

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**MEYVE, SEBZE ATIKLARINDAN KURU
FERMENTASYON İLE BİYOHİDROJEN ÜRETEN
MİKROBİYOTANIN BELİRLENMESİ VE
ÜRETİMDEN SORUMLU GENLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Cansu VURAL

Danışman: Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Doktora Programı

İzmir
2022

Cansu VURAL tarafından doktora tezi olarak sunulan “Meyve, Sebze Atıklarından Kuru Fermentasyon ile Biyohidrojen Üreten Mikrobiyotanın Belirlenmesi ve Üretimden Sorumlu Genlerin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 02/03/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR	
Raportör Üye	: Prof.Dr. Ataç UZEL	
Üye	: Prof.Dr. Özlem ABACI GÜNYAR	
Üye	: Prof.Dr. Hacı Halil BIYIK	
Üye	: Doç.Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Meyve, Sebze Atıklarından Kuru Fermentasyon ile Biyohidrojen Üreten Mikrobiyotanın Belirlenmesi ve Üretimden Sorumlu Genlerin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

02 / 03 / 2022

Cansu VURAL

ÖZET

MEYVE, SEBZE ATIKLARINDAN KURU FERMENTASYON İLE BİYOHİDROJEN ÜRETEN MİKROBİYOTANIN BELİRLENMESİ VE ÜRETİMDEN SORUMLU GENLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

VURAL, Cansu

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Mart 2022, 135 sayfa

Biyohidrojen, çoğunlukla çevresel organik atıklar kullanılarak üretilen en değerli enerji kaynaklarından biridir. Hidrojen verimliliğini mikrobiyolojik bir perspektiften analiz etmek için, bu değerli enerji kaynağının üretiminde rol oynayan potansiyel bakterilerin bilgisine oldukça gereksinim vardır. Bu tezde, karışık kültürlerin ve meyve-sebze atıklarının karanlık fermentasyonu ile biyohidrojen üreten üç farklı reaktörde ısı ön işlemin ve partikül boyutunun mikrobiyal dinamikler üzerindeki etkileri ve değişimleri incelenmiştir. Mikrobiyal profildeki değişiklikler, denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) ve operasyonel taksonomik birim (OTU) analizleri ile belirlenmiştir. *Clostridium* ve *Lactobacillus* genus üyelerinin yüksek oranda hidrojen üretimi olan reaktör örneklerinde baskın olduğu tespit edilmiştir. *C. butyricum* (%46,93) ve *L. fermentum* (%28,28) reaktör örneklerinde en yaygın türler olarak kaydedilmiştir. Ayrıca reaktör örneklerinde nispi potansiyel hidrojen üretici türlerinin tespiti için referans suşlar olan *C. butyricum* DSM-10702, *C. tyrobutyricum* DSM-2637 ve *C. pasteurianum* DSM-525 kullanılmıştır. Örneklerdeki tür analizleri kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR) ile gerçekleştirilmiştir. Hidrojen verimi en yüksek olan reaktörde bu türlerin gen kopya sayıları sırasıyla $1,23 \times 10^5$ DNA/mL, $1,95 \times 10^5$ DNA/mL ve $3,77 \times 10^4$ DNA/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca örneklerdeki [FeFe]-hidrojenaz (*hydA*) gen dizileri, temsili biyohidrojen üretici türler olarak *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum* ve *C. acetobutylicum* dizileri baz alınarak tasarlanan 4 farklı primer seti kullanılarak karakterize edilmiştir. Reaktör örneklerinde hidrojen üretimine aracılık eden önemli bir enzim olarak

bilinen *hydA* geninin karakterizasyonu ile, çevredeki mikrobiyal popölasyonlar arasındaki hidrojenaz evrimini anlamak için yeni bir pencere açıldığı düşünülebilir. *hydA* gen karakterizasyonu ile bağlantılı olarak, *hydA* kısmi gen dizilerinin filogenetik ilişkileri değerlendirilmiştir. *C. butyricum*'da bulunan *hydA* dizisi, aynı zamanda yüksek benzerlikle birlikte *C. saccharobutyricum*, *Clostridium sp.* ve *C. chromiireducens*'te de saptanmıştır. Öte yandan, *C. tyrobutyricum*'un *hydA* dizisinin *Clostridium sp.*, *C. kluyveri*, *C. acetobutylicum* ve *C. acidisoli*'deki *hydA* dizilerine yakından benzediği gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Biyohidrojen, DGGE, OTU, Real Time-PCR, filogenetik analiz, *Clostridium*, [FeFe]-hidrojenaz



ABSTRACT**DETERMINATION OF BIOHYDROGEN PRODUCING
MICROBIOTA BY DRY FERMENTATION AND
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GENES
RESPONSIBLE FOR PRODUCTION**

VURAL, Cansu

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

March 2022, 135 pages

Biohydrogen is one of the most valuable energy sources which is produced mostly using environmental organic wastes. Knowledge of potential bacteria which plays a role in the production of this valuable energy source is much needed to analyse the hydrogen efficiency from a microbiological perspective. In this thesis, the effects and changes of thermal pretreatment and particle size on microbial dynamics in three different reactors producing biohydrogen by dark fermentation of mixed cultures and fruit-vegetable wastes were examined. Changes in microbial profile were determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and operational taxonomic unit (OTU) analyses. The members of *Clostridium* and *Lactobacillus* genera were dominantly detected in reactor samples with a high level of hydrogen production. *C. butyricum* (46.93%) and *L. fermentum* (28.28%) were recorded were the prevalent species in these reactor samples. In addition, to detect relative potential hydrogen producer species in reactor samples, *C. butyricum* DSM-10702, *C. tyrobutyricum* DSM-2637 and *C. pasteurianum* DSM-525 which are the reference strains were used. The species analyses in samples were performed by quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). In the reactor with the highest hydrogen efficiency, the gene copy numbers of these species were calculated as 1.23×10^5 DNA/mL, 1.9×10^5 DNA/mL and 3.77×10^4 DNA/mL, respectively. Besides, [FeFe]-hydrogenase (*hydA*) gene sequences in samples were characterized

using 4 different primer sets based on the sequences of *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum* and *C. acetobutylicum* as representative biohydrogen producer species. It could be considered with the characterization of the *hydA* gene known as an important enzyme that mediates the hydrogen production in reactor samples has been opened a new window to figure out hydrogenase evolution among microbial populations in the environment. Linked to *hydA* gene characterization, the phylogenetic relationships of *hydA* partial gene sequences were evaluated. The *hydA* sequence found in *C. butyricum* was also detected in *C. saccharobutyricum*, *Clostridium sp.* and *C. chromiireducens* with high similarity. On the other hand, the *hydA* sequence of *C. tyrobutyricum* was observed as closely resembling the *hydA* sequences in *Clostridium sp.*, *C. kluyveri*, *C. acetobutylicum* and *C. acidisoli*.

Keywords: Biohydrogen, DGGE, OTU, Real Time-PCR, phylogenetic analysis, *Clostridium*, [FeFe]-hydrogenase

ÖNSÖZ

Son yıllarda azalan enerji kaynakları, CO₂ seviyesinin artması, sera gazı ve iklim değişiklikleri günümüz dünyasını olumsuz yönde etkilemektedir. Dünyamızın bu tehditlere karşı korunması için biz bilim insanlarına büyük görevler düşmektedir. Biyohidrojen; çevresel atıkların çeşitli mikroorganizmalar tarafından bozunmasıyla üretilen bir yenilenebilir bir enerji kaynağıdır. TÜBİTAK – MAG grubu tarafından desteklenen 215 M 314 no’lu "Kentsel Katı Atıkların Organik Fraksiyonlarından Biyohidrojen ve Biyokömür Üretimi" başlıklı proje yürütücülüğünü yapmış olan değerli hocam Prof.Dr. Nuri AZBAR ve değerli danışman hocam Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR’in uygun görmesi üzerine doktora tez çalışmalarımı bursiyeri olduğum bu proje kapsamında gerçekleştirmiş bulunmaktayım. Bu proje ile günümüzde mevcut çevresel sorunlara karşı geleceğin enerji taşıyıcısı olacak olan biyohidrojen enerjisiyle çevreci ve bütünleştirici bir yaklaşım getirilmiştir. Proje Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ve Biyoloji bölümleri ortaklığında yürütülmüştür.

Doktora tez çalışmalarımda değerli hocam Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR’in bilgi ve deneyimleri ışığında; biyohidrojen üretiminin mimarı olan mikroorganizmaların farklı işletim parametrelerindeki değişen profillerinin belirlenerek, üretim üzerindeki rollerini irdelemiş bulunmaktayım. Mikrobiyal dinamiklerin izlenmesinde birçok çeşitli moleküler araç kullanarak analizlerini gerçekleştirdim. Ayrıca bu tez çalışmasında; karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretiminde anahtar enzimlerin çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak tanımlanmasında yenilikçi bir yaklaşım da sunmaktayım. Çevre dostu enerji kaynağı olan biyohidrojenin üreticilerini tanılamak, metabolizmalarını irdelemek ve detaylı bilgi sahibi olmak; üretim verimliliğini arttırmak ve olumsuz yönde etkileyecek durumları aza indirmek için oldukça önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyim. Tez çalışmamda sunduğum verilerin bilime,

Ülkemize ve gelecek dünyamıza iyileştirici yönde çevresel ve ekonomik katkılar sağlayacağını umut etmekteyim.

Doktora tez çalışmalarım süresince beni destekleyerek gururlandıran TÜBİTAK 2211 C - Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ile BİDEB'e, TÜBİTAK 215 M 314 nolu proje ile TÜBİTAK'a ve YÖK 100/2000 Doktora Burs Programları ile YÖK'e teşekkürlerimi sunarım. Saygıdeğer danışman hocamın destekleri ve deneyimleri ile gerçekleştirdiğim bu tez çalışmam ile 'Doktor' ünvanını alıyor olmak benim için büyük bir mutluluk ve gurur kaynağı olacaktır.

İZMİR

02/03/2022

Cansu VURAL

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	xviii
2. GENEL BİLGİ	5
2.1 Biyohidrojen	5
2.1.1 Biyofotoliz	6
2.1.2 Fotofermentasyon	8
2.1.3 Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri (Elektrofermentasyon)	10
2.1.3 Karanlık Fermentasyon	13
2.2 Karanlık Fermentasyon ile Hidrojen Üretiminin Mikrobiyolojisi	20
2.2.1 Zorunlu Anaerobik Bakteriler	21
2.2.2 Fakültatif Anaerobik Bakteriler	22
2.2.3 Termofiller	24
2.2.4 Karışık Kültürler	25
2.3 Karanlık Fermentasyon ile Hidrojen Üretim Sürecinde Rol Oynayan Anahtar Enzimlerin Moleküler Biyolojisi	28
2.3.1 Format Hidrojen Liyaz (FHL)	28
2.3.2 Hidrojenaz	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Biyokütlenin Temini	34
3.2 Suşlar ve Kültür Ortamı	35
3.3 Total genomik DNA izolasyonu	36

3.4 Konvansiyonel PCR koşulları.....	37
3.5 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Belirlenmesi.....	38
3.5.1 DGGE analizi.....	38
3.5.2 Metagenom analizleri.....	39
3.6 Hidrojenaz Geninin Karakterizasyonu.....	41
3.6.1 Hidrojenaz Primerlerinin Tasarımı ve PCR Koşulları.....	41
3.6.2 Hidrojenaz Geninin Biyoinformatik Analizleri.....	43
3.7 Real-time PCR ile Kalitatif ve Kantitatif Analizler.....	43
3.7.1 İlgili Gen Bölgelerinin Alıcı Hücreye Klonlanması.....	43
3.7.2 Plazmid DNA İzolasyonu.....	45
3.7.3 Real-time PCR Koşulları.....	46
4. BULGULAR.....	49
4.1 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Belirlenmesi.....	49
4.1.1 DGGE Analizi Sonuçları.....	49
4.1.2 Metagenom Analizi Sonuçları.....	55
4.2 Real-Time PCR Analizlerinin Sonuçları.....	66
4.2.1 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait Real Time PCR analizi sonuçları.....	68
4.2.2 Otoklavlanmamış Küçük Partiküller Denemesi Real Time PCR Analizi Sonuçları.....	70
4.2.3 Otoklavlanmış Büyük Partiküller Denemesinde Real Time PCR Analizi Sonuçları.....	72
4.3 <i>HydA</i> Geninin Karakterizasyonu ve Analiz Sonuçları.....	73
5. TARTIŞMA.....	82
5.1. Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Değerlendirilmesi.....	82
5.2 Real Time – PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	96
5.3 Hidrojenaz Geninin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi.....	99
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	104

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	106
TEŞEKKÜR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	118



ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1 Fotosentetik mikroorganizmalarda doğrudan ve dolaylı biyofotoliz süreçleri	7
2.2. Fotosentetik bakteriler tarafından fotofermentatif hidrojen üretimi	9
2.3. Mikrobiyal elektroliz hücresi ile hidrojen üretiminin şeması.....	11
2.4. Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminin gerçekleştiği metabolik yol izleri.....	16
2.5 PFL ve PFOR metabolik yollarıyla hidrojen üretiminde rol oynayan olgunlaşma proteinleri	28
2.6 [FeFe]-hidrojenazların modüler domain yapısı	32
3.1 DGGE sistemi ve örneklerin kuyucuklardaki görünümü	38
4.1 Mezofilik Denemesi setlerinin DGGE jel bantlarının görüntüsü ve kesilen bantlar	50
4.2 DGGE bantlarından elde edilen sekans sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç.....	51
4.3 Reaktör örneklerinin toplam okuma sayıları ile bilinen ve bilinmeyen taksonomik seviyeleri	55
4.4 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen filum seviyeleri.....	56
4.5 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen sınıf seviyeleri.....	58
4.6 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen takım seviyeleri.....	59
4.7 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen aile (familya) seviyeleri.....	61
4.8 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen cins seviyeleri.....	62
4.9 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen tür seviyeleri.....	64
4.10 Metagenom analizi sonucunda reaktör denemelerinin örneklerine ait hiyerarşik kümelenmesi.....	65
4.11 <i>C. pasteurianum</i> gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği	67

4.12 <i>C. butyricum</i> gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği	68
4.13 <i>C. tyrobutyricum</i> gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği	68
4.14 Otoklavlanmış küçük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların gen kopya sayılarının karşılaştırılması	69
4.15 Otoklavlanmamış küçük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların gen sayılarının karşılaştırılması	71
4.16 Otoklavlanmış büyük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların sayılarının karşılaştırılması	73
4.17 <i>hydA</i> genine özgü primerlerle yapılan PCR analizi sonuçları	74
4.18 <i>C. butyricum</i> ’a ait <i>hydA</i> gen bölgesinin benzerliklerini ve ilişkilerini gösteren aminoasit dizilerinden oluşturulan filogenetik ağaç	75
4.19 <i>C. tyrobutyricum</i> ’a ait <i>hydA</i> gen bölgesinin benzerliklerini ve ilişkilerini gösteren aminoasit dizilerinden oluşturulan filogenetik ağaç	76
4.20 <i>C. butyricum hydA</i> gen bölgesinin aminoasit dizilerinin yakın benzerlikte olan <i>Clostridium</i> türleriyle çoklu hizalanması	78
4.21 <i>C. tyrobutyricum hydA</i> gen bölgesinin aminoasit dizilerinin yakın benzerlikte olan <i>Clostridium</i> türleriyle çoklu hizalanması	80

TABLÖLAR DİZİNİ

2.1 Biyohidrojen Prosesleri ve Avantajları – Dezavantajları	19
2.2 Zorunlu Anaerobik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri	22
2.3 Fakültatif Anaerobik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri	24
2.4. Termofilik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri	25
2.5. Karışık Kültür Kullanılarak Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri	27
3.1 Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM)	35
3.2 Mikrobiyal yapı belirlemede DGGE analizleri için kullanılan primer setleri	37
3.3 Mikrobiyal profil belirlemede metagenom analizleri için kullanılan primer setleri	40
3.4 <i>hydA</i> geninin karakterizasyonunda kullanılan primer setleri ve PCR koşulları	42
3.5 pGEM-T Easy protokolü ligasyon reaksiyonları	44
3.6 Real-time PCR için kullanılan primer setleri	47
3.7 Real-time PCR çalışmalarında kullanılan primer setlerinin protokolleri	48
4.1 Mezofilik Denemesi Setlerinde DGGE Bantlarının Örnek Kaynakları	50
4.2 NCBI veri tabanındakilerin Accession numaraları, Genbank % benzerlikleri ve reaktör örneklerinde bulunma durumları	51
4.3 Metagenom analizleri yapılan reaktör örnekleri, çalışma kod isimleri ve hidrojen çıkışları	55
4.4 Her bir taksonomik basamağa atanabilen okumaların sayısı	56
4.5 Reaktör denemelerinde örneklere ait her bir türün Shannon, Simpson ve Inverse Simpson endeksleri ve tespit edilen türlerin sayısı	66
4.6 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif sonuçları ve T _m dereceleri (°C)	68
4.7 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı DNA/mL)	69

4.8 Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif sonuçları ve T _m dereceleri (°C).....	70
4.9 Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı/mL).....	71
4.10 Otoklavlanmış büyük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve T _m dereceleri (°C)	72
4.11 Otoklavlanmış büyük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı/mL).....	72
4.12 PCR sonuçlarını özetleyen amplifikasyon tablosu.....	74



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
V	Volt
Nm	Nano metre
Ng	Nano gram
M	Mol
 <u>Kısaltmalar</u>	
DGGE	Denatüre Edici Gradian Jel Elektroforezi
OUT	Operasyonel Taksonomik Birim
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif Real-Time PCR
PFOR	Pirüvat ferredoksin redüktaz
NFOR	NADH ferredoksin oksiredüktaz
PFL	Pirüvat format liyaz
FHL	Format hidrojen liyaz
FDH-O	Format oksiredüktaz
FDH-N	Format dehidrojenaz
KF	Kuru fermentör
PT	Perkolasyon Tankı
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
Fd	Ferredoksin
red	Redüksiyon
oks	Oksidasyon
hyd	Hidrojenaz enzimi
hydA	[FeFe]-hidrojenaz enzimi
Tm	Erime Sıcaklığı
TAE	Tris-asetat-EDTA
RDP	Ribozomal veritabanı projesi
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
LB	Luria-Bertani besiyeri ortamı
DRCM	Diferansiyelle Güçlendirilmiş <i>Clostridial</i> sıvı besiyeri
SOC	Katabolit baskılamalı süper optimal sıvı Besiyeri

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı ve ekonomisinin sürekli büyümesiyle birlikte, enerjiye olan gereksinimler de hızla artış göstermektedir. Bu enerji gereksiniminin fosil yakıtlar ile karşılanması dünya genelinde atmosferimizdeki CO₂ ve sera gazı seviyelerinde bir artışa ve bunun sonucunda küresel ısınmaya sebep olmaktadır. Uzun yıllar boyunca fosil yakıtların kullanımı; mevcut kaynakların sınırlı hale gelmesine, artan petrol fiyatlarına, çevresel bozulmalara ve iklim değişikliklerine yol açmaktadır. Enerji talebinin karbondan arındırılması amacıyla gelecekteki enerji sürdürülebilirliği ve küresel güvenlik için alternatif temiz, sürdürülebilir ve yenilenebilir enerji kaynakları önerilmektedir (Hallenbeck, 2008; Azbar vd., 2009a; Mohan and Pandey, 2019; Dawood et al., 2020). Yenilenebilir enerjinin toplam enerji içindeki yeri çok fazla olmasa da, geçtiğimiz yıllarda enerjideki artışın yaklaşık üçte birini oluşturduğu bildirilmektedir. İlerleyen yıllarda; güneş, rüzgâr, biyokütle, biyoyatıklar ve jeotermal enerjileriyle yenilenebilir enerjiden yararlanılmasına tanık olunacağı öne sürülmektedir (Mohan and Pandey, 2019). Çeşitli biyoyakıtlar günümüzde önemini arttırmaktadır ve hali hazırda araştırılmaya devam edilmektedir. Bu biyoyakıtların mikroorganizmaları kullanarak üretilmesiyle; enerji ve çevresel problemlere aynı anda çözüm sağlaması ilgi çekici bir yaklaşım olmaktadır (Lan ve ark., 2012). Yenilenebilir enerji kaynaklarından biyohidrojenin de bu problemlere yanıt olabileceği ve günümüz petrol benzeri yakıtların yerine geçeceğine yönelik düşüncelerden dolayı olağanüstü bir şekilde ilgi görmektedir. Enerji bakımından hidrojen; elektrik, yakıt ve ısı gibi alanlarda kullanılabilir. Hidrojen, bozulmasıyla birlikte hiçbir kirlenici madde üretmemesi ve karbon nötr olması gibi birtakım avantajlara sahiptir (Hallenbeck, 2008 ve Kumar et al., 2018). Verimli bir biyohidrojen üretimi için mikrobiyal üretim süreçlerinin, mikrobiyal toplulukların yapısının ve ekosistem üzerindeki işlevleri arasındaki karmaşık ilişkilerin aydınlatılması gerekmektedir.

