community responsible for these conversions is often considered as a black box. Physical and chemical parameters only give rough estimations about the operational conditions of the system. Therefore, understanding the biodiversity and the dominant species of the microbial community is of great importance in studying contaminant degradation pathways, optimizing treatment processes, and improving removal efficiencies of engineer-designed systems.

The culture dependent methods used for the investigation of the biomass are not sufficient for the identification of the complex microbial diversity in wastewater treatment systems. The use of the culture-independent methods in microbial ecology allowed the determination of the complex microbial populations and community contents more representatively. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) is a Polymerase Chain Reaction (PCR) dependent method used for the electrophoretic separation of the 16S rDNA genes due to the difference in the nucleotide sequences. The separation is observed as an individual band on the DGGE gel. Every DGGE band represents a single species and the DGGE pattern gives the fingerprint of that community. Since DGGE technique allows the analysis of many samples simultaneously and gives rapid results, the use of DGGE is getting extensive in the investigation of bioreactors and natural ecosystems which inhabit rich microbial diversity.

In the context of this study, a full-scale anaerobic contact reactor treating pulp and paper mills effluents was investigated. Samples were taken from

3 different levels at 2 different times. There was a 2-week off-period of the reactor between sampling times. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was used for the fingerprinting of the microbial community in the sludge samples. Performance of the reactor in terms of COD removal efficiency and methane yield varied between 47% and 55% and 0.18 and 0.20 m³CH₄/kgCOD_{removed} at Organic Loading Rates (OLRs) in a range of 1.6-1.8 kg COD/m³day, respectively. DGGE analysis revealed that 31 species from archaeal population and 57 species from bacterial population were present in the anaerobic reactor. 3 species from the archaeal population were not detected in August 2005 whereas 6 species were newly observed. In bacterial population, 10 species belonging to July 2005 samples were not detected where 10 other species were found in August 2005.

Acetoclastic methanogenic activity of the reactor had previously been investigated by specific Methanogenic Activity (SMA) test. A decrease of 45% in the potential methane production was observed during the monitoring period of 2 months. The quantities and species of methanogens and Sulfate Reducing Bacteria (SRB) in the reactor were determined by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). Parallel to SMA results, the quantities of SRB and methanogens were decreased in August 2005. The shift in the microbial community observed by SMA test and FISH quantifications were supported by DGGE analysis. During the monitoring of 2 months, 2 weeks shut-down of the anaerobic reactor might have caused activity loss and microbial community change. DGGE allows the comparison of microbial communities taken from the anaerobic reactor at two different sampling times and FISH informs quantities of present microbial species in the reactor. However, DGGE does not give numerical information but clearly depicts the community shift. Therefore, it is concluded that, the microbial community structures of anaerobic reactors should be determined by culture independent methods of both qualitative and quantitative techniques such as DGGE and FISH respectively.

Keywords: *Denaturing gradient gel electrophoresis, archaeal population, bacterial population, anaerobic contact reactor, pulp and paper mills effluents.*

Giriş

Endüstriyel atıksuların anaerobik arıtımı son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır (Lettinga vd., 1980). Gerçek ölçekli arıtma tesislerinde, anaerobik reaktörün fiziksel ve kimyasal işletme koşulları optimum değerler arasında tutulmasına rağmen sistem performansının ve stabilitesinin sürekliliğinin sağlanmasında zorluklar yaşanabilmektedir. Sistem performansında ve stabilitesinde gözlenen değişimler, fiziksel ve kimyasal işletme parametrelerinin yanı sıra mikrobiyal komünite yapısının ve aktivitesinin de takip edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Gilbride vd., 2006). Anaerobik arıtma, fermentatif, asetojen ve metanojen mikroorganizmaların sintrofik ilişkilerine dayalı olarak gerçekleşen bir prosestir (Roest vd., 2005). Ayrıca, sülfat varlığında, sülfat indirgeyici bakteri (SRB) popülasyonları anaerobik sistemlerde asetojenlerle organik asitler ve etanol, metanojenlerle ise H₂, asetat ve metanol gibi karbon ve elektron kaynakları için yarış halindedirler (Stams vd., 2003). Farklı metabolik kapasitelere sahip mikrobiyal gruplar arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve dengede tutulması, anaerobik sistem performansının sürekliliğinin sağlanmasında büyük önem arz etmektedir.