Biyohidrojen üretim şekilleri mikrobiyal topluluklara ve onların taleplerine uygun sistemlere göre değişiklik göstermektedir. Bu üretim şekilleri; siyanobakteri ve yeşil alglerle doğrudan ve dolaylı biyofotoliz, fotosentetik bakterilerle fotofermentasyon, anaerobik ve fakültatif bakterilerle karanlık fermantasyon ve mikrobiyal yakıt hücreleridir. H₂ üreten bu biyoteknolojik yöntemler arasında, karışık kültürlerle birçok farklı organik madde türünü ve özellikle atık akımlarının karanlık fermantasyonuyla yüksek verimlerde hidrojen elde edebilme yetenekleriyle son birkaç yılda oldukça ilgi görmektedir (Cabrol et al., 2017 ve Lazrol and Hallenbeck, 2019). Karışık kültür kullanılarak gerçekleştirilen fermentatif hidrojen üretiminde karşılaşılan en büyük sorun, aynı ortamda hidrojen tüketen (metanojenler) mikroorganizmaların da bulunmasıdır (Duangmanee et al., 2007, Kapdan ve Kargı, 2006). Bu sorun birçok çalışmada ısı ön işlem uygulanarak çözülmüştür ve spor oluşturmayan H₂ tüketen mikroorganizmalar inaktive edilmiştir. Isıl ön işlem uygulamaları sonucunda *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerinden H₂ üreten sporlu bakteriler baskın hale gelebilmektedir. Ancak; işletim süreci boyunca değişen pH, substrat yapısı ve sıcaklık gibi etmenlerle mikrobiyotanın kararlı kalması mümkün değildir. Sürdürülebilir biyohidrojen üretimi için mikrobiyotadaki değişimlerin sürekli izlenmesi gerekmektedir. Mikrobiyotanın belirlenmesi çalışmaları, kültür bağımlı ve kültür bağımsız teknikler olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Kültür bağımlı çalışmalar çoğunlukla kültüre edilebilen mikroorganizmaların tanımlanmasına ve bu mikroorganizmalarla çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Doğada bulunan mikroorganizmaların çok küçük bir kısmının izole edilebilmesinden dolayı kültür bağımsız tekniklerin kullanımı biyokütle üyelerinin belirlenmesi ve mikrobiyal dengenin gözlemlenmesi açısından çoğunlukla daha önemli sonuçlar vermektedir. Kültür bağımsız yöntemlerde temel olarak mikroorganizmaların DNA ve RNA molekülleri ile çalışılması çok çeşitli mikroorganizmalara erişmeyi kolaylaştırmaktadır (Edgar, 2018). Mikrobiyal dinamiklerin ve popülasyon profillerinin belirlenmesinde kullanılan moleküler biyolojik yöntemler bakteri türlerinin hızlı bir şekilde saptanmasına olanak tanır ve kültüre edilemeyen türlerin saptanması için başarıyla uygulanabilir. Mevcut mikrobiyal topluluğun genetik çeşitliliği ve

zamanla mikrobiyal topluluk yapısındaki değişikliklerin profili hakkında bilgi sağlar.

Karanlık fermentasyon ile mikrobiyal topluluğun atıkları kullanmasıyla uçucu yağ asitleri ve hidrojen gazı gibi çeşitli son ürünler üretilmektedir. *Clostridia* tarafından fermentatif hidrojen üretimi, elektron transfer zincirlerinden pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz (PFOR), NADH:ferredoksin oksidoredüktaz (NFOR) ve hidrojenaz tarafından pirüvatın anaerobik metabolizmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojenaz moleküler hidrojenin tersinir oksidasyonunu katalize eder ve enerji metabolizmasında önemli rol oynar. H₂ üreten mikroorganizmalarda anahtar fonksiyonel enzimdir. Aktif bölgelerindeki metal merkezlerinin yapısına göre [NiFe]-hidrojenaz (bakteri ve arkeler), [FeFe]-hidrojenaz (bakteri ve ökaryotlar) ve [Fe]-hidrojenaz (bazı hidrojenotrofik metanojenik arkeler) üç gruba ayrılır (Jo et al., 2009; Zhao et al., 2019). Hidrojenazlar; fazla indirgeyici eşdeğerlerin atılması, hidrojen seçiciliği, iyon yer değiştirmesi ve indirgeyici eşdeğerlerin üretildiği önemli bir yöntem olan H₂'yi oksitleme gibi birçok işlevi sağlamasıyla karakterize edilmiştir. Bu işlev çeşitliliği hidrojenazların; metanojenler, sülfat azaltıcılar, nitrojen sabitleyiciler ve fotosentezleyiciler gibi çeşitli metabolizmalarda kritik bir rol oynamasına izin vermektedir. Biyohidrojen üretiminin veya anaerobik ortamların mikrobiyal topluluğu hakkında daha derinlemesine bilgi sahibi edinmek adına yapılan çalışmaların yalnızca 16S rRNA genine dayalı dizileme yeterli görülmemektedir. Bunun yanı sıra; birçok yönden işlevsel olan hidrojenaz enziminin ilgili alt grubuna ait geninin tanımlanmasına da ihtiyaç duyulmaktadır (Therien et al., 2017; Zhao et al., 2019).

Tez çalışması ile maksimum verimde karanlık fermentasyon ile temiz hidrojen üretiminden sorumlu mikrobiyal topluluğun incelenmesi ve hidrojen metabolizmasında aktif olarak görev alan enzimleri kodlayan gen/genler için gerekli temel bilgilerin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Biyohidrojen üretiminden sorumlu biyokütle; 215M314 nolu TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Biyoteknolojisi ve Biyoenerji Laboratuvarında çalışılan reaktör deneme

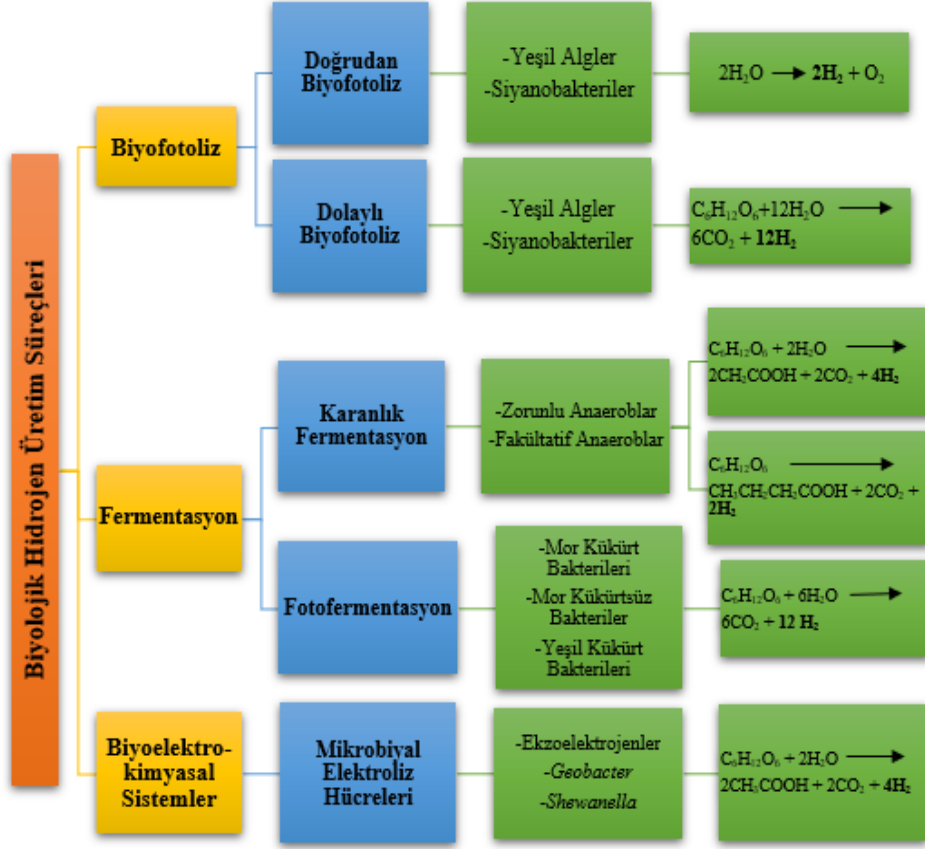
setlerinden temin edilmiştir. Reaktör düzeneği; 15 L hacimli bir perkolasyon tankı ve 55 L hacimli kuru fermentör yeni ve özgün bir yaklaşımdır (Abubackar vd., 2019). Mezofilik koşullar altında gerçekleştirilmiş olan üç farklı reaktör denemesinde ısı ön işlem ve parçacık boyutunun mikrobiyal dinamik üzerindeki etkileri ve değişimleri irdelenmiştir. Biyokütle mikrobiyotasının izlenmesi ile farklı koşullarda aktif olarak iş gören mikroorganizma grupları ve bu grupları oluşturan üyelerin miktarının moleküler yöntemler (denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) ve operasyonel taksonomik birim (OTU) ile tespiti yapılmıştır. Bu tür moleküler yöntemler; karanlık fermantasyon yoluyla biyohidrojen üretimi için potansiyel biyokatalizörler olarak iş gören mikrobiyal topluluğun uygun şekilde tanımlanmasına ve karakterizasyonuna yardımcı olmuştur. Kültür bağımsız tekniklerden 16s rRNA kodlayan değişken DNA bölgelerinin analizine imkan sağlayan OTU analizi kullanılarak mikrobiyotanın profili ve dağılımı son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında, Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) tekniğiyle de hem kalitatif hem de kantitatif analizler yapılmaktadır. OTU verileriyle bu tez çalışmasında kuru fermentasyon reaktör sisteminden alınan örneklerde DGGE ile belirlenemeyen kültüre edilemeyen mikroorganizma grupları tespit edilerek belirlenmiştir. Ayrıca; tez çalışması kapsamında hidrojen metabolizmasında aktif olarak görev alan enzimleri kodlayan genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için hidrojen üretiminde görev alan enzimler ve bu enzimleri kodlayan genler belirlenerek; çeşitli veri tabanları kullanılarak biyoinformatik analizler ile bu genlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu tez çalışması ile; mikrobiyal profilin belirlenmesinde, kantitatif olarak nicelendirilmesinde ve ilgili genlerin karakterizasyonunda kullanılan moleküler araçların detaylı bir şekilde değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu sayede gelecekteki araştırmalara; doğru işlevde mikrobiyal ve moleküler analiz aracını belirlemek için değerli bilgiler vererek ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Biyohidrojen

H₂ ilk olarak doğal olmayan yollarla 1627-1691 yılları arasında Robert Boyle tarafından demir ve asit arasındaki bir reaksiyon ($\text{Fe} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{Fe}_2^{+} + \text{SO}_4^{-2} + \text{H}_2$) yoluyla üretilmiştir. Henry Cavendish tarafından 1766'da H₂ gazını ayrı bir element olarak tanılamıştır ve gazın asit yerine metalden çıktığını düşünerek “yanıcı hava” veya “su oluşturuçu” olarak adlandırmıştır. Antoine Lavoisier tarafından 1783'te bu elemente Yunancada su anlamına gelen "hidro" ve biçimlendirme anlamına gelen "genler" kelimeleriyle türettiği "hidrojen" adını vermiştir. Son olarak, 1939'da Hans Gaffron tarafından yapılan çalışmada gölet pisliklerinde bulunan *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alglerinin zaman zaman oksijeni üretirken günümüzde biyohidrojen olarak adlandırdığımız hidrojene dönüştürdüğünü fark etmiştir (Mohan and Ashok, 2019; Abdin et al., 2020).

Biyohidrojen; mikroorganizmalar tarafından ışıklı ya da ışısız ortamlarda gerçekleştirilen çeşitli biyokimyasal reaksiyonların geçici ve doğal bir yan ürünüdür. Son yıllarda yapılan araştırmalar hem temel hem de uygulamalı alanlarda H₂ üretiminin biyolojik yollarına önemli derecede ilgi göstermiştir (Mohan and Pandey, 2019). Genel olarak biyohidrojenin avantajları; uygun sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilebilmesi, yenilenebilir enerji kaynaklarını (güneş, rüzgar, su, biyokütle) kullanma olanağı sağlaması, çevre kirliliğine yol açmaması ve üretimi esnasında organik atıkların kullanılması nedeniyle ekonomik; önemli yan ürünlerin oluşması olarak sayılabilir (Hawkes et al., 2002; Das ve Veziroğlu, 2001, Azbar vd., 2009b). Biyohidrojen üretimi için termokimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik süreçlerle; doğrudan ve dolaylı biyofotoliz, fotofermentasyon, karanlık fermantasyon, hibrit sistemler ve mikrobiyal yakıt hücreleri gibi mekanizmaları içeren üretim yolları mevcuttur (Şekil 2.1).

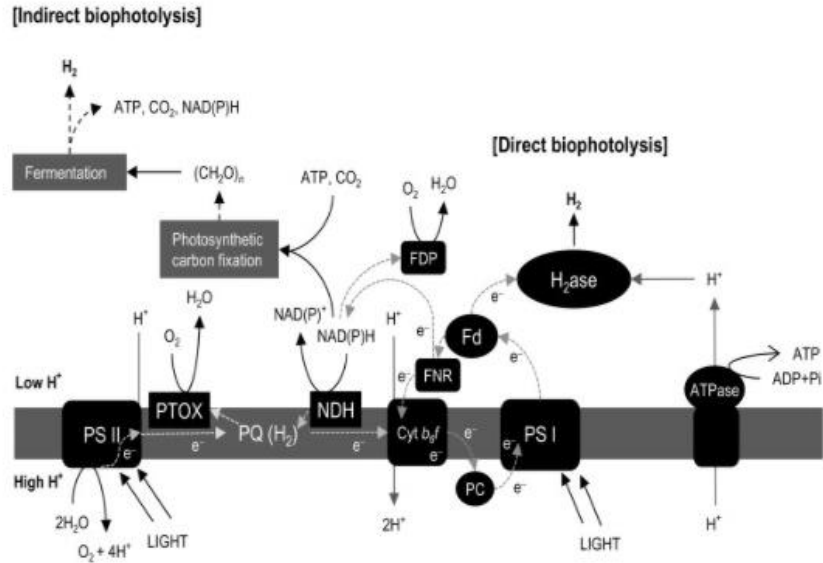


Şekil 2.1 Biyolojik hidrojen üretim süreçlerinin genel şeması

2.1.1 Biyofotoliz

Biyofotoliz; oksijenli fotosentez gerçekleştiren, güneş enerjisini yakalayan ve proton indirgeme ile su bölünmesini birleştiren organizmalarla, doğası gereği en çekici olan biyohidrojen üretim sürecidir. Bu süreç birçok teorik avantajlara sahiptir. Ancak bunu başarıyla kullanmanın ve pratik bir sistem oluşturmamanın önünde önemli engeller bulundurmaktadır. Biyofotolitik süreçler doğrudan ve dolaylı olarak iki gruba ayrılır. Doğrudan biyofotolizde, yeşil algler ve siyanobakteriler gibi fotosentetik mikroorganizmalar hücre büyümeleri için 400-700 nm güneş ışığını yakalayıp; depolarlar. Depolanan güneş ışığı ile birlikte suyun parçalanmasıyla elektronlar, fotosistem II (PSII) ve fotosistem I (PSI) aracılığıyla enerjide ferrodoksine (Fd) yükseltgenir (Şekil 2.2). Fd, daha sonra hidrojenaz enzimi tarafından $NADP^+$ 'nın H_2 üretiminden sorumlu olan $NADPH$ 'ye indirgenmesi için kullanılır (Lazaro and Hallenbeck, 2019; Eroğlu ve Melis, 2011; Tsygankov, 2012; Osman et al., 2020). Dolaylı biyofotolizde ise; fotosentez güneş enerjisini

karbonhidrata dönüştürmek ve hidrojen üretmek için kullanır (Şekil 2.2). Güneş enerjisinin bir kimyasal enerji biçimi olarak karbonhidratlara iki aşamalı fotosentetik dönüşümünü içerir. İlk aşamada; ışık enerjisini kullanarak, N_2 'yi indirgenmesiyle O_2 ve karbonhidrat üretilir. İkinci aşamada ise; daha az O_2 ile anaerobik bir koşulda karbonhidratın ışık enerjisi ile CO_2 ve H_2 'ye dönüştürülür (Osman et al., 2020). Şekil 2.2'de doğrudan ve dolaylı biyofotolizin süreçlerini ifade eden görselde gri çubuk, tilakoid zarın lipid çift katmanını temsil etmektedir. Elektron transferleri ve yönleri gri noktalı oklarla gösterilmektedir. Siyah kesikli çizgilerle çoklu reaksiyonlar gösterilmektedir. ATPaz: ATP sentaz; Cyt b₆f: sitokrom b₆f kompleksi; Fd: ferredoksin; FDP: flavodiiron proteini; FNR: ferredoksin NAD(P)⁺ redüktaz; H₂az: hidrojenaz; NDH: NAD(P)H dehidrojenaz; PC: plastosiyanin; PQ: plastokinonlar; PS: fotosistem; PTOX: plastid terminal oksidaz kısaltmalarını ifade etmektedir (Oh et al., 2010).



Şekil 2.2 Fotosentetik mikroorganizmalarda doğrudan ve dolaylı biyofotoliz süreçleri (Oh et al., 2010)

İki farklı biyofotoliz yoluyla hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir. Heterosistöz siyanobakteriler ve yeşil alglerden *Chlamydomonas*'ın kültürleriyle hidrojen üretimi üzerine çalışmalar mevcuttur. Heterosistöz siyanobakterileri nitrojenaz enzimiyle hidrojen üretimini gerçekleştirmektedirler. Heterosist ve oksijenik fotosentezde hidrojenin

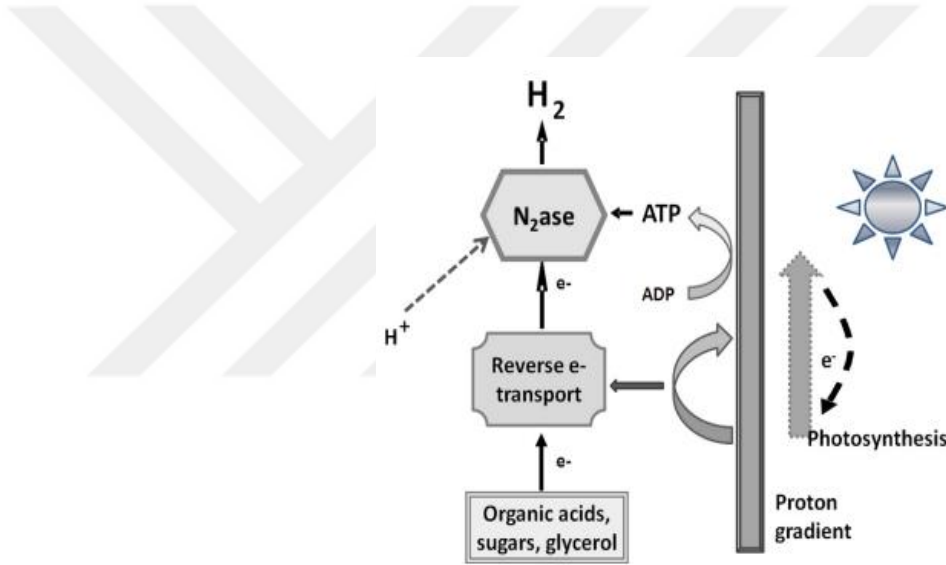
vegetatif hücrede CO₂ fiksasyonu ile birlikte elde edilmektedir. Burada üretimden sorumlu olan katalizör nitrojenaz; doğal olarak oksijen inaktivasyonundan korunmaktadır (Lazaro and Hallenbeck, 2019). Kossalbayev et al. (2020); *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Phormidium corium* B-26 ve *Synechococcus* sp. I12 siyanobakteri suşlarından hidrojen verimlerini değerlendirmişlerdir. 120 saat boyunca karanlıkta *Synechocystis* sp. PCC 6803'ün 0,037 µmol H₂/mg verimle yüksek bir H₂ üretimi gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. 166 saat boyunca ışık altında inkübe edilen *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220'nin 0,229 µmol H₂/mg verimle H₂ ürettiği bildirilmiştir (Kossalbayev et al., 2020).

Chlamydomonas gibi yeşil algler de ise; H₂ üretim süreçleri [FeFe]-hidrojenaz tarafından gerçekleştirilir. Kùltürler özel koşullar altında inkübe edilmedikçe yeşil alglerin [FeFe]-hidrojenazı fotosentetik olarak üretilen oksijen hızla etkisiz hale getirir. Teorik olarak hidrojen üretimi asetatla büyüyen hücrelerin kükürtsüz ortamda inkübasyonu ile elde edilirken; fotosentetik reaksiyonlarda ciddi bir düşüşe sebebiyet sağlar. Asetat varlığında artan solunum ile yüksek oranda azalan oksijen, kùltürün anaerobik duruma geçmesine sebep olur (Lazaro and Hallenbeck, 2019). Dolaylı biyofotoliz proseslerindeki en önemli sınırlayıcı etken; üretilen oksijenin [FeFe]-hidrojenaz enzimi üzerine kuvvetli bir inhibe edici etkisidir. Ek olarak; bu proseslerde hiçbir atığın kullanılması ve düşük hidrojen üretim verimleri de diğer dezavantajlarıdır (Dange et al., 2021).

2.1.2 Fotofermentasyon

Işık enerjisinin yakalanmasını ve dönüştürülmesini içeren başka bir hidrojen üretim süreci de fotofermentasyondur. Bu süreçte; fotosentetik mor kükürt ve kükürtsüz bakterileri çeşitli substratları H₂ ve CO₂'e ayrıştırır (Şekil 2.3). Nitrojenaz enzimi tarafından hidrojen üretimi gerçekleştirilir (Lazaro and Hallenbeck, 2019; Osman et al., 2020). Organik maddeler, biyoatıklar ve organik asitler gibi çeşitli substratları parçalayabilen fotoheterotrofik mor kükürtsüz bakteriler (*Rhodobacter*, *Rhodobium*, *Rhodopseudomonas* ve

Rhodospirillum suşları) yaygın olarak fotofermentasyon ile H_2 üretimi gerçekleştiren organizma grubudur (Monroy and Buitrón, 2020). Doğal olarak ortamda bulunan bu fotosentetik bakteriler; geniş bir ışık spektrumu aracılığıyla çok çeşitli substratları H_2 'e indirgeyebilir. Fotofermentasyonun biyofotolizden ayıran en önemli fark; fotosistem II'nin bulunmaması ve bundan dolayı H_2 üretimini inhibe eden O_2 'i üretmemesidir (Ferraren-De Cagalitan and Abundo, 2021). Ancak; fotosentetik bakteriler nitrojenaz ile H_2 üretirken N_2 üretirler ve bunun kontrol altında tutulması gerekir. Yüksek N_2 üretimi ve birikimi H_2 üretimini azaltabilir. Ayrıca; yeterli ışık enerjisi ve atık içerisinde ki ışık akışının olmadığı durumlar da H_2 üretimini olumsuz yönde etkilemektedir (Boodhun et al., 2017).



Şekil 2.3. Fotosentetik bakteriler tarafından fotofermentatif hidrojen üretimi (Lazaro and Hallenbeck, 2019)

Şekil 2.3'te mor kükürtsüz bakterilere ait hidrojen üretim yolu Lazaro and Hallenbeck (2019) tarafından düzenlenen resim ile gösterilmektedir. Organik bileşikler özümşenerek biyokütle sentezi için kullanılmaktadır. Substratlar, biyokütleyi indirgeyici eşdeğerlerin (NADH) redoks durumundan daha fazla indirgenmişse; büyümenin devam edebilmesi için devre dışı bırakılmalıdır. Bu da; nitrojen sınırlama koşulları altında ifade edilen protonları hidrojene indirgeyen nitrojenaz ile gerçekleştirilir. Bakteriyel fotosentez, yakalanan ışık enerjisini bir proton gradyanına dönüştürerek nitrojenaz aktivitesi için gereksinimleri iki şekilde

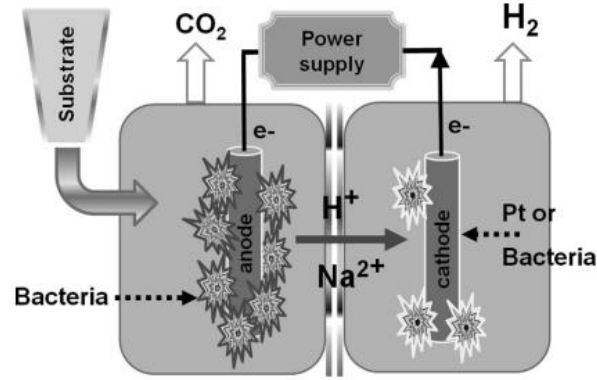
desteklemektedir. Hem ATP sentezi hem de nitrojenaz aktivitesi için ihtiyaç duyulan ters elektron akışı tarafından üretilen indirgenmiş ferrodoksin, bu proton gradyanından üretilmektedir (Lazaro and Hallenbeck, 2019).

Son yıllarda çalışmalar yüksek verimli şekerlerden ve atık gliserolden tek aşamayla direkt olarak hidrojen üretiminin gerçekleştirildiğini göstermektedir. Cai and Wang (2014); *Rhodovulum sulfidophilum* P5 suşunun 30 °C'lik sıcaklıkta, pH 8'de ve 150 W'lık tungsten lamba ile fotosentetik koşullar altında 20 mmol/L glukozdan 7,07 mol H₂/mol glukoz verimle H₂ elde etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise; öğütülmüş palmiye yağı atığı ile kağıt ve kağıt hamuru fabrikası atıklarıyla birleştirilerek *R. sphaeroides* NCIMB8253 suşu ile 4 Klux ışık şiddetinde 24 saat inkübasyonu sonucunda 4,67 ml H₂/ml-atık verim ile H₂ üretilmiştir (Budiman et al., 2015). Bu çalışmaların hepsi, yakalanan ışık enerjisinin, bir proton gradyanı oluşturarak fotosentez içerisinde elektron akışının gerçekleştiği ışığa bağımlı prosesler olduğunu göstermektedir. Bu gradyan nitrojenaz aktivitesi ile ATP sentaz yoluyla ATP ve ters elektron akışı yoluyla yüksek enerjili elektronların gereksinimi karşılamak için kullanılmaktadır (Lazaro and Hallenbeck, 2019). Fotofermentasyon süreçlerinde substrattan kısmen yüksek verimlerde hidrojen üretilse de; düşük hacimlerde hidrojen eldesi ve düşük ışık dönüşüm verimleri gibi sebeplerden dolayı bu sistemin pratik olarak uygulamasında bir takım engeller bulunmaktadır.

2.1.3 Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri (Elektrofermentasyon)

Mikrobiyal elektroliz hücreleri; mikrobiyal yakıt hücrelerinden modifiye edilen, çok çeşitli substratlardan H₂ üretimi gerçekleştiren yeni bir tekniktir. Elektrofermentasyon veya biyokatalizli elektroliz hücreleri olarak da adlandırılan mikrobiyal yakıt hücreleri alternatif bir elektrikle çalışan H₂ üretim süreci olarak kullanılmaktadır (Cheng and Logan, 2007). Mikrobiyal yakıt hücreleriyle anodik reaksiyonları benzetmektedir. Elektrotta elektrojenik mikroorganizmalar; anaerobik solunum ile çeşitli organik substratları elektrotun (anot) bir elektron havuzu görevi görmesiyle CO₂'ye ve elektronlara tamamen indirgenmektedir. Bunu; anotta eşleşen organizmalar

tarafından nano teller gibi çeşitli mekanizmaları içeren doğrudan hücre dışı yapılarla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.4). Üretilen akım, oksijenin indirgenmesinin gerçekleştiği katoda iletilmektedir (Cheng et al., 2009). Bir mikrobiyal yakıt hücresi anotta üretilen voltajı, katotta hidrojen oluşumunu sağlayan harici bir güç kaynağından gelen voltajla destekleyerek hidrojen üretmektedir. Redoks potansiyeli normalde buna izin vermeyen substratlardan hidrojen üretimine izin vermektedir. Bir mikroorganizma tarafından üretilene (-0,300 V) ek olarak 0,110 V'tan daha yüksek bir potansiyelde H_2 üretilmektedir. H^+ 'nın H_2 'ye indirgenmesi için normal redoks potansiyeli -0,414 V'dir. Bundan dolayı potansiyel olarak duyulan gereksinim, suyun elektrolizi için teorik olarak gerekli olan 1,230 V'luk voltajla karşılaştırıldığında çok düşüktür. Böylece asetat (-0,279 V), tipik su elektrolizine kıyasla nispeten küçük bir voltaj (-0,135 V) uygulamasıyla teorik olarak hidrojene (-0,414 V) dönüştürülebilir. Ancak teorik olarak; fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin yarattığı aşırı potansiyeller nedeniyle ek voltaj gerekmektedir (Kadier et al., 2016; Rozendal et al., 2007; Cheng and Logan, 2007).



Şekil 2.4. Mikrobiyal elektroliz hücresi ile hidrojen üretiminin şeması (Lazaro and Hallenbeck, 2019)

Mikrobiyal elektroliz hücreleri biyohidrojen üretiminde yüksek oranda verimliliğe sahiptir. Bu verim; mikroorganizma tipi, elektrot malzemeleri, kullanılan membran tipi, uygulanan potansiyel aralığı, substratın bileşimi ve konsantrasyonu ve tasarımı gibi birçok etken ile ilişkilidir. Bu teknik ile H_2 üretiminde yapılan ilk çalışmalarda; anodik ve katodik bölümlerini ayıran iyon geçirgen zarlara sahip iki bölümlü sistemler

kullanılmıştır ve katotta H_2 , anotta CO_2 kolayca yakalanması sağlanmıştır. Bu sistem hidrojen üretimini katalize etmek için biyokatot kullanıldığında; iki bölmede ayrı mikrobiyal toplulukların gelişmesine izin vermektedir. Ancak; proton üretimi nedeniyle anot bölmesinin asitlenmesi, proton tüketimi nedeniyle katot bölmesinin alkalileşmesi ve membranın neden olduğu yüksek direnç, hidrojen oluşumu için voltaj gereksinimini artırarak pH'ı değiştirmektedir. Bu gibi problemlerden dolayı iki bölmeli sistemlere kıyasla daha yüksek akım yoğunlukları üretebilen ve önemli ölçüde daha yüksek hidrojen üretim oranları verebilen tek bölmeli mikrobiyal elektroliz hücreleri önerilmektedir. Ancak tek bölmeli sisteminde yine hidrojen verimini azaltabilecek dezavantajları vardır. Bunlardan birincisi; üretilen hidrojene karşı metan üretiminden kaynaklı verimde düşüş olabilmektedir. İkincisi ise; elektron havuzu olarak anodu kullanılmasıyla üretilen hidrojeni tüketen organizmalarla biyolojik bir kısa devrenin gelişir ve belirli bir miktarda anot üretmek için gereken akım miktarını büyük ölçüde artırmasına sebep olabilmektedir. Bu da; akım yoğunluğunun üçte ikisinin hidrojenin geri dönüşümünden kaynaklanarak net hidrojen üretimini düşürebilmektedir (Lazaro and Hallenbeck, 2019; Chandrasekhar et al., 2015).

Ekonomik olarak uygulanabilirliği, büyük ölçekli sistemlerin kullanılabilirliği ve atık suların giderilmesi gibi olumlu süreçlerinden dolayı mikrobiyal elektroliz hücreleri tercih edilmektedir. Cusick et al., (2011) ilk pilot ölçekli (1000 L) sürekli akışlı mikrobiyal elektroliz hücrelerinde atık su kullanılarak hidrojen üretmişlerdir. 60 gün boyunca zenginleştirilmiş ekzoelektrojenik biyofilm ile 0,9 V'ta gaz üretiminin maksimum 0,20L/L/gün'e ulaşabildiğini bildirmişlerdir. Ancak; çalışmalarında üretilen toplam gazın yaklaşık % 86'sını metan gazının oluşturduğunu ve metanojenleri inhibe etmek için daha güçlü biyofilmler oluşturma ihtiyacını vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada ise; Heidrich et al., (2014) ham evsel atıksularla beslenen $1^{\circ}C - 22^{\circ}C$ değişen sıcaklıklar arasında 12 ay boyunca çalıştırılan 100 L hacminde bir mikrobiyal elektroliz hücresinden 0,6 L/gün hidrojen üretimi gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Yazarlar; ilginç bir şekilde diğer benzer çalışmaların aksine, daha yüksek performanslı hücrelerde sadece düşük *Geobacter* sp. seviyeleri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca; bu

çalışmayla mikrobiyal topluluk bileşimi ile mikrobiyal elektroliz hücrelerinin performansı üzerindeki etkisi arasında ilişkiler kurmak için daha fazla çalışma gerektirdiğini vurgulamışlardır (Heidrich et al., 2014).

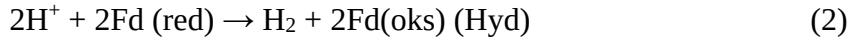
Son 10 yılda mikrobiyal elektroliz hücrelerinin performansında hızlı ve önemli gelişmeler kaydedilmiş ve bu engellerin aşılması yönünde kısmi ilerleme kaydedilmiştir. Elektrometanojenezden mikrobiyal tuz gidermeye kadar çeşitli faydalı reaksiyonlarla farklı biyoelektrokimya türlerini gerçekleştiren varyantlar üretmek için modifiye edilerek kullanılabilmektedir.

2.1.3 Karanlık Fermentasyon

Mikroorganizmalar; hem türler arasında hem de aynı tür veya suş içinde çok yönlü yüksek metabolik süreçlere sahiptirler ve farklı şekillerde fermentasyon yapabilmektedirler. Fermentasyon; kısmi substrat oksidasyonunun ve son elektron alıcısının bir organik molekül olduğu anaerobik bir redoks işlemi olarak bilinmektedir. Moleküler hidrojenin fermentasyon sırasında üretimi; zengin indirgeyici bileşiklerinin (NAD(P)H ve FADH) yayılabilir bir gaz olarak verimli bir şekilde dağıtmanın bir şeklidir (Cabrol et al., 2016). Biyohidrojen üretimi üzerine bugüne kadarki yapılan çalışmaların birçoğu çeşitli ve farklı mikroorganizmalarla gerçekleştirilen karanlık fermentasyon proseslerini içermektedir. Karanlık fermentasyon sürecinde fakültatif (*E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter intermedius* vb.) ve zorunlu anaerobik bakteriler (*Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium paraputrificum*, *Ruminococcus albus* vb.) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Abo-Hashesh and Hallenbeck, 2012). Glikoliz, bir substratın merkezi bir metabolik ara ürün olan pirüvata dönüştürülebildiği anahtar metabolik yoldur. Tüm karanlık fermentasyon proseslerinde anaerobik koşullar altında pirüvattan H_2 üretilirken; asetik asit, bütirik asit, propiyonik asit, malik asit gibi çeşitli uçucu yağ asitleri ve/veya butanol ve etanol gibi alkoller kombinasyon halinde üretilmektedir. Hidrojenin evrimi mikroorganizmalara kendi başlarına herhangi bir avantaj sağlamaz. Ancak; mikrobiyal topluluğun bazı

üyeleri için fazla elektronların ortadan kaldırılması için zorunludur (Chandrasekhar et al., 2015; Cabrol et al., 2016).

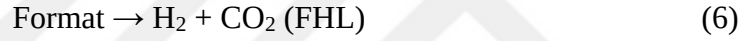
Moleküler hidrojen oluşumunda pirüvatın anaerobik bozunması için iki ana olasılık bilinmektedir. Bunlardan biri; nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) yolunun yeniden oksitlenmesi yolu; diğeri pirüvat-format-liyaz (PFL) yoludur (Şekil 2.5) (Hallenbeck, 2005; Abo-Hashesh et al., 2011). Her iki yol izinde de glukoz önce pirüvata dönüştürülür ve daha sonra asetil-CoA ve indirgenmiş ferredoksin veya format elde edilir. Birinci metabolik yol izi pirüvat ferredoksin oksidoredüktaztan (PFOR) hidrojen üretimidir. Bu yol izinde *Clostridia* gibi zorunlu anaeroblar, glikoliz sırasında pirüvat-ferredoksin (Fd) oksidoredüktaz enzimiyle pirüvatı asetil-CoA'ya dönüştürürler. Asetil-CoA daha sonra asetat ve ATP üretir. Asetil-CoA'ya pirüvat oksidasyonu, indirgenmiş ferredoksinin (Fdred) ferredoksine bağlı bir hidrojenaz (Fd-[FeFe]) ile oksidasyonu yoluyla gerçekleşir (Şekil 2.5). [FeFe]-hidrojenaz enzimi daha sonra indirgenmiş Fd'yi oksitler ve hidrojen üretir. Genel reaksiyonlar Denklem (1) ve Denlem (2)'de gösterilmektedir (Hallenbeck and Ghosh, 2009; Gopalakrishnan et al., 2019; Mohanraj et al., 2019).

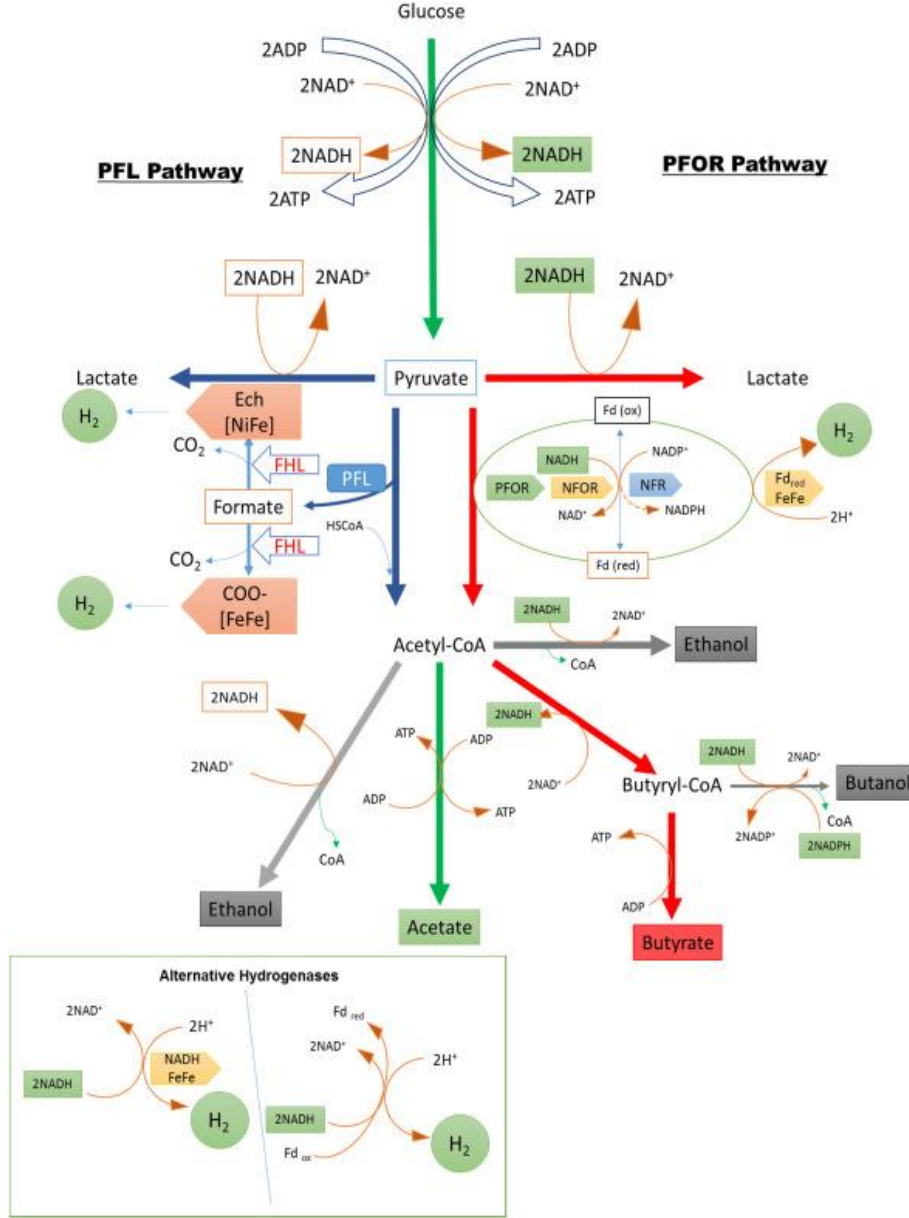


Pirüvatın asetata oksitlendiği durumda; her mol glukoz için 4 mol H₂ üretilir. Pirüvatın bütirata oksitlendiği durumda ise; 2 mol H₂/mol glukoz üretilir (Hallenbeck and Benemann, 2002). Bu sebeple; karışık asit yolunu izleyen organizmalarda asetat/bütirat oranı hidrojen üretimi için temel bir parametredir. Son ürünler olarak asetik asit ve bütirik asidin metabolik reaksiyonlarını ifade eden Denklem (3) ve (4)'te gösterilmektedir (Gopalakrishnan et al., 2019; Mohanraj et al., 2019).