Biyokütlenin incelenmesinde kullanılan kültüre dayalı yöntemler, atıksu arıtma sistemlerinde mevcut zengin mikrobiyal çeşitlilik sebebiyle yaygın olarak kullanılamamaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'na dayalı, kültürden bağımsız bir moleküler yöntem olan Denatüran Gradyan Jel Elektrofrezisi (DGGE), mikrobiyal ekolojide, farklı nükleotid dizilimlerine sahip 16S rDNA genlerinin elektroforetik olarak ayrılması amacıyla kullanılmaktadır. DGGE sonucu oluşan her bant, numunede bulunan bir türü temsil etmekte ve o numuneye özgü parmak izini vermektedir. DGGE ile birçok numunenin aynı anda analiz edilebilmesi ve hızlı sonuç alınabilmesi sebebiyle özellikle biyoreaktör ve ekosistem gibi zengin biyoçeşitliliğe sahip ortamların incelenmesinde yaygınlaşan bir yöntemdir (Muyzer ve Smalla, 1998).

Bu çalışmada, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan gerçek ölçekli bir anaerobik kontak reaktörün 3

farklı kademesinden (aşağıdan yukarı doğru 4 m, 8 m ve 12 m) 2 farklı zamanda alınan çamur numunelerinin arkeyal ve bakteriyel komünite yapıları DGGE yöntemi ile karşılaştırılmıştır. DGGE sonuçları, daha önceki bir çalışmada, SRB ve metanojenik *Arke* popülasyonlarının kompozisyonlarının, miktarlarının, ve aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan FISH ve Spesifik Metan Aktivite (SMA) testi sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Materyal ve yöntem

Anaerobik kontak reaktörün özellikleri

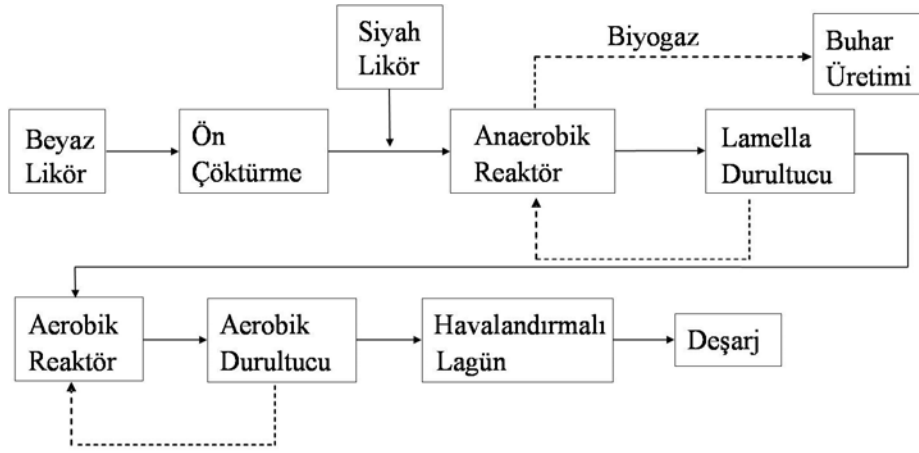
Şekil 1'de Kâğıt endüstrisine ait iki kademeli anaerobik-aerobik biyolojik atıksu arıtma tesisinin akım şeması verilmiştir. Tesis, iki kademeli anaerobik-aerobik biyolojik arıtma sistemine sahiptir. Anaerobik kontak reaktörün toplam hacmi 10000 m³ ve toplam yüksekliği 16 m'dir. Atıksu girişi anaerobik kontak reaktöre alttan besleme ile yapılmaktadır. Reaktördeki sıcaklık ve pH sırasıyla 34–37°C ve 6.4–7.5 değerlerinde tutulmaktadır. Alkalinite, 1300-1500 mg/L CaCO₃, COD:N:P oranı 176:5:1, hidrolik bekleme süresi (HBS) 4 gündür.