İkinci metabolik yol izi olan PFL yolu; *Enterobacter* gibi fakültatif anaeroblar tarafından format liyaz aktivitesi ile piruvik asidin asetil-CoA ve formik aside katalizidir. Format, bir nikel-demir (NiFe) hidrojenaz içeren bir format hidrojen liyaz (FHL) kompleksi ile H₂ ve CO₂'e ayrılır (Şekil 2.5). Bu yolu ilk kez Stephenson and Stickland (1932) tanımlamışlardır (Denklem (6)). Mikroorganizmaya bağlı olarak bu reaksiyon, [NiFe]-hidrojenaz veya formata bağlı [FeFe]-hidrojenaz aktivitesiyle gerçekleşebilir. Yalnızca PFL yoluna sahip organizmalar, hidrojen üretimi için NADH'e erişemezler. Bundan dolayı teorik olarak; her mol glukoz başına 2 mol H₂ ile sınırlıdır. PFL ve FHL reaksiyonlarını ifade eden sırasıyla Denklem (5) ve (6) aşağıda ifade edilen şekildedir (Stephenson and Stickland, 1932; Gopalakrishnan et al., 2019; Mohanraj et al., 2019).





Şekil 2.5. Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminin gerçekleştiği metabolik yol izleri (Mohanraj et al., 2019)

Metabolik yol izinin son metaboliti etanol, laktik asit veya propiyonat olduğu durumlarda hidrojen üretimi gerçekleşmez. Bazı fakültatif anaeroblar bu durumda fermentasyon yerine, terminal elektron alıcıları olarak nitrat, fumarat gibi bileşikler kullanarak anaerobik solunum gerçekleştirirler. Bu solunum ile hidrojen üretimi engellenebilir. Bu nedenle hidrojen üretimi sırasında bu elektron alıcılarının ortamda bulunmaması gerektiği düşünülmektedir (Gopalakrishnan et al., 2019). Ancak; ilginç bir şekilde nişasta ile beslenen ve aktif çamur ile aşılınmış biyohidrojen reaktörlerinde laktik asidin belirli konsantrasyon aralıklarında hem hidrojen verimini hem

de üretimini arttırdığını da bildirilmiştir. Bu konsantrasyon eşiğinin (yaklaşık 650 mg/L) üzerindeki konsantrasyonlarda ise, hidrojen veriminin belirgin bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Karışık kültürlerde bu olumlu etki laktatın bütirata dönüşümünde elektron donörü olarak görev almasıyla açıklanmaktadır. *C. beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium acetobutylicum* ve *Clostridium tyrobutyricum* gibi *Clostridia* türleriyle asetat varlığında laktatı bütirat, CO₂ ve H₂'ye dönüştürme yetenekleri kanıtlanmıştır. Ayrıca; *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *Clostridium felsineum* ve özellikle *Clostridium pasteurianum*'un saf ve ortak kültürlerinde de laktatı yeniden kullanma kapasiteleriyle nişasta fermentasyonlarında ana metabolit laktat olduğu zaman en yüksek H₂ verimi elde edilmiştir (Cabrol et al., 2016).

Karanlık fermentasyon sırasında, fotofermentasyon için substrat olarak kullanılabilen çeşitli organik asitler üretilir. Bu organik asitlerden fotofermentatif bakteriler tarafından H₂ ve CO₂ üretilir. Bazı çalışmalar bu substratlardan toplam enerji çıkarımını artırmak için iki aşamalı karanlık fermentasyon-fotofermantasyon prosesi uygulanarak daha yüksek hidrojen üretimini incelemişlerdir. Bu proseste; karbonhidrat açısından zengin substratlar ilk olarak karanlık fermentasyon reaktöründe kısmen hidrojene dönüştürülür. İkinci bir aşamada; ek enerjiyi geri kazanmak için organik asit yan ürünleri işlenir. Teorik olarak, bu hibrit işlemde her mol dekstroz için 12 mol H₂ üretilir (Denklem (7)). Ancak; fotofermentasyonun kullanımı, yüksek ışık yoğunluklarının kullanılamaması ve düşük maliyetli fotobiyoreaktörlere duyulan ihtiyaç dahil olmak üzere bir dizi teknik engel sunmaktadır. Bu sebeplerden dolayı; iki aşamalı hibrit sistemleri pratik düzeyde kullanılmadan önce daha fazla araştırma ve geliştirme gerektirmektedir (Lazaro and Hallenbeck, 2019).



Hidrojenin biyolojik olarak üretim şekillerinin her birinin kendi içinde avantajları ve dezavantajları vardır. Biyofotoliz ve fotofermentasyon proseslerindeki en büyük dezavantaj ayrıca bir enerji kaynağı olarak ışık kaynağı gereksinimidir. Bu sebeple; pratik uygulamalarda hidrojen verimleri

ve üretim hızları daha düşük kalmaktadır (Gopalakrishnan et al., 2019). Mikrobiyal elektroliz hücreleri ve ikili hibrit sistemlerde teorikte yüksek hidrojen elde edilirken; pratik uygulamalar için daha fazla teknik araştırma ve geliştirme gerektirir (Çizelge 1). Karanlık fermentasyon prosesi ise; teorik olarak düşük hidrojen eldesi ve birçok yan ürünün de birlikte üretilmesi gibi dezavantajlara sahiptir. Ancak; daha düşük enerji gereksinimini, zorlayıcı olmayan proses koşullarından dolayı diğer proseslere göre hidrojen verimi ve üretim hızı açısından daha umut verici olarak görülmektedir. Ayrıca karanlık fermentasyon süreçlerinde çevresel atıklar (kanalizasyon çamuru, meyve-sebze atıkları, damıtım atıkları vb.) kullanılarak hidrojen üretilmektedir. Bu sayede; sürdürülebilir atık yönetimi, kirlilik kontrolü ve temiz enerji üretimi gibi çevre biyoteknolojisi açısından önemli olan katkıları sağlamaktadır (Cabrol et al., 2016). Biyohidrojen üretiminde kullanılan prosesler ve üretimdeki avantaj-dezavantajlarının irdelendiği tablo Çizelge 2.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 Biyohidrojen Prosesleri ve Avantajları – Dezavantajları

Proses	Mikroorganizmalar	Substrat	Avantajlar	Dezavantajlar
Doğrudan Biyofotoliz	Yeşil Algler	Su	Çok fazla ve ucuz substrat kullanımı, Güneş enerjisinin yakalanması	Yüksek ışık yoğunluğu gereklidir. O ₂ sistem için engelleyici olabilir
Dolaylı Biyofotoliz	Yeşil Algler Siyanobakteriler	Su	Sudan H ₂ üretimi, Nitrojenaz görev alan ana enzim, Atmosferden azotu giderimi	Daha düşük fotokimyasal verimlilik, Oksijenazın nitrojenaz üzerindeki inhibisyon etkisi
Fotofermentasyon	Fotosentetik Mor Kükürtsüz Bakteriler	Organik asitler Gliserol Şekerler	Net substrat dönüşümü, Çok çeşitli atıkları kullanabilme, Geniş spektrumlu ışık enerjisinin kullanımı	Düşük ışık dönüşüm verimliliği, Düşük fotokimyasal etkinlik, Düşük hacimsel üretim oranları
Karanlık Fermentasyon	Zorunlu Anaeroblar ve Fakültatif Anaeroblar	Şekerler Karbonhidratça zengin atıklar	Basit reaktör teknolojisi, Çok çeşitli atıkları kullanabilme yeteneği, yüksek hacimlerde üretim	Nispeten düşük biyolojik H ₂ verimleri, Çok çeşitli yan ürünlerin birlikte üretilmesi, CO ₂ varlığı
Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri	Ekzoelektrojenler	Şekerler Organik asitler Proteinler	Tüm substratın parçalanması, çok çeşitli bileşiklerden H ₂ üretimi	Yüksek voltaj gerekliliği, Düşük akım yoğunlukları, Pahalı katotlar (platin)
İkili Hibrit Sistemler	Fermantatif Bakteriler Fotoheterotrofik bakteriler	Şekerler Organik asitler Çeşitli atıklar	Yüksek verimlilik, Hibrit sistem kullanımı	Yüksek maliyet, Kombine sistem için teknik güçlükler, Fotobakteriler ile metabolize edilemeyen nişasta ve selüloz varlığı

2.2 Karanlık Fermentasyon ile Hidrojen Üretiminin Mikrobiyolojisi

Farklı birçok anaerobik bakteri uygun koşullar altında kendilerine ait metabolik yol izleriyle hidrojen üretebilmektedirler. Anaerobik koşullarda oksijenin bulunmamasından dolayı bu tür organizmalar terminal elektron alıcısı olarak proton veya kükürtü kullanırlar. Karanlık fermentasyonda hidrojen üretimin bir elektronun protona aktarılmasıyla gerçekleşir. Bu organizmalar; oksijene karşı hassasiyetlerine ve sıcaklık ihtiyaçlarına göre zorunlu anaeroblar ve fakültatif bakteriler olarak gruplandırılır. Zorunlu anaeroblar; oksijene karşı direkt olarak duyarlı olan mikroorganizmalardır. Spor oluşturabilen bu anaeroblar; ısı ön işlem, asit ile ön muamale gibi işlemlerle zenginleştirilebilirler. Fakültatif anaerobik bakteriler ise; hem anaerobik hem de aerobik ortamlarda bulunabilen mikroorganizmalardır. Bu bakteriler zorunlu anaeroblara göre laboratuvar koşulları altında daha kolay büyütüldükleri için daha avantajlıdır. Ayrıca hidrojen üretiminde görev alan mikroorganizmaları sıcaklık ihtiyaçlarına göre; mezofiller, termofiller ve ekstremofiller olarak üç gruba da ayırmak mümkündür. Ortam sıcaklığında büyüeyebilen mikroorganizmalar mezofillerdir. Termofiller büyümeleri ve hidrojen üretebilmeleri için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyurken, ekstremofiller daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymaktadırlar. Bu mikroorganizma grupları arasında termofillerle teorik olarak daha yüksek hidrojen verimi elde edilmiş olsa da; yüksek sıcaklıklı dengede tutabilmek için de yüksek enerjiye gerekinim duyulmaktadır. Bu da büyük ölçekli çalışmalarda termofillerin pratik uygulamalar için avantajlı olmadığını göstermektedir (Das, 2009).

Hidrojen üretimi sadece saf kültür kullanılarak ya da karışık kültürler ile gerçekleştirilebilir. Karışık kültürlerde hidrojen üreticileri, hidrolizörler, metanojenler, kükürt indirgeyiciler gibi birçok farklı mikroorganizma grubunu bir arada bulundurabilirler. Bu mikroorganizma grupları içerisinde hidrojen üretmeyen mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların varlığı; toplam hidrojen veriminde artışa ya da azalışa sebep olabilmektedir. Aynı zamanda; proses içerisinde dominant olan topluluk, substrat tipine ve bileşimine de bağlıdır. Bu nedenle; hidrojen

üretiminde yüksek verimliliğin seçilen mikroorganizmalarla doğrudan ilişkisi vardır (Gopalakrishnan et al., 2019).

2.2.1 Zorunlu Anaerobik Bakteriler

Zorunlu anaeroblar; farklı karbonhidratlar ve çeşitli atıkları kullanarak hidrojen üretebilme yetenekleriyle bilinmektedirler. Hidrojen reaktörlerinde genellikle en bol ve en verimli olan karanlık fermentasyonla hidrojen üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu organizmalar genellikle hidrojen üretim verimliliğinin en yüksek olduğu dönemlerde baskındır. Spor oluşturdıklarından bu bakteriler; ısı veya diğer ön işlemlere tabi tutulduklarında uzun vadeli stabilite gösterirler. Bu nedenle; karışık kültürde seçilmeleri verimli ve kolaydır. Bu bakteriler, log aşamasında hidrojen üretimini gerçekleştirirken; durağan fazda metabolizmaları solventojenik faza geçmektedir. *Clostridia* türlerinden özellikle *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii*, *C. paraputrificum* ve *Clostridium acetobutyricum* türleri ile hidrojen üretiminde yüksek verimler elde edilmiştir (Cabrol et al., 2016; Gopalakrishnan et al., 2019). *C. butyricum*; farklı *Clostridial* saf kültürler ve tanımlanmış ortak kültürler ile nişastadan hidrojen üretiminde en yüksek H₂ verimini sağlamıştır (Masset et al., 2012). *C. pasteurianum*; karışık kültürler ile yoğunlaştırılmış melastan hidrojen üreten reaktörde dominant tür olduğu bildirilmiştir. Ayrıca; diğer *Clostridium* türlerine göre en yüksek H₂ üretim hızına sahip olduğu vurgulanmıştır (Hsiao et al., 2009). Bugüne kadar karanlık fermentasyon ile H₂ üretimi üzerine yapılan araştırmaların çoğu *Clostridia* türleri üzerine olup; Çizelge 2.2’de ilgili örneklerden birkaçı verilmiştir.

Çizelge 2.2 Zorunlu Anaerobik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Hidrojen Verimi	Referans
<i>C. butyricum</i>	Glukoz	2,29 mol/mol glukoz	Lin et al., 2007
<i>C. tyrobutyricum</i>	Glukoz	1,47 mol/mol glukoz	Lin et al., 2007
<i>C. pasteurianum</i>	Glukoz	1,19 mol/mol glukoz	Masset et al., 2012
<i>C. pasteurianum</i>	Nışasta	1,06 mol/mol nişasta	Liu and Shen, 2004
<i>C. pasteurianum</i>	Sukroz	4,8 mol/mol sukroz	Lin and Lay, 2004
<i>C. beijerinckii</i>	Glukoz	2,81 mol/mol glukoz	Lin et al., 2007
<i>C. acetobutylicum</i>	Glukoz	1,8 mol/mol glukoz	Lin et al., 2007
<i>Clostridium</i> sp.	Glukoz	2,8 mol/mol glukoz	Steven et al., 2005
<i>Clostridium cellobilparum</i>	Glukoz	2,7 mol/mol glukoz	Chung et al., 1976
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC27021	Peynir altı suyu	2,7 mol/mol peynir altı suyu	Ferchichi et al., 2005
<i>Ethanoligenens harbinense</i>	Glukoz	2,2 mol/mol glukoz	Tang et al., 2012
<i>C. acetobutylicum</i> X9 ve <i>E. harbinense</i> B49	Mikrokristal selüloz	1,8 L H ₂ / palm yağı değirmen altı atık suyu	Wang et al., 2008
<i>Clostridium sporosphaeroides</i> F52 ve <i>C. pasteurianum</i> F40	Yoğunlaştırılmış melas fermentasyonu	1,8 mol/mol melas	Hsiao et., 2009
<i>C. tyrobutyricum</i>	Yemek atığı	2,23 mol/mol yemek atığı	Jo et al., 2008

2.2.2 Fakültatif Anaerobik Bakteriler

Fakültatif anaeroblar oksijen yokluğunda adenosin trifosfat (ATP) üretebildikleri gibi aerobik ortamda da üretebilirler. Fakültatif anaeroblardan bilinen en iyi H₂ üreticileri *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerdir. Hidrojen üretiminde daha yüksek hidrojen üretim hızı ve verimine yol açan [FeFe]-hidrojenaz veya format hidrojen liyaz (FHL) enzimlerini bulundurlar. Bu bakterilerin oksijene duyarlılıkları daha düşük olduğu için

daha cazip olabilmektedirler. Bu sayede; reaktör kurulumunda ya da üretim sırasında istenmeyen oksijen kaçaklarında ortamdaki oksijeni hızla tüketebilirler. Bu da; H₂ üretiminde bu bakterileri reaktörde işlemenin daha kolay olacağını göstermektedir. Ayrıca; hem ekonomik olmayan hem de birçok spor oluşturmeyen hidrojen üreten bakterileri indirgeme dezavantajına sahip olan şiddetli ısı şoku ön işlemine de ihtiyaç duymazlar. Ancak; yine de bu bakterilerin varlığı genellikle substrat/inokulumun şiddetli ön işlemleriyle sınırlı kalmaktadır. Substrat/inokulum temeli ve geçmişi aerobik olduğunda, fakültatif anaeroblar bol miktarda bulunmaktadır. Fakat; çok yüksek ön işlemlere de tabi tutulsalar bile ortamda tespit edilebilirler. Teorik olarak daha düşük verimlerine rağmen fakültatif anaeroblar; pratikte bazıları *Clostridium* türlerinin hidrojen üretkenliğine ulaşabilme veya aşabilme yeteneklerinden dolayı H₂ üretiminin zorlayıcıları olarak kabul edilebilmektedirler (Cabrol et al., 2016; Gopalakrishnan et al., 2019). Çizelge 2.3'te bu bakterilerle karanlık fermantasyon ile H₂ üretimi üzerine yapılan araştırmalar tablo halinde verilmiştir.

Çizelge 2.3 Fakültatif Anaerobik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Hidrojen Verimi	Referans
<i>E. cloacae</i> IIT-BT 08	Glukoz	2,2 mol/mol glukoz	Kumar and Das, 2000
<i>E. cloacae</i> IIT-BT 08	Sukroz	6 mol/mol sukroz	Kumar and Das, 2000
<i>E. cloacae</i> IIT-BT 08	Sellobiyoz	5,4 mol/mol sellobiyoz	Kumar and Das, 2000
<i>E. cloacae</i> DM11	Glukoz	3,3 mol/mol glukoz	Nath et al., 2006
<i>E. cloacae</i> BL-21	Glukoz	3,1 mol/mol glukoz	Chittibabu et al., 2006
<i>E. aerogenes</i>	Ksiloz	1,92 mol/mol ksilo	Jayasinghearachchi et al., 2009
<i>K. pneumoniae</i>	Glukoz	2,07 mol/mol glukoz	Niu et al., 2010
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Glukoz	1,01 mol/mol glukoz	Minnan et al., 2005
<i>Citrobacter</i> sp. Y19	Glukoz	2,49 mol/mol glukoz	Oh et al., 2003
<i>K. pneumoniae</i> IIT-BT 08	Damıtım Atıksuyu	7,6 mmol H ₂ /g COD	Mishra et al., 2015
<i>K. pneumoniae</i> ve <i>Citrobacter freundii</i>	Damıtım Atıksuyu	10,7 mmol H ₂ /g COD	Mishra et al., 2015
<i>K. pneumoniae</i>	Şeker Kamışı Melası	11.2 mmol H ₂ /g COD	Pandit et al., 2014

2.2.3 Termofiller

Termofiller, sıcak su kaynaklarında ve derin deniz hidrotermal menfezleri gibi yüksek sıcaklıklara sahip yerlerde bulunan mikroorganizmalardır. Optimum koşulların bu mikroorganizmalar için belirlenmesi izole edildiklere yere göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; volkanik menfezlerden izole edilenlerin büyümeleri ve H₂ üretebilmeleri için yüksek konsantrasyonlarda kükürte ihtiyaç duymaktadırlar. Aynı zamanda termofilikler zorunlu anaerobtur ve bu yüzden çözünmüş O₂'nin ortamdan uzaklaştırılmasında L-sistin ya da HCl gibi indirgeyici ajanlar kullanılmaktadır. Termofilik koşullar optimum sıcaklıkların çok fazla üzerinde olsa da; bu yüksek sıcaklıklar reaksiyonu hızlandırır, kontaminasyon riskini azaltır, vizkoziteyi azaltır (Gopalakrishnan et al., 2019). Ayrıca; termofilikler ile kompleks substratların parçalanma hızı daha yüksektir.

Özellikle hipertermofilik koşullarda; mikrobiyal profilde H_2 tüketicilerinin (metanojenler gibi) bulunma olasılığı azalmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı; termofilik bakteriler, hidrojen üretiminde mezofilik bakterilerden daha umut verici oldukları düşünülmektedir. *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldicellulosiruptor* ve *Thermotoga* gibi genislara ait suşların termofilik koşullar altında hidrojen ürettikleri bildirilmiştir. *T. maritima*, *T. neapolitana* ve *T. elfii* gibi türler hidrojen üretimi için farklı atıklardan izole edilmiştir (O-Thong et al., 2008; Pradhan et., 2015). Çizelge 2.4'te bu bakterilerle karanlık fermentasyon ile H_2 üretimi üzerine yapılan araştırmalar tablo halinde verilmiştir.

Çizelge 2.4. Termofilik Bakterilerden Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Hidrojen Verimi	Referans
<i>Clostridium thermocellum</i>	Selüloz	0,8 mol/mol selüloz	Liu et al., 2008
<i>T. thermosaccharolyticum</i>	Glukoz	1,8 mol/mol glukoz	Liu et al., 2008
<i>T. mathranii</i>	Glukoz	2,64 mol/mol glukoz	Jayasinghearachchi et al., 2012
<i>T. neapolitana</i>	Havuç posası	2,4 mol/mol havuç posası	Vrije et al., 2010
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Havuç posası	1,3 mol/mol havuç posası	Vrije et al., 2010
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Glukoz	2,7 mol/mol glukoz	Thong et al., 2008
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. karışık kültürü	Nişasta atıksuyu	92 mL H_2 /g nişasta	Zang et al., 2003
<i>Thermoanaerobacterium</i> ve zenginleştirilmiş çamur	Palm yağı değirmen altı atık suyu	6,3 L H_2 /L Palm yağı değirmen altı atık suyu	O-Thong et al., 2007

2.2.4 Karışık Kültürler

Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde karışık kültür kullanımı hem ekonomik hem de endüstriyel açıdan idealdir. Karışık kültürler mühendislik yönüyle değerlendirildiğinde tam ölçekli endüstriyel uygulamalar için daha uygundur. Çünkü; sistemin bakımı ve düzenlemesi, minimum yukarı akış işlemi gerektirir. Bu da; düşük operasyon ve bakım maliyeti sunar. Karışık kültürler farklı birçok organizmayı bulundurduğu için

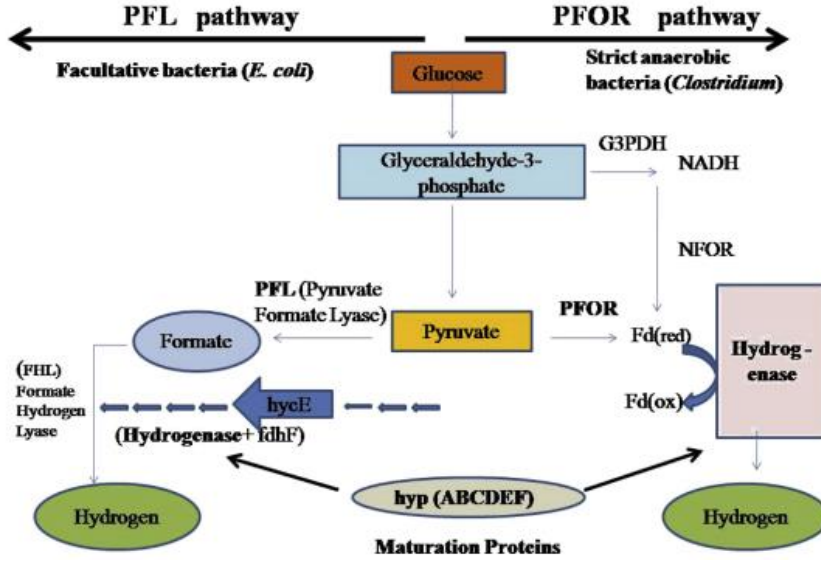
mevcut farklı enzim havuzları sayesinde kompleks atıkların daha iyi parçalanmasına yardımcı olabilmektedir. Farklı birçok bakteri türü substrat kullanımı, metabolitlerin veya moleküler sinyallerin değişimi için bir sinerji içerisinde iş görmektedirler. Bu da; karışık kültürlerin saf kültüre göre daha avantajlı olduğunu gösterir. Çok sayıda çalışma ile hidrojen üretiminde saf kültürlerin hidrojen tüketen bakterilerle kontaminasyon olasılığı nedeniyle, karışık kültürlerin tercih edildiğini bildirilmiştir. Hidrojen üretiminde anaerobik çürütücü çamuru, organik atık ve mutfak atık su çamuru gibi farklı kaynaklar inokulum olarak tercih edilebilmektedir (Kumar et al., 2018; Gopalakrishnan et al., 2019). Ancak bunun yanı sıra; karışık kültürlerdeki en büyük zorluk ortamda hidrojen tüketen mikroorganizmaların ya da hidrojen üreticileri üzerinde olumsuz etkisi olan bakterilerin varlığıdır. Bu olumsuz durum; çeşitli ön muameleyle (sıcaklık, asit vb.) ya da termofilik koşullar tercih edilerek metanojenler gibi hidrojen kullanan bakterilerin (spor oluşturmayan) baskılanarak *Clostridium* ve *Bacillus* türleri gibi H₂ üreten bakteriler (endospor oluşturan bakteriler) zenginleştirilerek çözüme ulaştırılır (Keskin vd. 2018). Çizelge 2.5'te karışık kültür kullanılarak karanlık fermentasyon ile H₂ üretimi üzerine yapılan araştırmalar tablo halinde verilmiştir.

Çizelge 2.5. Karışık Kültür Kullanılarak Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretim Verimleri

İnokulum	Dominant Hidrojen Üreticileri	Kullanılan Moleküler Teknik	Substrat	Hidrojen Verimi	Referans
Süt ürünleri ve yerel hayvan atıkları ile beslenen biyogaz reaktör örneği	<i>C. butyricum</i> , <i>C. pasteurianum</i> , <i>Bacillus</i> sp.	DGGE	Meyve – sebze atığı	23,53 NmL H ₂ /gVS	Keskin vd., 2019
İnek gübresi kompostu, lağım pisiği	<i>C. butyricum</i> , <i>C. tertium</i> , <i>C. perfringens</i>	PCR-DGGE	İçecek atıksuyu	55 L H ₂ /L heksoz	Sivagurunat han et al., 2015
Aktif Çamur	<i>C. thermopalmarium</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>B. ginsengihumi</i> , <i>B. coagula</i>	PCR-DGGE	Yağı alınmış Jatropha atığı	307,4 mL H ₂	Kumar et al., 2015
Toprak ve kompost artıkları	<i>Clostridium</i> , <i>Methanothermobacter</i>	Illumina MiSeq Dizileme	Şeker Kamışı	1.50 mmol/L	Soares et al., 2018
Anaerobik Çamur	<i>Clostridium</i> sp.	Illumina MiSeq Dizileme	Sentetik atıksu	1,44 mol/mol glukoz	Si et al., 2015
Atık su	<i>Thermoanaerobacterium</i> (%6), <i>Ruminiclostridium</i> (%3)	OTU	Patates nişastası	138 mL/g VS	Litti et al., 2021
Atık su	<i>Thermobrachium</i> (%34), <i>Acetomicrobium</i> (%16), <i>Clostridium sensu stricto</i> 7 (%12), <i>Romboutsia</i> (%9), <i>Coprothermobacter</i> (%8)	OTU	Enzimatik pepton	4,1 mL/g VS	Litti et al., 2021
Atık su	<i>Thermoanaerobacterium</i> (%21), <i>Thermobrachium</i> (%19), <i>Tepidiphilus</i> (%16), <i>Acetomicrobium</i> (%14), <i>Romboutsia</i> (%9), <i>Clostridium sensu stricto</i> 7(%7), <i>Clostridium sensu stricto</i> 1(%3)	OTU	Ayçiçeği yağı	4,9 mL/g VS	Litti et al., 2021

2.3 Karanlık Fermentasyon ile Hidrojen Üretim Sürecinde Rol Oynayan Anahtar Enzimlerin Moleküler Biyolojisi

Karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretiminde iki anahtar enzim rol oynamaktadır. Bunlardan biri format hidrojen liyaz (FHL), diğeri ise [FeFe]-hidrojenazdır. Bu iki enzimden birini hidrojen üretiminde sorumlu olan organizmalar kullanmaktadırlar. Şekil 2.6'da hidrojen üretimi sırasında sırasıyla fakültatif ve zorunlu anaerobik bakterilerdeki PFL ve PFOR metabolik yol izlerinde görev alan enzimler temsili olarak gösterilmektedir (Rai et al., 2019).



Şekil 2.6 PFL ve PFOR metabolik yollarıyla hidrojen üretiminde rol oynayan olgunlaşma proteinleri (Rai et al., 2019)

2.3.1 Format Hidrojen Liyaz (FHL)

Format hidrojen liyaz (FHL) sistemi olarak bilinen çoklu enzim kompleksi fakültatif anaerob bakterilerde hidrojen üretiminde görev almaktadır. Anaerobik solunumda formatın parçalanması sonucunda hidrojen ve CO₂ üretimi FHL kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. Birçok bakteride format; metabolik yolun önemli bir ürünüdür ve -420 mV civarında düşük redoks potansiyeline sahiptir. Genel olarak ortamın formattan dolayı asitlenmesi durumunda; formatın nötr bir molekülü olan formik asitin hidrojene dönüştürülmesiyle indirgenir. Bu reaksiyonu katalize eden FHL kompleksi; formik asidin H₂ ve CO₂'e oksidasyonunda görev alan format

dehidrojenaz, hidrojenaz ve elektron transfer taşıyıcılarından oluşmaktadır. Bu reaksiyonda elektron donörü olarak görev alan formik asitken; terminal elektron alıcıları olarak protonlar görev almaktadır. Elektron taşıyıcısı; bir elektronu format dehidrojenazdan hidrojenaza aktarmaktadır. Bu reaksiyonları kullanarak hidrojen üreten çeşitli fakültatif anaeroblar; *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, *Rhodospirillum rubrum*, *Methanobacterium formicium*, *E. aerogenes*, *E. coli*'dir. Tüm bu fakültatif organizmalar arasında FHL sistemi arasında en belirgin *E. coli* de görülmektedir. Fakültatif anaeroblarda FHL kompleksinin hidrojenazların her biri birçok alt birimden oluşan hidrojenaz-1 (Hyd-1), hidrojenaz-2 (Hyd-2), hidrojenaz-3 (Hyd-3) ve hidrojenaz-4 (Hyd-4) oluşmaktadır. Bu alt birimlerin bazıları politopik zar proteinlerini temsil etmektedir. Hyd-1 ve Hyd-2, alım hidrojenazlarıdır. Bu hidrojenazların kodlayan operonlar sırasıyla *hya* ve *hyb*'dir. Hyd-3'ün hidrojen üretiminde görev aldığı bilinmektedir. Hyd-3, Hyc olarak adlandırılan çok sayıda büyük ve küçük alt birim içeren kararlı bir protein kompleksidir. En ilginç büyük alt birimlerden biri olan HycE proteini; sitoplazmik tarafta bulunan periferik zar proteini ve proton indirgeme reaksiyonunun dengesinden sorumludur. Bu da hidrojenaz alt birimlerinin çeşitli elektron taşıma zincirlerinin oluşumuna dahil olduğunu göstermektedir (Sinha et al., 2015; Gopalakrishnan et al., 2019).

Format; hem aerobik hem de anaerobik koşullarda oluşmaktadır ve hücre içinde farklı bir rol oynamaktadır. Örneğin; fermentatif büyüme sürecinde *E. coli*'nin ribonükleosit-trifosfat redüktaz (deoksiribonükleosit-trifosfat üretiminden sorumlu) enzimi için hidrojen donörü görevi görebilmektedir. Aerobik hücrelerde ise; nitrat indirgenirken format oksidoredüktaz (FDH-O), solunum zincirinde ubikinon indirgenmesiyle oksidasyonu düzenlemek için çift olarak ifade edilmektedir. Ancak; yine de nitrat indirgeyen hücrelerde format dehidrojenaz (FDH-N) baskın olarak bulunmaktadır. FHL kompleksinin aktivitesi; sıcaklık, pH, kısmi basınç vb. gibi çevresel faktörlerden önemli derecede etkilenir. Bu nedenle, biyohidrojen üretimi için bu faktörlerin etkisini incelemek her zaman gereklidir (Sinha et al., 2015).

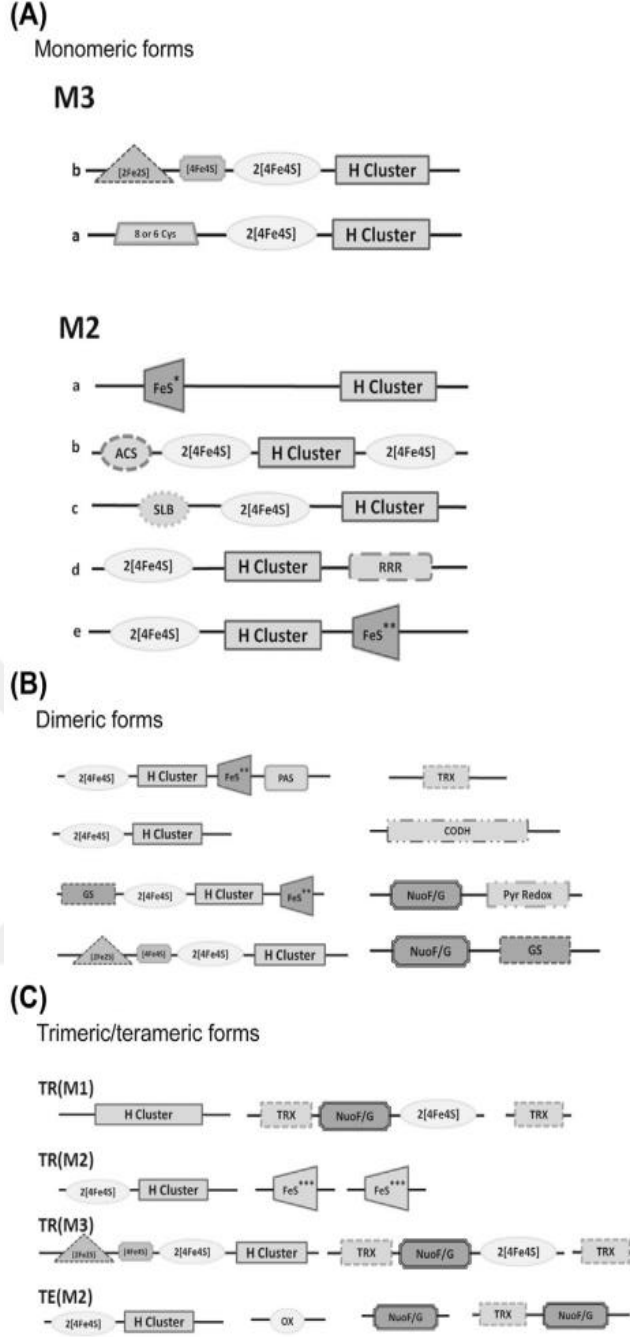
2.3.2 Hidrojenaz

Hidrojenaz, hidrojen üreten mikroorganizmalarda üretimden sorumlu diğer bir anahtar enzimdir. Moleküler hidrojenin iki elektrona ve iki protona dönüşmesinin tersinir reaksiyonunu taşıyan ve enerji metabolizmasında önemli rol oynayan enzimdir. Hidrojenaz enzimi; aktif bölgelerindeki metal iyonlarının sayısı ve tipine göre [NiFe], [FeFe] ve [Fe] hidrojenaz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Filogenetik olarak ilişkili olmayan bu hidrojenazlar; aktif bölgelerinde Fe atomu için bir ligand olarak CO ve Fe'nin varlığı gibi birkaç benzer özellikleri vardır. [NiFe] ve [FeFe]-hidrojenazlar; merkezlerinde Fe iyonunu bulundurlar. [Fe]-hidrojenazlar; metanojeniz sırasında 5,10-metilentetrahidrometanopterinin hidrojene bağlı indirgenmesi için kullanılan tek bir Fe^{+3} iyonu içerirler ve sadece metanojenik arkelerde bulunurlar. [NiFe]-hidrojenazlar temel olarak hidrojen oksidasyonunu katalize ederler. Ancak format hidrojen liyaz reaksiyonunda hidrojen üretimi sırasında *E. coli*'nin Hyd-3'ünde görev alır. Doğada geniş çapta dağılmış olan [NiFe]-hidrojenazların tam tersine, [FeFe]-hidrojenazların dağılımı çok daha dar bir şekilde sınırlandırılmıştır. Ancak bu üç hidrojenaz arasında [FeFe]-hidrojenazların; potansiyel bir hidrojen üreticisi rolünü üstlendiği bilinmektedir. Genellikle anaerobik bakterilerde (*Clostridia*, *Thermotoga*) ve bazı yeşil alglerde bulunurlar. H_2 üretiminde [NiFe]-hidrojenaza göre 10-100 kat daha fazla aktiviteye sahiptirler (Winkler et al., 2013; Constant and Hallenbeck, 2019; Gopalakrishnan et al., 2019; Zhao et al., 2019; Rai et al., 2019).

[FeFe]-hidrojenaz enziminin katalitik çekirdeğini kodlayan *hydA* genidir. Bu gen; [FeFe]-hidrojenaz dağılımını araştırmak amacıyla fonksiyonel biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. [FeFe]-hidrojenaz enziminin olgunlaşması için *hydA* geninin *hydE*, *hydF* ve *hydG* genlerini bulundurması gerektiği düşünülmektedir. Çevrede [FeFe]-hidrojenazların doğal oluşumunun ve çeşitliliğinin oldukça az olduğu yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir (Constant and Hallenbeck, 2019). Mulder et al. (2010), yaptıkları çalışmada bir milyardan fazla baz çiftinin çoklu hizalanmasıyla [FeFe]-hidrojenaz dizisine sadece 10 benzerliğin bulunduğu

tespit etmişlerdir. Bu durum [FeFe]-hidrojenaz dağılımını araştırmak için; elde edilen *hydA* dizilerine sahip organizmaların düşünülen *hydE*, *hydF* ve *hydG*'ye sahip olup olmadığının belirlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Ancak tam genomu dizilenmiş bazı organizmalarda *hydE*, *hydF* ve *hydG* genleri olmayan *hydA* içerdiği bildirilmiştir. Gözlemlenen bu yoksun *hydA* dizisinin olası işlevlerinin ne olabileceği veya tanınmayan bir olgunlaşma sisteminin görevinin bilinmediği vurgulanmıştır (Mulder et al. 2010). Boyd et al. (2009), tuzlu bir mikrobiyal bölgeden elde ettikleri *hydA* geni dizilerinin %66,2 *Firmicutes*, %24,6 *Verrucomicrobia*, %9,2 *Bacteroidetes* ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.





Şekil 2.7 [FeFe]-hidrojenazların modüler domain yapısı (Constant and Hallenbeck, 2019)

Tüm [FeFe]-hidrojenazların iki demir iyonunun aktif bölgesini içerdiği düşünülmektedir. Bu aktif H-kümesinin sentezi hakkında çok az bilgi edinilmesine rağmen; son birkaç yılda yapılan araştırmalar önemli derecede ışık tutmuştur. H kümesi; bir sistein tiolat ile CO ve CN ligandlarıyla modifiye edilmiş 2Fe alt kümesine bağlanan bir [4Fe4S] alt kümesinden oluşmaktadır. [FeFe]-hidrojenazlar; monomerik, dimerik, trimerik ve hatta tetramerik formlara ayrılabilirler (Şekil 2.7). Şekil 2.7’de çeşitli

Clostridia genomlarında ve genel olarak bakterilerde bulunan farklı hidrojenazların modüler form yapıları gösterilmektedir (Constant and Hallenbeck, 2019). Şekil 2.7 (A)'da dizi analizleri sonucunda belirlenen bazı farklı monomerik formlar gösterilmektedir. M3 grubunun en üst üyesi olan *C. pasteurianum*'dan protein düzeyinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ferredoksin bağlantılı [FeFe]-hidrojenazdır. M3 grubunda bir diğer gösterilen [FeFe]-hidrojenaz ise; *C. beijerinckii*'den elde edilmiştir. M2 grubunda özel redoks reaksiyonlarında ya da algılama-sinyalleşme gibi görevleri olan birçok farklı monomerik form birlikte bulunmaktadır. Ancak; M2a grubu hariç diğer tüm gruplar, katalitik bölge için gerekli olan bir H-kümesi ve Fe-kümesinden oluşan redoks çiftinden H-kümesine elektronları ileten 2[4Fe4S] kümesini bağlayabilmek için temel bir modül bulundururlar. M2a grubunda ise; [FeFe]-hidrojenazlarının kesilmesiyle birlikte sadece tek bir [FeS] kümesinin ligandlanması gerçekleşmektedir. Şekil 2.7 (B)'de, bazı bakterilerin genomlarından elde edilebilmiş belirli dimerik formlar gösterilmektedir. Şekil 2.7 (C)'de farklı birkaç trimerik ve tetramerik form gösterilmektedir. Dimerik ve trimerik formların çoğu, Nuo alt birimlerini içerir. Nuo alt birimlerinin; bu enzimlerin işleyişinde NADPH'nin fizyolojik bir rolünü üstlendiği düşünülmektedir. Bu çeşitli formlarda bulunabilen [FeFe]-hidrojenaz enziminin temel görevi genel olarak H₂ üretimidir. Birçok *Clostridial* genomunun az ya da hiç karakterize edilmemiş farklı sınıflarının çoklu [FeFe]-hidrojenazlarını kodladığı bilinmektedir. Bu formlardan en fazla beş farklı hidrojenaz formunu bazı *Clostridial* türlerinin içerebildiği bilinmektedir. *Clostridia*'lar en iyi bilinen H₂ üreticileri ve en zengin hidrojenaz içeriğine sahip organizmalardır. Ancak; *Clostridia*'da bulunan hidrojenazların da farklı şekillerde hücresel metabolizma ile etkileşime giren birçok farklı türün evrimleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple; özellikle karışık kültürler ile fermentasyon sırasında hidrojen üretiminin arkasındaki genetik temeli aydınlatmak oldukça önemlidir. Çok sayıda moleküler ve biyokimyasal çalışma ile bu hidrojenazların işlevini açıklığa kavuşturulması mümkündür (Constant and Hallenbeck, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Biyokütlenin Temini

Biyohidrojen üretiminden sorumlu biyokütle 215M314 nolu TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Biyoteknolojisi ve Biyoenerji Laboratuvarında çalışılan reaktör deneme setlerinden temin edilmiştir. Biyohidrojen üretiminin gerçekleştiği reaktör düzeneği; 15 L hacimli bir perkolasyon tankı ve 55 L hacimli kuru fermentörden oluşmaktadır. Kuru fermentörde oluşan sızıntı suyu perkolasyon tankına beslenir. Kuru fermentörün içeriğindeki nemin %30-40 arasında sabit tutulabilmesi için belirli aralıklarla perkolasyon tankı ortamından spreyleme yapılır (Abubackar vd., 2019).