Atıksu özellikleri

Kâğıt endüstrisi atıksu arıtma tesisine beyaz ve siyah likör olmak üzere iki farklı içerikte atıksu gelmektedir. Kâğıt makinelerinden kaynaklanan beyaz likör, 7300–7900 mg/L aralığında KOİ değerine sahiptir. Tesisten 2000 m³/gün debiyle çıkan beyaz likör ön çöktürmeye maruz bırakılmaktadır. Saman kaynaklı siyah likörün KOİ değeri 11700–13300 mg/L aralığında değişmektedir. Siyah likör, 500 m³/gün debi ile çıkmakta ve ön çöktürmeye tabi tutulmamaktadır. Dengeleme tankında karıştırılan beyaz ve siyah likörler, 2500 m³/gün debi, 8200–9000 mg/L KOİ, 850–950 mg/L SO₄²⁻ ve pH 5.6-6.6 ile anaerobik reaktöre verilmektedir.

Genomik DNA ekstraksiyonu ve 16S rRNA genlerinin PCR ile çoğaltılması

DNA ekstraksiyonu için reaktörün 4 m, 8 m and 12 m yüksekliklerinden 2 farklı zamanda (3 Temmuz 2005 ve 21 Ağustos 2005) üç paralel numune alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Nu-



Şekil 1. Kâğıt endüstrisi atıksu arıtma tesisi akış diyagramı

mune alma tarihleri arasında iki hafta boyunca reaktör bakım amacıyla çalıştırılmamıştır.

Fast DNA Spin Kit for Soil (Qbiogene Inc., İngiltere) ekstraksiyon kitinin önerdiği protokole uygun olarak 0.2 mL çamur numunesinden genomik DNA çıkartılmıştır. Çıkartılan genomik DNA'dan *Arke* ve *Bakterilere* özgü 16S rDNAlar PCR ile çoğaltılmıştır.

PCR'da kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 1'de verilmiştir. Duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmak amacıyla, arkeyal ürünlerin çoğaltılmasında yuvalanmış PCR uygulanmıştır. Arkeyal 16S rDNA ilk olarak Arch46f ve Arch1017r primerleri ile çoğaltılmıştır. Çoğaltma, 50 μ L reaksiyon hacminde 200 ng DNA, 10 pmol primer çifti, 10 mM deoksinükleozit trifosfat, 1.5 mM MgCl₂, 5 μ L 10 \times *Taq* tampon çözeltisi ve 2U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Letonya) olacak şekilde gerçekleşmiştir.

Yuvalanmış PCR'ın ikinci aşamasında, ilk turda elde edilen PCR ürünleri kalıp olarak kullanmış ve arkeyal 16S rDNA'nın V3 bölgesini hedefleyen Arch344f-Univ522r primer çifti ile çoğaltılmıştır. Diğer PCR bileşenlerinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. PCR amplifikasyonu, Techne TC-412 (Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) marka PCR makinesinde, ilk denatürasyon 94°C'de 5 dak. olmak üzere 30 döngü denatürasyon 94°C'de 1 dak., bağlanma 1 dak., uzama 72°C'de 1 dak. ve son uzama 72°C'de 10 dak. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR

ürünleri, %1 (w/v) agaroz jelin 1 \times Tris–asetat–EDTA tampon çözeltisinde (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA; pH 8.0), 7 V cm⁻¹ de elektroforez (Thermo-Scientific Ltd., İngiltere) sisteminde yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanmış agaroz jel görüntüleri Chemi-Smart 3000 jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak kaydedilmiştir.

Denatüran gradyan jel elektroforezi (DGGE)

Arke ve *Bakterilere* ait komünite profilleri, Arch344f_GC-Univ522r ve Bact341f_GC-Bact534r primerleri (Muyzer vd.,1993) kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin DGGE analizleri yapılarak elde edilmiştir. 10 μ L PCR ürünü, yükleme boyası (distile suda %0.25 bromofenol mavisi, %0.25 ksilen siyanol FF, %15 Ficoll) ile karıştırılarak %10 poliakrilamid jelde (akrilamid–N,N'-metilenbisakrilamid oranı 37.5:1) 1 \times TAE tampon çözeltisi içinde (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA; pH 8.0) yürütülmüştür. Akrilamid jelde üre ve formamid kullanılarak %30-60 denatüran eşdeğeri kimyasal gradyan oluşturulmuştur (100% denatüran 7 M üre ve %40 (v/v) formamid içermektedir). Jellerin normalizasyonunu sağlamak amacıyla arkeyal ve bakteriyel klon kütüphanelerinden elde edilmiş 16S rDNA karışımından oluşan bir işaretleyici, jelin başına ve sonuna yüklenmiştir. Elektroforez, D-Code sistemi kullanılarak (Bio-Rad Laboratories Ltd., İngiltere) 200 V sabit akımda 60°C'de 4.5 saat boyunca devam etmiştir. Akrilamid jeller SybrGold (1:10000 seyrelti;

Tablo 1. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primer	Hedef	Deney aşaması	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Konum ¹	Kaynak
Bact341f_GC ² Bact534r	Bakteriyel 16S rDNA	DGGE	55	341–357 534–518	Muyzer ve diğerleri, 1993
Arch46f Arch1017r	Arkeyal 16S rDNA	Yuvalanmış PCR'ın ilk aşaması	40	46–61 1017–999	Øvreas ve diğerleri, 1997 Barns ve diğerleri, 1994
Arch344f_GC ² Univ522r		DGGE	53	344–358 522–504	Raskin ve diğerleri, 1994 Amann ve diğerleri, 1995

¹*Escherichia coli* numaralama sistemi.

²Arch344f ve Bact341f'e ait 5'-GC kuyrukları:

(GCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACGGGG).

Molecular Probes Inc., İngiltere) ile boyandıktan sonra Chemi-Smart 3000 jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülenmiştir.

Jel görüntüleri, Bionumerics 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belçika) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bantlar arasındaki benzerlikler (varlık - yokluk ve bant şiddeti) Dice katsayısı (S_D) kullanılarak hesaplanmıştır. Dice katsayısı kullanılarak yapılan analizlerde bant konum toleransı % 0.7 olarak uygulanmıştır.

Sonuçlar ve değerlendirme

Anaerobik kontak reaktörün performansı

Anaerobik kontak reaktörünün 1.6 - 1.8 kg KOİ/m³.gün aralığında değişen Organik Yükleme Hızında (OYH) 5 aylık izleme periyodundaki performansından % 47 - % 55 aralığında değişen KOİ giderim veriminin ve 0.18 - 0.20 m³ CH₄/kg KOİ_{giderilen} aralığındaki metan üretim veriminin sağlandığı görülmektedir. KOİ giderim verimi, literatürde kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik kontak reaktörler için verilen değer aralığının (% 40-80) alt sınırı içinde kalmakla birlikte (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999) metan verimi, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik reaktörler için literatürde verilen değerlerin (0.08-0.16 m³ CH₄/kg KOİ_{giderilen}) üstündedir (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). Anaerobik reaktöre uygula-

nan OYH aralığı, literatürde kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik kontak reaktörler için verilen değer aralığının (0.5-5 kg KOİ/m³.gün) alt sınırı içinde kalmaktadır (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). HBS, literatürdeki uygulamalarda 0.5-5 gün aralığında tanımlanmıştır (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). Kontak reaktörün çalıştırıldığı 4 günlük HBS literatürdeki başarılı uygulamalar için verilen değer aralığındadır. Reaktörde sıcaklık, pH ve KOİ/N/P oranı sırasıyla 34–37°C, 6.4–7.5 ve 176:5:1, optimum değer aralıklarında tutulmaktadır. 0.15–0.17 g KOİ/g UAKM. gün olarak uygulanan F/M oranı, anaerobik reaktörlere uygulanan 0.5–1 g KOİ/g UAKM. gün aralığındaki tipik F/M oranlarının oldukça altındadır (Speece, 1996). Anaerobik reaktörlerde, F/M oranının artırılmasının metan aktivitesi (Sponza vd., 2002) ve KOİ giderim verimi üzerinde olumlu etkileri olduğu daha önce rapor edilmiştir (Sponza vd., 2002; Ince vd., 1995; Ince vd., 2004; Baier ve Delavy, 2005).