Kuru fermantasyon denemeleri boyunca mezofilik koşullarda ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$) inokulum/substrat oranı 1/1 olarak sabit tutulmuştur. Denemelerde kullanılan inokulum süt fabrikasında bulunan biyogaz fermentöründen temin edilmiştir. Meyve – sebze atıkları boyutları ilk denemede <1 cm olacak şekilde parçalayıcıdan geçirilerek elde edilmiştir ve 105°C 'de ısı ön işlem ile muamele edilmiştir. İkinci denemede ise ısı ön işlem görmemiş olan ve <1 cm'den küçük olan meyve – sebze atıkları kullanılmıştır. Üçüncü denemede ise; meyve – sebze atıkları ~ 5 cm olacak şekilde bıçak ile kesilerek ısı ön işlem ile muamele edildikten sonra kuru fermentöre yüklenmiştir. Her üç denemede de 6,5 kg organik atık aynı içerikte kullanılmıştır. Kuru fermentöre 105°C 'de ısı ön işlem görmüş 6,5 kg meyve – sebze atığı, aynı oranda inokulum eklenmiştir. Perkolasyon tankına ise; 105°C 'de ısı ön işlem görmüş inokulum ve 40 kat yoğun hazırlanmış bazal ortam ve atıkların parçalanması ve ısı ön işleme tabi tutulması sonucu açığa çıkan meyve – sebze atıklarının suyu eklenmiştir. Daha sonra kuru fermantasyon sistemi 37°C 'de işletilmeye başlanmıştır (Abubackar vd., 2019). Kuru fermantasyon sisteminin işletilmesi boyunca günlük biyogaz ölçümleri, biyogazdaki H_2 , CO_2 ve CH_4 yüzdeleri Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Çevre Biyoteknolojisi ve Biyoenerji Laboratuvarında ölçülmüştür.

Kuru fermantasyon sisteminin işletilmesi sırasında ilk gün ve H₂ üretiminin en yüksek olduğu günlerde reaktörden örnekler alınmıştır. Reaktör örneklerinde mikrobiyal profildeki değişimler ve ilgili genin karakterizasyonu bu tez kapsamında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

3.2 Suşlar ve Kültür Ortamı

Fermentatif biyohidrojen üreticisi olan *C. pasteurianum* (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702) ve *C. tyrobutyricum* (DSM-2637) suşları Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Almanya)'dan satın alınmıştır. Bu mikroorganizmalar Differential Reinforced *Clostridial* Medium (DRCM) ortamında 37°C'de büyütülmüştür. DRCM ortamının bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM)

İçerik	Gram/Litre
Kazeinden Pepton	5,0
Etten Pepton	5,0
Et Özütü	8,0
Maya Özütü	1,0
Nişasta	1,0
D (+) Glukoz	1,0
L- Sisteinyum Klorür	0,5
Sodyum Asetat	5,0
Sodyum Disülfür	0,5
Amonyum Demir (II) Sitrata	0,5
Sodyum Resazurin	0,002

3.3 Total genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu öncesi örneklerin içeriğinde bulunan mikroorganizmaların homojen şekilde dağılmalarını sağlamak amacıyla sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için, içerisinde örneklerin bulunduğu 1,5 µl mikrosantrifüj tüplerine sonikasyon probu (Bandelin SONOPULS™ GM 2070 Digital Ultrasonic Homogenizer, Germany) ile %90 güç uygulanarak 10 saniye boyunca 3 döngü halinde sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyon işlemi sonunda homojen hale gelen örnekler ZR fungal/bacterial DNA Kiti (ZymoResearch, USA) ile kitin protokolüne bağlı kalınarak DNA izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla; reaktör örneklerinden 250 µl alınarak ZR BashingBead™ Lysis tüplerine aktırılmıştır. Üzerlerine 750 µl Lysis Solution eklenmiştir ve 5 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 1 dakika boyunca 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. 400 µl süpernatant koleksiyon tüplerinin içine yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IV Spin Filter tüplerine aktarılmıştır. 1 dakika boyunca 7000 x g'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra koleksiyon tüplerindeki filtratlara 1200 µl Genomic Lysis Buffer ilave edilmiştir. Bu karışımdan 800 µl alınarak koleksiyon tüplerinin içine yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IICR Column3 tüplerine aktarılmıştır ve 1 dakika boyunca 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. Koleksiyon tüpüne gelen pellet atılarak işlem tekrarlanmıştır. Ardından yeni koleksiyon tüplerine yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IICR Column tüplerine 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenmiştir ve 1 dakika boyunca 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. Zymo-Spin™ IICR Column tüplerine 500 µl g-DNA Wash Buffer eklenerek 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. Son olarak; Zymo-Spin™ IICR Column tüpleri 1,5 ml'lik mikrotüplere yerleştirilmiştir. Üzerlerine 50 µl DNA Elution Buffer eklenmiştir ve 30 saniye boyunca 1000 x g'de santrifüjlenerek DNA'lar ayrıştırılmıştır. İzole edilen DNA'ların miktar tayini Nanodrop 2000c (ThermoScientific) ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda kuru fermentör sisteminden alınan bütün örneklerin DNA'larının saflıkları belirlenmesi için 260/280 nm dalga boyundaki ölçüm oranlarının 1,7-1,9 arasında olduğu gözlemlenmiştir.

3.4 Konvansiyonel PCR koşulları

Total genomik DNA örnekleri izole edildikten sonra öncelikli olarak bakteriler için korunmuş bölge olan 16S rRNA gen bölgesini kodlayan DNA bölgelerini hedef alan 11F-1492R primer setleri ile çoğaltılmıştır. Bu işlem için gerçekleştirilen PCR protokolü, başlangıç denatürasyon için 95°C 'de 5 dk. 1 döngü; amplifikasyon için 40 döngü boyunca denaturasyon 95°C 'de 20 sn., 50°C'de 40 sn. ve 72°C'de 80 sn. olarak belirlenmiştir. Çoğaltma işleminden sonra, PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için, 1x TAE tamponu içerisinde %1 oranında hazırlanan agaroz jel 80 Volt elektrik gücü uygulanarak yaklaşık 1 saat boyunca elektroforez tankında yürütülmüştür. Devamında PCR ürünlerine ait bantlar UV ışığı (Biospectrum, UVP, UK) altında görüntülenmiştir. Daha sonra, çoğaltılan bu bölgenin içinde kalan daha kısa ve de özgün bölgeler iç primerler olarak adlandırılan 338F-805R primer setleri ile çoğaltılmıştır. 338F primeri ardışık G-C bazlarından oluşan GC-clamp oligonükleotidi bağlanarak kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri DGGE analizinde kullanılmıştır. İç bölge için kullanılan PCR protokolü, başlangıç denatürasyon için 95°C 'de 5 dk. 1 döngü; amplifikasyon için 40 döngü boyunca denaturasyon 95°C 'de 20 sn., 57°C'de 40 sn. ve 72°C'de 15 sn. olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

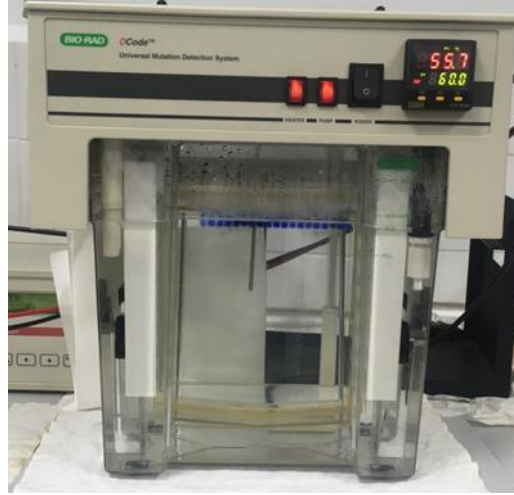
Çizelge 3.2 Mikrobiyal yapı belirlemede DGGE analizleri için kullanılan primer setleri

	Primer	Nükleotid Dizisi
Bakteri (Dış Bölge)	11F	5'- GTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
	1492R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'
Bakteri (İç Bölge)	338 F-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAG-3'
	805 R	5'- GACTACCAGGGTATCTAATCC – 3'
	338F	5' -ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

3.5 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Belirlenmesi

3.5.1 DGGE analizi

DGGE analizlerinde ilk olarak iç bölge primerleri ile elde edilen PCR ürünleri %0-100 denaturant içeren %8'lik poliakrilamid jel (%100 denaturant:7 M üre ve %40 [v/v] formamide'in bir karışımıdır) kullanılarak yürütülmüştür. Bu sayede genel olarak tüm bantların jeldeki konumları belirlenerek bir sonraki aşamada hazırlanacak olan jel gradiyenti belirlenmiştir. Bantların birbirinden ayrılabilmesi için uygun olan jelin %40-60 üre-formamid konsantrasyonlarında hazırlanması gerektiği görülmüştür. %40-60 üre-formamid konsantrasyonlarında hazırlanan poliakrilamid jel uygun koşullarda (Biorad DCode universal mutation detection system, USA) dökülerek dondurulmuş ve bir gece buzdolabında bekletilerek jelin gerekli hali alması sağlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri jele yüklenerek 1XTAE tamponu ile doldurulan ve ısısı 60°C 'ye ayarlanmış olan tampon çözelti içerisinde 8 saat boyunca 135 volt güç uygulanarak yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 DGGE sistemi ve örneklerin kuyucuklardaki görünümü

Elektroforezi takiben poliakrilamid jel 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde Gel-Green (Biotium) boyası kullanılarak karanlık koşulda 100x (rpm)'de 30 dakika boyunca post jel boyaması yapılmıştır. Boyama süresi sonunda jel alınarak görüntüleme sistemi ile bantların görüntülenmesi sağlanmıştır. Yüklenen her bir kuyucuğun yürüdüğü hat boyunca en keskin,

yoğun ve farklı yerlerde konumlanan bantlar UV ışığı altında steril bistüri ile kesilerek steril mikrosantrifüj tüpleri içerisinde bulunan 40 µl ultra saf suya konulmuş ve bir gece 4°C'de bekletilerek jel içinde bulunan oligonükleotidlerin suya geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra jelden kazanılan bant içeren sudan 2 µl'si kullanılarak GC clamp içermeyen 338F-518R primer seti ile reamplifikasyon reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Reamplifikasyondan elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde tekrar yürütülerek bantlar doğrulandıktan sonra örneklerdeki mikrobiyotayı belirlemek amacıyla DNA dizi analizine gönderilmiştir.

3.5.2 Metagenom analizleri

Kuru fermantasyon sisteminde 3 farklı reaktör denemesinden alınan örneklerden aşı ve hidrojen çıkışlarının en yüksek olduğu örnekler seçilmiştir. Hidrojenin yüksek olduğu bu örneklerde mikrobiyal profili belirlemek, başlangıçtaki aşıyla ve reaktör deneme setleri arasındaki farklılık/benzerlikleri kıyaslamak amacıyla metagenom analizleri yapılmıştır.

Kütüphane hazırlamak için reaktörlerden alınan örneklerin DNA izolasyonları sonrasında her bir örnekteki 16S rDNA V3-V4 bölgelerinin zenginleştirilmesi için 16S Amplicon PCR Forward Primer ve 16S Amplicon PCR Reverse Primer Universal *Bacteria* primerler kullanılmıştır. İlgili primerler Klindworth et al. (2013)'ün gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada, en yüksek etkinlikte sunan primer seti olarak seçilmiş ve bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Tez çalışmasında kütüphane hazırlığı sırasında 2 basamaklı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerde, KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche) kullanılarak her bir örnek için ayrı ayrı 25 döngülü PCR gerçekleştirilmiştir. Birinci PCR aşamasında, 95°C'de 3 dk. ardından 25 döngü boyunca 95°C-30sn, 55°C-30sn, 72°C-30sn ve son olarak tek döngü 72°C'de 5dk. koşulları uygulanmıştır. İkinci PCR uygulamasında, illumina index ve adaptör dizilerinin eklenmesi için Nextera XT Index Primer 1 ve Nextera XT Index Primer 2 setleri (illumina, CA, USA) kullanılmıştır. Bu PCR aşamasında, 95°C'de 3 dk. ardından 8 döngü boyunca 95°C-30sn, 55°C-30sn, 72°C-30sn ve son olarak tek döngü 72°C'de 5dk. koşulları

uygulanmıştır. Her iki PCR işlemi sonrasında Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) kiti ile saflaştırma ve pürifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 Mikrobiyal profil belirlemede metagenom analizleri için kullanılan primer setleri

Primer	Nükleotid Dizisi (5' – 3')
16S F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGC WGCAG
16S R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGG TATCTAATCC

PCR uygulamasından sonra tüm örneklerle ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde bant varlığı ve göreceli bant yoğunlukları kontrol edilmiştir. Hazırlanan kütüphanenin Qubit florometresi ile ölçümü yapılmış ve normalizasyon sonrası dizileme işlemine alınmıştır. Bu amaçla; illumina'nın 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protokolü kullanılmıştır(https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prepguide-15044223-b.pdf).

Dizileme uygulaması için illumina iSeq 100 yeni nesil dizileme platformunda (illumina, CA, USA), iSeq 100 il Reagent kiti ile çift yönlü (2x150bp) okuma, üretici firma yönergeleri takip edilerek kullanılmıştır.

Biyoinformatik analizler; dizileme uygulaması sonrasında kalite kontrol basamaklarında FastQC programı kullanılmıştır (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Kalite kontrol sonuçlarına göre her bir örneğin veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, k-mer dağılımları ve olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Kalite kontrol sonrasında düşük okuma kalitesine (Phred Score <Q20, 30 bp'lik pencere aralığı) sahip okumalar tüm veriden çıkarılmıştır. Ayrıca okuma uçlarındaki düşük kaliteli baz okumaları olası adaptör kontaminantları ile kimerik diziler Genomes OnLine Database (GOLD) temel alınarak ve Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) aracı ile kırpılmıştır.

Taksonomik profilendirme için okumalar, Wang Q. et al. (2007) tarafından geliştirilmiş Ribosomal Database Project (RDP) Classifier kullanılarak Greengenes veritabanı temel alınarak hedef organizmalara hizalanmıştır. Hizalama sonrasında her bir örnekteki operasyonel taksonomik birim (Operational Taxonomic Unit (OTU)) grupları belirlenmiştir. Verilerin raporlanması, istatistik analizleri ve veri görselleştirme çalışmalarında R betikleri kullanılmıştır.

3.6 Hidrojenaz Geninin Karakterizasyonu

3.6.1 Hidrojenaz Primerlerinin Tasarımı ve PCR Koşulları

Hidrojenaz (*hydA*) geni için primerler UniProt, NCBI, MEGA-X ve Primer3 veri tabanları kullanılarak çoklu hizalama sonucunda tasarlanmıştır. DGGE analizleri sonucunda elde edilen verilere göre baskın olan ve biyohidrojen üretiminden sorumlu *Clostridium* türleri belirlenmiştir. *C. butyricum* strain DSM10702, *C. tyrobutyricum* strain JM1, *C. acetobutylicum* ATCC 824 ve *C. pasteurianum* strain DSM525 türlerine ait *hydA* geninin nükleotid ve amino asit dizileri şablon olarak seçilmiştir. MEGA-X veri tabanı kullanılarak çoklu hizalama sonucunda her bir mikroorganizmaya özgü spesifik primerler Primer3 veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 *HydA* geninin karakterizasyonunda kullanılan primer setleri ve PCR koşulları

Oligo Adı	5' – 3' Sekans	Uzunluk	PCR Koşulları
B-HYDAF (<i>C. butyricum</i>)	GGTACATCTATCATTCTAGCTGCA	1648 bç	95°C 3 dk 95°C 15 sn 54°C 15 sn
B-HYDAR (<i>C. butyricum</i>)	GGGCTTTATGTTGTCCTGGCAT		72°C 25 sn 72°C 3 dk
T-HYDAF (<i>C. tyrobutyricum</i>)	AGAAGCTGAAGAAAACGCCACT	1602 bç	95°C 3 dk 95°C 15 sn 53°C 15 sn
T-HYDAR (<i>C. tyrobutyricum</i>)	GCAGGGTTTTTCATGGGACTTTCTT		72°C 23 sn 72°C 3 dk
P-HYDAF (<i>C. pasteurianum</i>)	TCTCCTTCTGTACGAGTGTCCTT	873 bç	95°C 3 dk 95°C 15 sn 56°C 15 sn
P-HYDAR (<i>C. pasteurianum</i>)	GGTTGTCCCTCCTCCACTTACG		72°C 15 sn 72°C 3 dk
AC-HYDAF (<i>C. acetobutylicum</i>)	GCGGAGTCTGTATGGTAGAGGT	1561 bç	95°C 3 dk 95°C 15 sn 55°C 15 sn
AC-HYDAR (<i>C. acetobutylicum</i>)	TGAGCAAGTCCTTCACCTGGTT		72°C 24 sn 72°C 3 dk

HydA geninin karakterizasyonu analizlerinde Optimus 96G Gradient Thermal Cycler (QLS, UK) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı Grisp Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x) with Dye içeriği kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir primer seti için çalışma koşulları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Çoğaltma işleminden sonra, PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. PCR ürünlerinden 5 µl ve 1 µl Grisp Xpert Dna Stain Direct boyası ile karıştırılarak kuyucuklara ayrı ayrı yüklenmiştir. 1x TAE tamponu içerisinde %1 oranında hazırlanan agaroz jel 80 Volt elektrik gücü uygulanarak yaklaşık 1 saat boyunca elektroforez tankında yürütülmüştür. Devamında PCR ürünlerine ait bantlar UV ışığı (Maestrogen UV/LED Transilluminator) altında görüntülenmiştir.

3.6.2 Hidrojenaz Geninin Biyoinformatik Analizleri

Nükleik asit dizileri çift yönde sekanslanmıştır. Nükleik asit dizileri DNA Dragon ve BioEdit programları kullanılarak temizlenmiştir. Daha sonra aminoasit dizilerinin dönüşümü ve benzerliklerin belirlenmesi amacıyla NCBI Blastx veri tabanında taranmıştır. %100-%50 benzerlikleri arasında olan diziler seçilerek FASTA formatları alınarak MEGA-X programı kullanılarak çoklu hizalama yapılmıştır. Daha sonra yine MEGA-X programı kullanılarak maximum likelihood metodu ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Ayrıca aminoasit dizilerindeki korunmuş bölgelerin ve yakın ilişkideki türlerin belirlenmesi amacıyla UniProt (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>) veri tabanında peptit benzerlikleri taranmıştır ve BioEdit programı kullanılarak gösterilmiştir.