Denatüran gradyan jel elektroforezi (DGGE) sonuçları

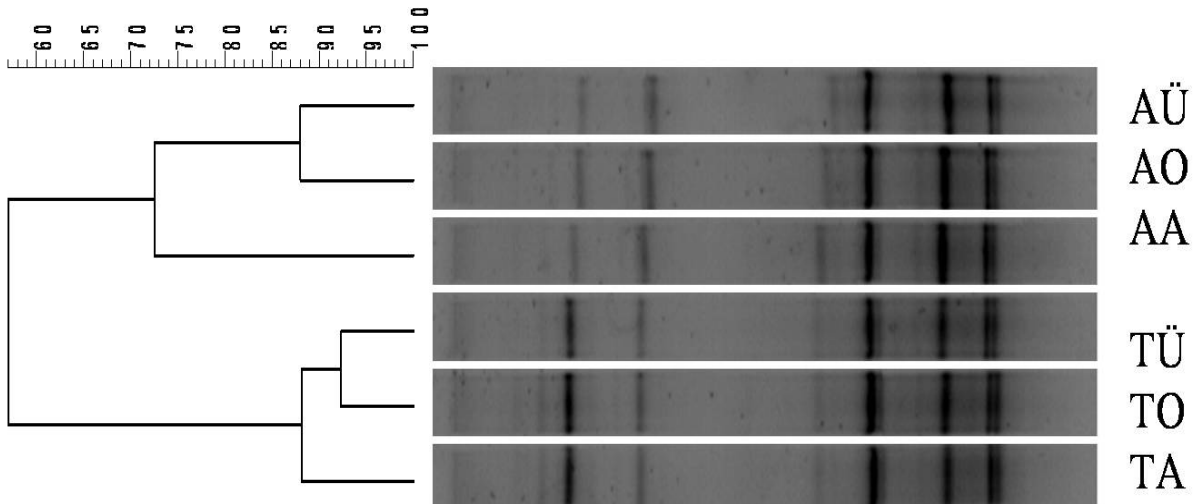
Anaerobik kontak reaktörün 3 farklı yüksekliğinden iki farklı zamanda alınan numunelere ait genomik DNA'lardan *Arke* ve *Bakteriler*e özgü 16S rDNA'lar PCR ile çoğaltılmış ve denatüran jelde yürütülmüştür. *Arke* ve *Bakteriler*e ait jel görüntüleri Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmektedir. Elde edilen görüntüler Bionumerics 5.0 yazılımı

(Applied Maths, Kortrijk, Belçika) ile normalize edilmiş, *Arke* ve *Bakteri* popülasyonlarına ait soy ağaçları çizilmiştir.

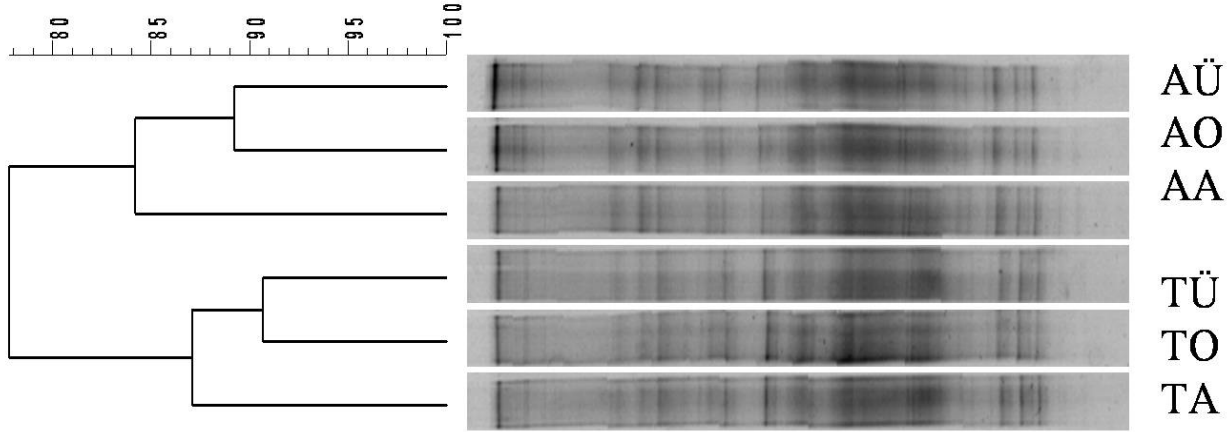
Şekil 2’de verilen *Arke* popülasyonuna ait soy ağacı, Temmuz ve Ağustos ayında alınan numunelerin % 50 benzerlikte olduğunu yani iki dönem arasında komünitede önemli bir değişiklik olduğunu göstermektedir. AÜ ve AO numuneleri % 88 benzerlikte kümelenirken AA numunesi AÜ ve AO’ya % 85.7 benzerlikte kümelmiştir. Temmuz ayında da TÜ ve TO numuneleri % 92.3 benzerlik göstermekte, TA numunesi TO ve TÜ’ye % 91.7 benzerlikte kümelmektedir. Değişen benzerlik oranları, hem reaktör yüksekliği boyunca hem de numune alma dönemleri arasında mikrobiyal komünitede farklılaşmalar olduğunu göstermektedir. Arkeyal DGGE jelinde tespit edilen 31 farklı bandın varlığı, reaktörden alınan numunelerde 31 farklı türün olduğunu göstermektedir. Bionumerics analizi sonucunda, Temmuz ayında rastlanan 3 farklı türe Ağustos ayında rastlanmadığı, buna karşılık, Temmuz ayında tespit edilemeyen 6 farklı türün Ağustos ayında tespit edilebildiği görülmüştür.