3.7 Real-time PCR ile Kalitatif ve Kantitatif Analizler

3.7.1 İlgili Gen Bölgelerinin Alıcı Hücreye Klonlanması

Real-time Q-PCR uygulamalarında kantitatif sonuçların verilmesi için öncelikli olarak hidrojen üretiminde baskın olan türlere ait gen bölgelerinin klonlanması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; *C. pasteurianum* (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702) ve *C. tyrobutyricum* (DSM-2637) pGem-T Easy vektörü (pGem-T Easy Vector Systems- Promega) kiti kullanılmıştır. Gen bölgeleri kitin protokolüne uyularak plazmide aktarılmıştır. Alıcı hücre olarak *Escherichia coli* JM 109 hücresi kullanılmıştır.

C. pasteurianum (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702) ve *C. tyrobutyricum* (DSM-2637)'a ait Çizelge 4'te belirtilmiş olan primer setleri kullanılarak konvansiyonel PCR'da klonlanacak bölgeler çoğaltılmıştır. Çoğaltma işleminden sonra, PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için, 1x TAE tamponu içerisinde %1 oranında hazırlanan agaroz jel 80 Volt elektrik gücü uygulanarak yaklaşık 1 saat boyunca elektroforez tankında yürütülmüştür. Devamında PCR ürünlerine ait bantlar UV ışığı (Biospectrum, UVP, UK) altında görüntülenmiştir. PCR ürünlerinin miktar tayini ve saflıklarının belirlenmesi

Nanodrop 2000c (ThermoScientific) ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirilmiştir

pGEM-T Easy vektör kullanımı ile bağlanma protokolü aşamaları uygulanmıştır. pGEM-T Easy vektör ve kontrol insert DNA tüpleri, içeriklerin tüpün dip kısmında toplanması amacıyla kısa bir süre santrifüjlenmiştir. Ligasyon reaksiyonları Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Reaksiyon pipetleme ile karıştırılmıştır ve 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.5 pGEM-T Easy protokolü ligasyon reaksiyonları

	Standart reaksiyon	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligaz	5µl	5µl	5µl
pGEM-T veya pGEM-T Easy Vektör (50 ng)	1µl	1µl	1µl
PCR ürünü	1,5 µl	-	-
Kontrol İnsert DNA	-	2µl	-
T4 DNA Ligaz (3 Weiss birimi/µ)	1µl	1µl	1µl
Son hacim miktarı	10µl	10µl	10µl

Ligasyon reaksiyonlarında kullanılan transformasyonlar için Ampicillin, IPTG ve X-GAL içeren Luria-Bertani ortamı (LB) hazırlanmıştır. Transformasyon verimliliğini belirlemek için kontrol amaçlı 2 plak daha hazırlanmıştır. Plaklamadan önce ortamlar oda sıcaklığına getirilmiştir. Reaksiyon tüpleri içeriğin dip kısmında toplanması için santrifüjlenmiştir. Her bir ligasyon reaksiyonundan 2µl alınıp; buz üzerindeki 1,5 µl steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kullanılan hücrelerin transformasyon yeteneğinin ölçülmesi için diğer tüplere 0.1ng kesilmemiş plazmid aktararak buz üzerine alınmıştır. -70°C'de stoklanan JM109 hücre tüpleri çözülene kadar buz banyosunda yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Hücreler yavaşça karıştırılmıştır. Hazırlanan tüplere dikkatlice 50µl hücre aktarılmıştır. Transformasyon verimini ölçmek için hazırlanan tüplere ise; 100µl hücre aktarılmıştır. Tüpler yavaşça karıştırılmıştır ve 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 42°C'deki su banyosunda yaklaşık 45-50 saniye tutularak ısı şoku yaratılmıştır. Tüpler hızlıca tekrardan buz üzerine alınarak 2 dakika

tutulmuştur. Ligasyon reaksiyonları ile transforme edilen hücreleri içeren tüplere 950µl, kesilmemiş plazmid ile transforme olan hücreleri içeren tüplere ise 900µl oda sıcaklığındaki SOC çözeltisinden ilave edilmiştir. 1,5 saat boyunca 37°C’de ve 150 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında daha yüksek sayıda koloni oluşumu elde etmek amacıyla; hücreler 10 dakika 1000 x g ‘da santrifüjlenerek pellet oluşumu sağlanmıştır. Transformasyon kültürlerinden 100 µl alınarak Ampicillin, IPTG ve X-GAL içeren LB ortamlarına ekimleri yapılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda beyaz koloniler seçilerek Ampicilin içeren LB ortamlarına ekilmiştir. 24 saat inkübasyon sonucunda plazmid DNA izolasyonları yapılmıştır.

3.7.2 Plazmid DNA İzolasyonu

Real-time PCR analizlerinde kullanılmak amacıyla *C. pasteurianum* (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702) ve *C. tyrobutyricum* (DSM-2637)’a ait alıcı hücreye aktarıldıktan sonra plazmid DNA’ları izole edilmiştir. Plazmid DNA izolasyonları NORGEN Biotek kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; Her bir kültür örneğinden 1,5 ml alınmıştır ve 15 – 20 saniye 1600 x g’de santrifüjlenip süpernatantı atılmıştır. Tüpün üzerine 200 µl P1 Buffer ilave edilip, pellet tamamen çözünene kadar mikropipetle hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra 200 µl 'lik P2 Buffer eklenmiştir ve 2-4 kez ters çevrilerek karıştırılmıştır. Hücreler berrak, mor ve viskoz görününce tamamen çözüldüğünü göstermiştir. Çözülme işleminden sonra 400 µl P3 Buffer ilave edilmiştir ve hafifçe ve iyice karıştırılmıştır. Nötralizasyon tamamlandığında örnek sarı renk almıştır ve 1-2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası numuneler 2 dakika boyunca 1000 x g’de santrifüjlenmiştir. Zymo-Spin™ IIN filtreli tüpü koleksiyon tüpüne yerleştirilip süpernatant Zymo-Spin™ IIN kolonuna aktarılmıştır. Süpernatant pipetle aktarılırken yeşil çökeltiye değmeden 800 µl alınmıştır. Daha sonra 30 saniye boyunca 1000 x g’de santrifüjlenmiştir. Koleksiyon tüpü içeriği dökülüp santrifüj basamağı tekrarlanmıştır. Ardından filtreli tüp üzerine 200 µl Endo yıkama tamponu eklenmiştir ve 30 saniye boyunca 1000 x g’de santrifüjlenmiştir. Daha sonra filtreli tüp üzerine 400 µl

Plasmid Wash Buffer eklenmiştir ve 1 dakika boyunca 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. Son olarak; filtrelili tüp 1,5 ml hacmindeki mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir ve 30 µl DNA Elution Buffer eklenip 30 saniye boyunca 1000 x g'de santrifüjlenmiştir. Bu basamak ile plazmid DNA'larının izolasyonu tamamlanmıştır. Plazmid DNA'larının miktarları ve saflıkları Nanodrop 2000c (ThermoScientific) ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek tayin edilmiştir.

3.7.3 Real-time PCR Koşulları

Real-time analizleri için LightCycler 96 System (Roche, Germany) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı RealQ Plus Master Mix Green (Ampliqon) içeriği kullanılarak hazırlanmıştır. Literatür tabanlı yapılan çalışmalardan hidrojen üretiminde baskın olarak iş gören mikroorganizma grubunun *Clostridium* türlerinden *C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* olduğu tespit edilmiştir (Minton and Clarke, 1989; Brosseau and Zajic, 1982). Analizlerde kullanılacak olan primer setlerinin; *C. pasteurianum* türüne ait spesifik gen bölgesi için *C.pasteurianum*F- *C.pasteurianum*R (Savichtcheva et al., 2011), *C. butyricum* (*CbutyHYDA*f-*CbutyHYDA*r) ve *C. tyrobutyricum* (*CtyroW428*f-*CtyroW428*r) türlerine ait spesifik primer setleri bu tez kapsamında sentezlenmiştir. Bu amaçla; *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*'a ait suşlar ayrı ayrı NCBI veri tabanında taranarak nükleik asit dizilerinin FASTA formatları indirilmiştir. *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* suşları için ayrı ayrı MEGA veri tabanında çoklu hizalama yapılmıştır ve benzerliklerin yoğun olduğu nükleik asit dizileri belirlenmiştir. Bu nükleik asit dizileriyle Primer3 veri tabanı kullanılarak *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* türlerine özgü spesifik primerler tasarlanmıştır. Her bir gen bölgesi için kullanılan iki primer çifti Çizelge 3.6'te verilmiştir.

Çizelge 3.6 Real-time PCR için kullanılan primer setleri

Primerler	Nükleotid Dizisi (5'→3')	Spesifite	Referans
CbutyHYDAf	AGTGTTCAAATGTTGGTAAATGTG	<i>C. butyricum</i>	Bu tez çalışmasında sentezlenmiştir.
CbutyHYDAr	CTCTTGTGTTGCCTCAGTATTAG	<i>C. butyricum</i>	Bu tez çalışmasında sentezlenmiştir.
CtyroW428f	TCTGCCTCAAGTGTTCCT	<i>C. tyrobutyricum</i>	Bu tez çalışmasında sentezlenmiştir.
CtyroW428r	TCCTCCGTATTTATCTGTCCTT	<i>C. tyrobutyricum</i>	Bu tez çalışmasında sentezlenmiştir.
C.pasteuriumF	CTCATGTGGGACTTCAAGCA	<i>C. pasteurium</i>	Savichtcheva et al., 2011
C.pasteuriumR	CACCAGGTGTTGTTTCTGGA	<i>C. pasteurium</i>	Savichtcheva et al., 2011

Kalitatif ve kantitatif çalışmaları yapmak amacıyla; her bir primer seti için Real-time PCR ile protokol optimizasyonu yapılmıştır (Çizelge 3.7). Bu amaçla; LightCycler 96 System Real-time PCR cihazında SYBR Green I kanalında 470/514 nm'de 1 döngü ön inkübasyon ve 45 döngülük çoğaltma basamaklarından sonra 1 döngülük uzama aşamasında okumalar yapılmıştır.

Çizelge 3.7 Real-time PCR çalışmalarında kullanılan primer setlerinin protokolleri

<i>C. pasteurianum</i> (C. pasteurianumF- C. pasteurianumR)	Ön inkübasyon (1 döngü)	95°C'de 600 sn
	Amplifikasyon (45 döngü)	95 °C'de 10 sn 53 °C'de 10 sn 72 °C'de 6 sn
	Melting (1 döngü)	95 °C'de 10 sn 65 °C'de 60 sn 97 °C'de 1 sn
	Cooling (1 döngü)	37 °C'de 30 sn
<i>C. butyricum</i> (CbutyHYDAf- CbutyHYDAr)	Ön inkübasyon (1 döngü)	95°C'de 900 sn
	Amplifikasyon (45 döngü)	95 °C'de 30 sn 50 °C'de 30 sn 72 °C'de 30 sn
	Melting (1 döngü)	95 °C'de 10 sn 65 °C'de 60 sn 97 °C'de 1 sn
	Cooling (1 döngü)	37 °C'de 30 sn
<i>C. tyrobutyricum</i> (CtyroW428f- CtyroW428r)	Ön inkübasyon (1 döngü)	95°C'de 900 sn
	Amplifikasyon (45 döngü)	95 °C'de 30 sn 48 °C'de 30 sn 72 °C'de 30 sn
	Melting (1 döngü)	95 °C'de 10 sn 65 °C'de 60 sn 97 °C'de 1 sn
	Cooling (1 döngü)	37 °C'de 30 sn

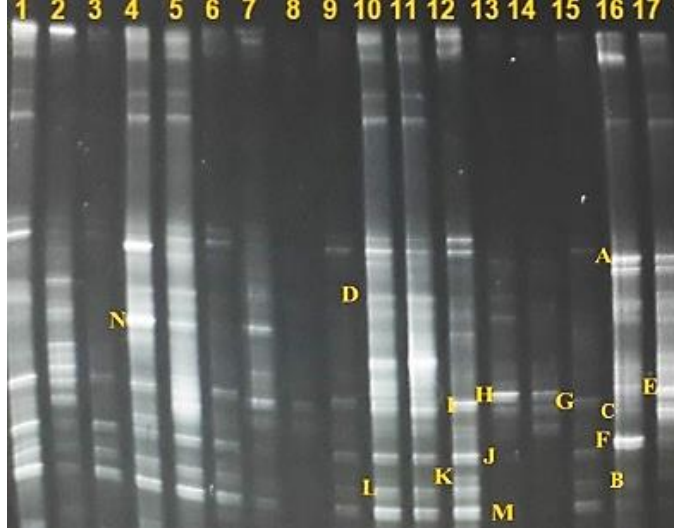
4. BULGULAR

4.1 Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Belirlenmesi

4.1.1 DGGE Analizi Sonuçları

Hidrojen üretimini gerçekleştiren kuru fermentörden (KF) ve perkolasyon tankından (PT) alınan örneklerdeki mikrobiyal profili belirlemek için universal 16S rRNA V1 – V9 ve V3 – V5 bölgelerine ait primer setleri kullanılarak DGGE analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda poliakrilamid jelden kesilen DGGE bantları temizlenerek tekrar PCR'ları yapılan bant DNA'ları dizi analizine yollanmış ve gelen dizi analiz sonuçları BioEdit ve Mega 7 programları kullanılarak ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Dizi temizlemeleri yapıldıktan sonra NCBI veri tabanında BLAST edilen dizilerden dominant türler tespit edilmiştir. DNA dizi analizleri sonucuna bağlı olarak elde edilen dizilerden fermantasyonda rol oynayan dominant mikrobiyotanın filogenetik ağacı her bir deneme için ayrı ayrı oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları oluşturmak için öncelikli olarak ClustalW ile dizilenmiştir. Daha sonra Tamura – Nei modeline dayalı olan maximum likelihood ile bootstrap metodu kullanılarak 1000 tekrarı olacak şekilde filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

KF sisteminde otoklavlanmış-küçük partiküller, otoklavlanmamış-küçük partiküller ve otoklavlanmış-büyük partiküller olmak üzere 3 set halinde ayrı ayrı çalışılmıştır. Mezofilik olarak çalışılan bu deneme setlerinden hidrojen üretiminin yüksek ölçüldüğü anlarda toplamda 17 tane örnek alınmıştır ve DGGE analizi yapılarak toplamda 16 tane ayrı hizada olabilecek bantlar kesilmiştir (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Sekans sonuçlarına göre yapılan dizi temizlemeleri sonrasında NCBI veri tabanında BLAST edilen dizilerden dominant türlerin %94-100 arasında benzerlik oranlarında oldukları görülmüştür. Elde edilen dizilerden hidrojen üretiminde rol oynayan dominant mikrobiyal yapının filogenetik ağacı ve bant kaynakları Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir (215M314 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilen DGGE görüntüsü ve H₂ çıkışı sonuçlarını içermektedir).



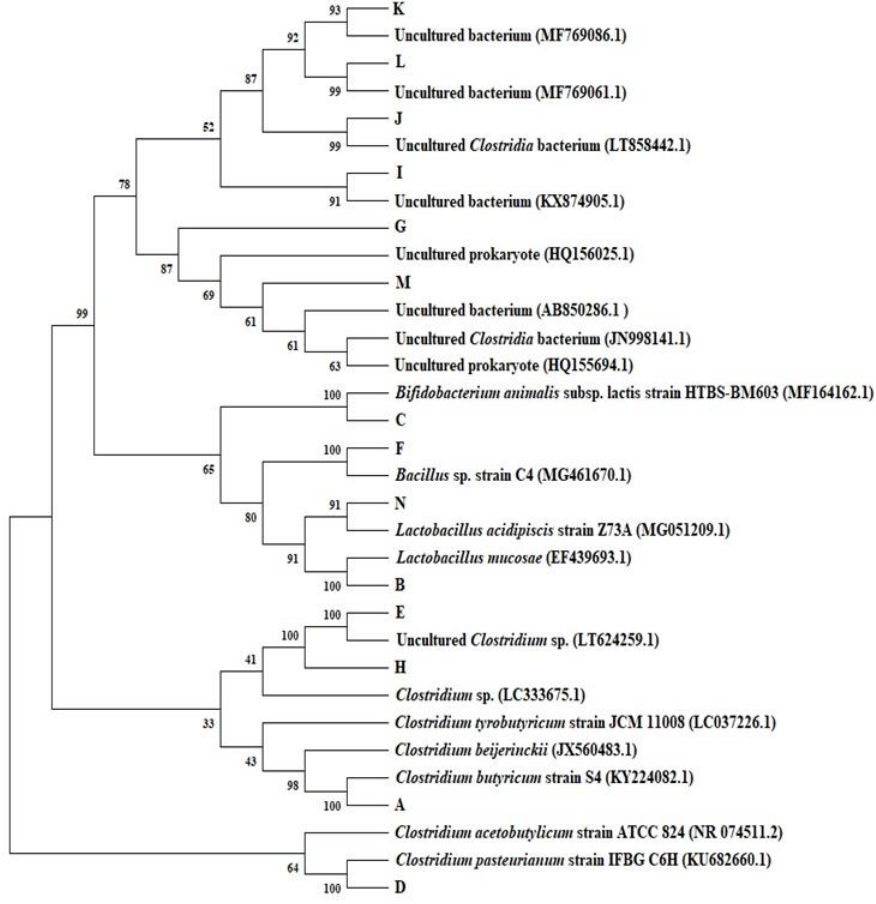
Şekil 4.1 Mezofilik Denemesi setlerinin DGGE jel bantlarının görüntüsü ve kesilen bantlar

Çizelge 4.1 DGGE Bantlarının Örnek Kaynakları

Örnek kodu	Örnek adı	Hidrojen Çıkışları (%)
Otoklavlanmış – Küçük Partiküller		
1	PT İnokulum 1. gün	-
2	PT 8. gün çıkış	-
3	KF 1. gün	-
4	KF 2. gün	44
5	KF 8. gün çıkış	-
Otoklavlanmamış – Küçük Partiküller		
6	PT İnokulum 1. gün	-
7	KF 3. gün	17
8	PT 16. gün	-
9	KF inokulum 1.gün	-
10	KF 6. gün	13
11	KF 12. gün	-
Otoklavlanmış – Büyük Parça		
12	PT İnokulum 1. gün	-
13	PT 2. gün	26
14	PT 9. gün çıkış	-
15	KF inokulum 1.gün	-
16	KF 2. gün	36
17	KF 9. gün çıkış	-

Çizelge 4.2 NCBI veri tabanında taranan dizilerin Accession numaraları, Genbank % benzerlikleri ve reaktör örneklerinde bulunma durumları

Bant no	Organizma ismi ve Accession No	Genbank % Benzerlikleri	Otoklavlanmış Küçük Partiküller	Otoklavlanmamış Küçük Partiküller	Otoklavlanmış Büyük Partiküller
A	<i>C. butyricum</i> strain S4 (KY224082.1)	100	PT 1. gün KF 8. gün	PT 1. gün KF 1. gün KF 6. gün KF 12. gün	PT 1. gün KF 2. gün KF 9. gün
B	<i>L. mucosae</i> isolate LM56C (EF439693.1)	96	-	-	KF 1. gün KF 2. gün
C	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. (MF164162.1)	100	PT 8. gün	-	KF 2. gün PT 9. gün KF 9. gün
D	<i>C. pasteurianum</i> strain IFBG C6H (KU682660.1)	100	PT 1. gün KF 2. gün PT 8. gün KF 8. gün	KF 6. gün KF 12. gün KF 17. gün	PT 1. gün PT 2. gün KF 2. gün KF 9. gün
E	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. (LT624259.1)	100	PT 1. gün	-	KF 9. gün
F	<i>Bacillus</i> sp. strain C4 (MG461670.1)	94	KF 2. gün PT 8. gün	-	KF 9. gün
G	Uncultured prokaryote (HQ156025.1)	100	PT 8. gün	-	KF 1. gün
H	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. (LT624259.1)	100	KF 1. gün KF 2. gün PT 8. gün KF 8. gün	PT 1. gün KF 1. gün	PT 2. gün PT 9. gün
I	Uncultured bacterium (AB850286.1)	100	PT 8. gün	KF 6. gün PT 12. gün KF 12. gün	PT 1. gün
J	Uncultured <i>Clostridia</i> bacterium (LT858442.1)	100	PT 1. gün KF 1. gün KF 2. gün KF 8. gün	PT 1. gün KF 1. gün KF 6. gün KF 12. gün	PT 1. gün PT 2. gün
K	Uncultured bacterium (KX874905.1)	100	-	-	PT 1. gün
L	Uncultured bacterium (MF769086.1)	97	KF 1. gün KF 2. gün PT 8. gün KF 8. gün	PT 1. gün KF 1. gün KF 6. gün	PT 1. gün KF 1. gün KF 2. gün
M	Uncultured bacterium (MF769061.1)	100	PT 1. gün KF 1. gün KF 2. gün	PT 1. gün KF 1. gün KF 6. gün KF 12. gün KF 17. gün	PT 1. gün KF 1. gün
N	<i>Lactobacillus acidipiscis</i> strain Z73A (MG051209.1)	100	KF 2. gün PT 8. gün KF 8. gün	KF 6. gün KF 12. gün KF 17. gün	PT 1. gün