Şekil 3’te *Bakteri* popülasyonuna ait soy ağacı, Temmuz ve Ağustos 2005’te alınan numunelerin % 78.3 benzerlikte olduğunu göstermektedir.

Bu değişim *Arke* popülasyonuna oranla daha az olmakla birlikte iki dönem arasında bakteriyel komünitede önemli bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Ağustos ayında, reaktörün üst ve orta kısımlarından alınan AÜ ve AO numuneleri % 89.2 benzerlik gösterirken alt kısımdan alınan AA numunesi AÜ ve AO’ya %81.8 benzerlikte kümelmiştir. Temmuz ayı örneklerinde ise alt ve üst seviyelerden alınan TA ve TÜ numuneleri % 90.7 benzerlik göstermekte, orta seviyeden alınan TO numunesi TA ve TÜ ile % 86.5 benzerlikte kümelmektedir. Arkeyal komünitede olduğu gibi bakteriyel komünite yapısında da reaktör boyunca ve numune alma zamanları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bakteriyel DGGE jelinde toplam 57 farklı türü temsil eden 57 farklı bant tespit edilmiştir. Temmuz ayında rastlanan 10 farklı türe Ağustos ayında rastlanmamış, buna karşılık, Ağustos ayında 10 farklı tür tespit edilmiştir. Bant sayıları karşılaştırıldığında, *Bakteri* popülasyonundaki çeşitliliğin *Arke* popülasyonundaki çeşitlilikten daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, Ağustos 2005’te *Bakteri* popülasyonunda tespit edilemeyen tür sayısının *Arke* popülasyonunda tespit edilemeyen tür sayısından fazla olması, bakteriyel türlerin değişen işletme koşullarına daha duyarlı olduğu sonucuna varılabilir. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da elde edilmiştir (Buzzini vd., 2006).



Şekil 2. Arkeyal soy ağacı ve DGGE jel görüntüsü (Örnekler: AA: Ağustos, 4 m; AO: Ağustos, 8 m; AÜ, Ağustos 12 m; TA: Temmuz, 4m; TO Temmuz 8 m; TÜ: Temmuz, 12 m)



Şekil 3. Bakteriyel soy ağacı ve DGGE jel görüntüsü (Örnekler: AA: Ağustos, 4 m; AO: Ağustos, 8 m; AÜ, Ağustos 12 m; TA: Temmuz, 4m; TO, Temmuz 8 m; TÜ: Temmuz, 12 m)

İnce ve diğerleri (2007)'ne ait önceki bir çalışmada, anaerobik kontak reaktöre ait numunelerde potansiyel metan üretim (PMÜ) hızları Temmuz numuneleri için 280 mL CH₄/g UAKM.gün, Ağustos numuneleri için ortalama 160 mL CH₄/g UAKM.gün olarak bulunmuştur. Aynı örneklerde, FISH uygulanarak elde edilen hücre sayımları, numune alma yüksekliği arttıkça çamurun PMÜ hızının ve asetoklastik metanojenlerin toplam komünite içerisindeki miktarının paralel olarak azaldığını göstermektedir (İnce vd., 2007). Buna bağlı olarak, Temmuz ayında reaktörde bulunup Ağustos ayında kaybolan türlerin yüksek metan üretim potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Benzer şekilde, Temmuz ayında reaktörde olmayıp Ağustos ayında gözlenen türler düşük aktiviteyle ilgili türler olabilir.

Bu çalışmada, SMA testi ve FISH tekniği ile tespit edilen mikrobiyal komünite değişimi DGGE yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. DGGE yöntemi, yüksek ve düşük aktiviteye sahip mikrobiyal komünitelerin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. FISH yöntemi reaktörde mevcut aktif mikrobiyal türlerin miktarları hakkında bilgi vermesine rağmen, kompozisyondaki değişimi tespit etmede yeterli değildir. Bununla birlikte, DGGE yöntemi komünite bileşenlerinin sayısal değişimini yansıtmakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle anaerobik reaktörlerin mikrobiyal komünite yapılarının gerek DGGE gibi detaylı kalitatif sonuç veren gerekse FISH gibi mikroskopik sayıma dayalı sonuç ve-

ren kültürden bağımsız yöntemlerle birlikte çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın devamında, arkeyal ve bakteriyel DGGE jellerindeki baskın bantların kesilerek dizi analizlerinin yapılması, yüksek ve düşük aktiviteye sahip mikrobiyal komüniteye özgü türlerin tespit edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca, anaerobik kontak reaktördeki baskın türlerin ortaya çıkarılması, bu türlerin metabolizmaları hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Böylece, reaktörün işleyiş mekanizması kısmen çözümlenmiş olacak ve aktivite ile ilgili türlerin belirlenmesine olanak tanınacaktır.

Teşekkür

Orhan İnce ve Bahar Kasapgil İnce sırasıyla İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 11_04_241 ve 844 ve BÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 04Y105 ve 02Y103D kodlu projelere teşekkür ederler. Ayrıca Modern Karton A.Ş. ve Arbiogaz Çevre Teknolojileri A.Ş.'ye gösterdikleri işbirliği için teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Amann, R.I., Ludwig, W. ve Schleifer, K.H., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.
- Baier, U. ve Delavy, P., (2005). UASB treatment of liquid residues from grass bioraffination, *Water Science and Technology*, **52**, 405-411.

- Barns, S.M., Fundyga R.E. ve Jefferies M.W., (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone-national-park hot-spring environment, *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5, 1609-1613.
- Buzzini, A.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B. ve Pires, E.C., (2006). Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant, *Process Biochemistry*, **41**, 168-176.
- Gilbride, K.A., Lee, D.Y. ve Beaudette, L.A., (2006). Review: Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control, *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 1-20.
- Ince, O., Andersen G.K. ve Kasapgil, B., (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system, *Water Research*, **29**, 1, 345-355.
- Ince, O., Kolukirik, M., Ayman Oz, N. ve Kasapgil Ince, B., (2004). Comparative evaluation of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters in terms of performance and methanogenic activity, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 2, 138-144.
- Ince, O., Kolukirik, M., Cetecioglu, Z., Eyice, O., Tamerler, C. ve Kasapgil Ince, B., (2007). Methanogenic and sulphate reducing bacterial population levels in a full-scale anaerobic reactor treating pulp and paper industry wastewater using fluorescence in situ hybridization, *Water Science and Technology*, **55**, 10, 183-191.
- Muyzer, G. ve Smalla, K., (1998). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. ve Uitterlinden, A.G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3, 695-700.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L. ve Torsvik, V., (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 9, 3367-3373.
- Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E. ve Stahl D.A., (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 4, 1232-1240.
- Rincón B., Raposo, F., Borja, R., Gonzalez, J.M., Portillo, M.C. ve Saiz-Jimenez, C., (2006). Performance and microbial communities of a continuous stirred tank anaerobic reactor treating two-phases olive mill solid wastes at low organic loading rates, *Journal of Biotechnology*, **121**, 4, 534-543.
- Rintala, J.A., Jain, V.K. ve Kettunen, R.H., (1999). Comparative status of the world-wide commercially available anaerobic technologies adopted for biomethanation of pulp and paper mills effluents, *Proceedings, 4th International Exhibition and Conference on Pulp and Paper Industry*, 519-540, New Delhi, India.
- Roest, K., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., de Vos, W.M., Stams, A.J.M. ve Akkermans, A.D.L., (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater, *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 175-185.
- Savant, D.V., Abdul-Rahman, R. ve Ranade, D.R., (2006). Anaerobic degradation of Adsorbable Organic Halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater, *Bioresource Technology*, **97**, 9, 1092-1104.
- Speece, R.E., (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, Nashville, TN.
- Sponza, D.T., (2002). Tetrachloroethylene (TCE) removal during anaerobic granulation in an Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor, *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **37**, 213-236
- Stams, A.J.M., Elferink, S.J.W.H.O. ve Westerman, P., (2003). Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **81**, ed, Scheper, T., Springer-Verlag, 31-56, Heidelberg, Berlin.