Şekil 4.2 DGGE bantlarından elde edilen sekans sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç

KF sisteminde mezofilik koşullar altında otoklavlanmış-küçük partiküller, otoklavlanmamış-küçük partiküller ve otoklavlanmış-büyük partiküller olmak üzere 3 set halinde çalışılan reaktör deneme setleri için ortak DGGE analizi yapılmıştır. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Clostridium* türlerine yakın benzerlikte olan *Uncultured bacterium* olduğu görülmüştür. Genel olarak tüm deneme setlerinde *Clostridium* ve *Lactobacillus* gruplarının baskın olduğu görülmüştür (Şekil 2 ve 3). En parlak olan bantlar (yoğun olan organizma türleri) A (*C. butyricum* strain S4), N (*L. acidipiscis* strain Z73A), F (*Bacillus* sp. strain C4), J (Uncultured *Clostridia* bacterium), M (Uncultured bacterium), H ve E (Uncultured *Clostridium* sp.) olarak DGGE jelinde tespit edilmiştir. DGGE bantlarında 1 ile 5 arasındaki bantlar otoklavlanmış küçük partiküller, 6 ile 11 arasındaki bantlar otoklavlanmamış küçük partiküller ve 12 ile 17 arasındaki bantlar ise otoklavlanmış büyük partiküller denemesine ait örnekleri göstermektedir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Otoklavlanmış küçük partiküller denemesinde Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1’de de gösterildiği gibi PT inokulum 1. gün örneğinde elde edilen bantlar ve benzerlikleri sırasıyla; A (*C. butyricum* strain S4), D (*C. pasteurianum* strain JCM 1408), J (Uncultured *Clostridia* bacterium), M (Uncultured bacterium) ve E (Uncultured *Clostridium* sp.) şeklindedir. KF 1. günde ise bantlar; L bantı Uncultured bacterium, H bantı Uncultured *Clostridium* sp., J bantı Uncultured *Clostridia* bacterium ve M bantı Uncultured bacterium ile benzerlik göstermektedir. Reaktör denemesinde maksimum hidrojenin (%44) üretildiği KF 2. günde N, D, L, H, J, M, A ve F bantları sırasıyla *L. acidipiscis* strain Z73A, *C. pasteurianum* strain JCM 1408, Uncultured bacterium, Uncultured *Clostridium* sp., Uncultured *Clostridia* bacterium, Uncultured bacterium, *C. butyricum* strain S4 ve *Bacillus* sp. strain C4 ile benzer olduğu görülmektedir. PT 8. gününde elde edilen bantlar ve benzerlikleri; N (*L. acidipiscis* strain Z73A), D (*C. pasteurianum* strain JCM 1408), L (Uncultured bacterium), I (Uncultured bacterium), H (Uncultured *Clostridium* sp.), G (Uncultured prokaryote), F (*Bacillus* sp. strain C4) ve C (*Bifidobacterium animalis* subsp.) şeklindedir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1). Reaktörün denemesinin son çıkış örneği olan KF 8. günde ise; A bantı ile *C. butyricum* strain S4, N bantı ile *L. acidipiscis* strain Z73A, D bantı ile *C. pasteurianum* strain JCM 1408, L bantı ile Uncultured bacterium, H bantı ile Uncultured *Clostridium* sp., J bantı ile Uncultured *Clostridia* bacterium ve M bantı ile Uncultured bacterium benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesinde PT inokulum 1. gün örneğindeki bantlar A, L, H, J ve M ve sırasıyla benzerlikleri; *C. butyricum* strain S4, Uncultured bacterium, Uncultured *Clostridium* sp., Uncultured *Clostridia* bacterium ve Uncultured bacterium’dur. KF inokulum 1. gününde ise; elde edilen bantlar ve benzerlikleri sırasıyla, A (*C. butyricum* strain S4), L (Uncultured bacterium), H (Uncultured *Clostridium* sp.), J (Uncultured *Clostridia* bacterium) ve M (Uncultured bacterium) şeklindedir. KF 6. günde hidrojenin %13 oranında üretildiği örnekte bantlar A, N, D, L, I, J ve M olup; benzerlikleri sırasıyla *C. butyricum* strain S4, *L. acidipiscis* strain Z73A, *C. pasteurianum*, Uncultured bacterium, Uncultured bacterium, Uncultured *Clostridia* bacterium ve Uncultured bacterium şeklindedir. PT 12. gününde

bant profili çok zayıf olup; sadece I bantı elde edilmiştir. Bu bantta Uncultured bacterium benzerlik göstermektedir. KF 12. günde ise; A (*C. butyricum* strain S4), N (*L. acidipiscis* strain Z73A), D (*C. pasteurianum* strain JCM 1408), L (Uncultured bacterium), I (Uncultured bacterium), J (Uncultured *Clostridia* bacterium) ve M (Uncultured bacterium) bantları elde edilmiştir. Hidrojen çıkışının en yüksek olduğu (%17) reaktör denemesinin KF 17. gün örneğinde N bantı *L. acidipiscis* strain Z73A, D bantı *C. pasteurianum* strain JCM 1408, L bantı Uncultured bacterium ve M bantı Uncultured bacterium ile benzerlik göstermektedir.

Son olarak otoklavlanmış büyük partiküller reaktör denemesinde ise; PT inokulum 1. gün örneğinde A (*C. butyricum* strain S4), N (*L. acidipiscis* strain Z73A), D (*C. pasteurianum* strain JCM 1408), L (Uncultured bacterium), I (Uncultured bacterium), J (Uncultured *Clostridia* bacterium) ve M (Uncultured bacterium) bantları elde edilmiştir. KF inokulum 1. günde L bantı Uncultured bacterium, M bantı Uncultured bacterium, G bantı Uncultured prokaryote ve B bantı *L. mucosae* isolate LM56C ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Hidrojenin %26 oranında üretildiği PT 2. günde bant profili zayıf olup; D, H ve J bantları elde edilmiştir. Benzerlikleri sırasıyla; *C. pasteurianum* strain JCM 1408, Uncultured *Clostridium* sp. ve Uncultured bacterium'dur. KF 2. gün örneğinde hidrojen en yüksek miktarda (%36) üretilmiş olup; A (*C. butyricum* strain S4), D (*C. pasteurianum* strain JCM 1408), L (Uncultured bacterium), C (*Bifidobacterium animalis* subsp.), F (*Bacillus* sp. strain C4) ve B (*L. mucosae* isolate LM56C) bantları elde edilmiştir. Bant profilinin en zayıf olduğu PT 9. gününde ise; H ve C bantları elde edilmiştir. Bu bantların benzerlikleri sırasıyla; Uncultured *Clostridium* sp. ve *Bifidobacterium animalis* subsp. olduğu görülmektedir. KF 9. günde ise; A bantı ile *C. butyricum* strain S4, D bantı ile *C. pasteurianum*, E bantı ile Uncultured *Clostridium*, C bantı ile *Bifidobacterium animalis* subsp., F bantı ile *Bacillus* sp. strain C4 benzerlik göstermektedir.

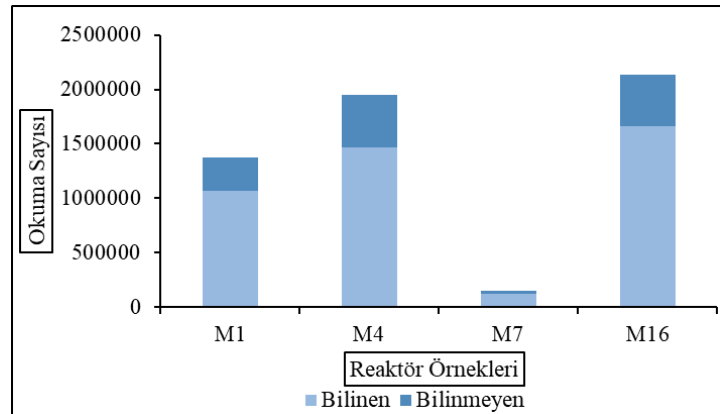
4.1.2 Metagenom Analizi Sonuçları

KF sisteminde 3 ayrı reaktör denemesinden (otoklavlanmış-küçük partiküller, otoklavlanmamış-küçük partiküller ve otoklavlanmış-büyük partiküller) alınan örneklerde hidrojenin en yüksek üretildiği ve aş örneklere seçilmiştir. Bu örneklerdeki hidrojen üreticilerini belirlemek ve mikrobiyal profillerdeki değişimleri incelemek amacıyla metagenom analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.3'te metagenom analizleri yapılan reaktör örneklerinin isimleri, çalışma kodları ve hidrojen çıkışları verilmiştir.

Çizelge 4.3 Metagenom analizleri yapılan reaktör örnekleri, çalışma kod isimleri ve hidrojen çıkışları

Örnek Kodu	Örnek Adı	Hidrojen Çıkışı (%)
M1	Aşı	-
M4	Otoklavlanmış Küçük Partiküller – KF 2. gün	44
M7	Otoklavlanmamış Küçük Partiküller – PT 3. gün	17
M16	Otoklavlanmış Büyük Partiküller – KF 2. gün	36

Kalite kontrolünden geçen okumalar, farklı taksonomik seviyelerde en yüksek benzerlik gösteren taksonomik birime atanmıştır. Şekil 4.3'te verilen grafikte, her bir örnekte tespit edilen toplam okuma sayıları ve cins seviyesine kadar bir taksonomik birime tanımlanmış (açık mavi renkli) okumalar gösterilmiştir. Koyu mavi renkli okumalar, cins seviyesinden daha üst taksonomik birime atanmış okumaları göstermektedir (Şekil 4.3).



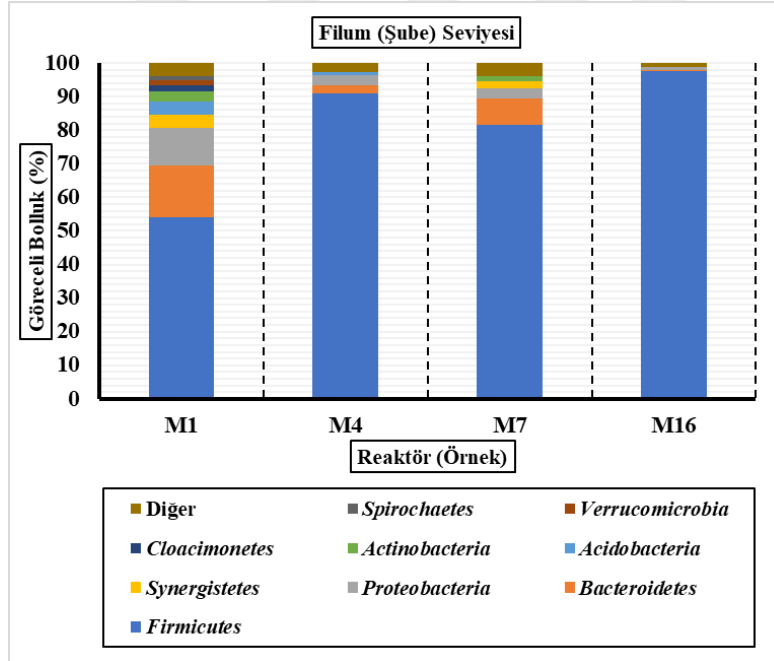
Şekil 4.3 Reaktör örneklerinin toplam okuma sayıları ile bilinen ve bilinmeyen taksonomik seviyeleri

Her bir reaktör örneğine ait okumaların farklı taksonomik basamaklardaki birimlere ne oranda tanımlanabildiği Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Tür seviyesindeki düşüş 16S rDNA temelli çalışmalarda beklenen bir durumdur. Gen üzerindeki seçilen değişken bölgeleri açısından çoğu türlerin farklılık göstermemesinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.4 Her bir taksonomik basamağa atanabilen okumaların sayısı

Örnek Adı	Alem	Filum	Sınıf	Takım	Familya	Cins	Tür
M1	236342	224918	207400	204629	197178	177331	122567
M4	298899	295398	291494	290492	287258	279013	210327
M7	24058	23788	23228	23177	22478	20805	12723
M16	334653	333648	332291	331813	329992	317790	158759

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 50 şube tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen filumlar Şekil 4.4'teki grafikte gösterilmiştir.

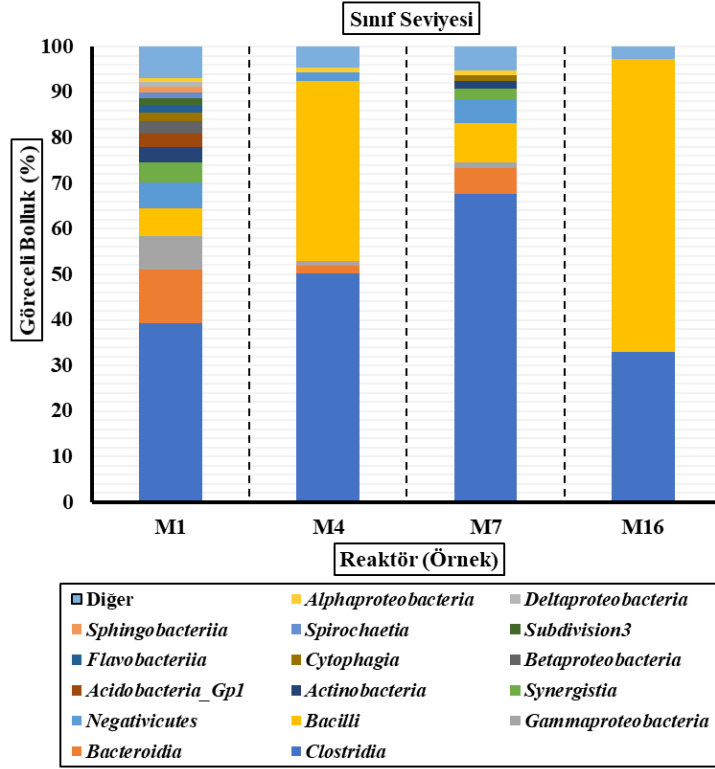


Şekil 4.4 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen filum seviyeleri

M1, M4, M7 ve M16 örneklerine ait filum seviyelerinin gösterildiği Şekil 4.4'te çeşitliliğin en fazla olduğu örnek M1 (aşı) örneğidir. Tüm reaktör denemelerinde aşı olarak kullanılan M1'de en bol bulunan *Firmicutes* filumunun seviyesi %54,14 oranında olduğu görülmektedir. *Firmicutes*

filumunu, %15,41 oranında olan *Bacteroidetes* ve %11,14 oranında *Proteobacteria* filumları takip etmektedir. M1’de bulunan diğer filumlar ise; *Synergistetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*’dir. Bu filumların bolluk oranları sırasıyla; %4; %3,76; %3, %1,8; %1,5 ve %1,11’dir. %4 oranında ise diğer filumlar bulunmaktadır. Hidrojenin en yüksek üretildiği (%44) M4 örneğinde ise; baskın olarak bulunan filum %90,9 oranında *Firmicutes*’dir. Bu örnekte; %2,46 oranında *Bacteroidetes*, %2,86 oranında *Proteobacteria* ve %1,05 oranında *Acidobacteria* filumları tespit edilmiştir. %2,69 oranı ise diğer filumların bolluğunu göstermektedir (Şekil 4.4). M7 örneğinde %17 hidrojen üretimi gerçekleşmiştir ve bu üretimde rol alan filum %81,44 oranında bulunan yine *Firmicutes*’dir. *Firmicutes* filumunu %8 *Bacteroidetes*, %2,96 *Proteobacteria*, %2,09 *Synergistetes*, %1,64 *Actinobacteria* ve %3,84 diğer filumlar takip etmektedir. Son olarak; %36 hidrojen üretiminin olduğu M16 örneğinde diğer reaktör örneklerine benzer şekilde en bol olan filum %97,44 oranında *Firmicutes*’dir. Bu reaktör örneğinde *Firmicutes* filumu dışında %1 oranında *Proteobacteria* ve %1,19 oranında ise diğer filumların bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.4).

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 91 sınıf tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen sınıflar Şekil 4.5’teki grafikte gösterilmiştir.

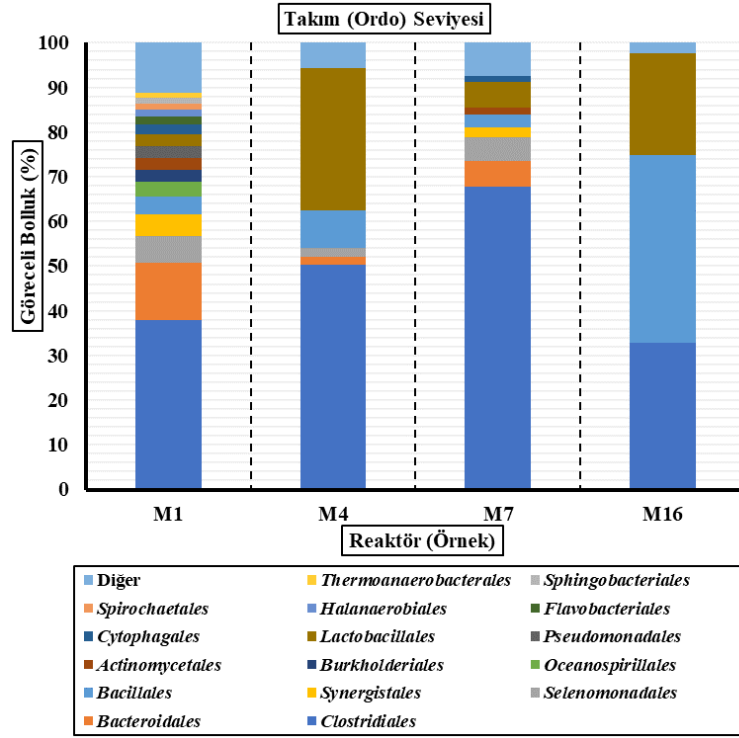


Şekil 4.5 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen sınıf seviyeleri

Sınıf seviyelerinin gösterildiği Şekil 4.5'te M1'de en bol bulunan sınıflar şu şekildedir; %39,25 oranında *Clostridia* sınıfı, %11,17 oranında *Bacteroidia* ve %7,23 oranında *Gammaproteobacteria*'dır. M1'de bu sınıfları *Bacilli* (%6,13), *Negativicutes* (%5,64), *Synergistia* (%4,49), *Actinobacteria* (%3,36), *Acidobacteria Gp1* (%2,91), *Betaproteobacteria* (%2,62), *Cytophagia* (%2), *Flavobacteriia* (%1,73), *Subdivision3* (%1,4), *Spirochaetia* (%1,24), *Sphingobacteriia* (%1,18), *Deltaproteobacteria* (%1), *Alphaproteobacteria* (%0,96) ve diğer sınıfların (%6,84) bulunduğu görülmektedir. M4 reaktör örneğinin mikrobiyal profilinin %50'sini *Clostridia* sınıfının oluşturduğu Şekil 4.5'te görülmektedir. Diğer %50'lik dilimin %39,64'lük oranını *Bacilli* sınıfı oluşturmaktadır. Bu reaktör örneğinin %1,79'unu *Negativicutes*, %1,75'ini *Bacteroidia*, %1'ini *Gammaproteobacteria* ve %4,67'sini ise diğer sınıflar oluşturmaktadır. M7 reaktör örneğinde ise; *Clostridia* sınıfı %67,60 oranında en bol bulunan sınıf olduğu tespit edilmiştir. Bu reaktör örneğinde bulunan diğer sınıflar ise; *Bacteroidia* (%5,77), *Gammaproteobacteria* (%1,21), *Bacilli* (%8,68), *Negativicutes* (%5,25), *Synergistia* (%2,17), *Actinobacteria* (%1,7),

Cytophagia (%1,22) ve *Alphaproteobacteria* (%1,11)'dir. Son olarak M16 reaktör örneğinde sadece 2 sınıfın baskın olarak bulunduğu görülmüştür. Bu sınıflar %64,44 oranında *Bacilli* ve %32,92 oranında *Clostridia*'dır. %2,62 oranında ise diğer sınıflar bulunmaktadır (Şekil 4.5).

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 126 takım tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen takımlar Şekil 4.6'daki grafikte gösterilmiştir.

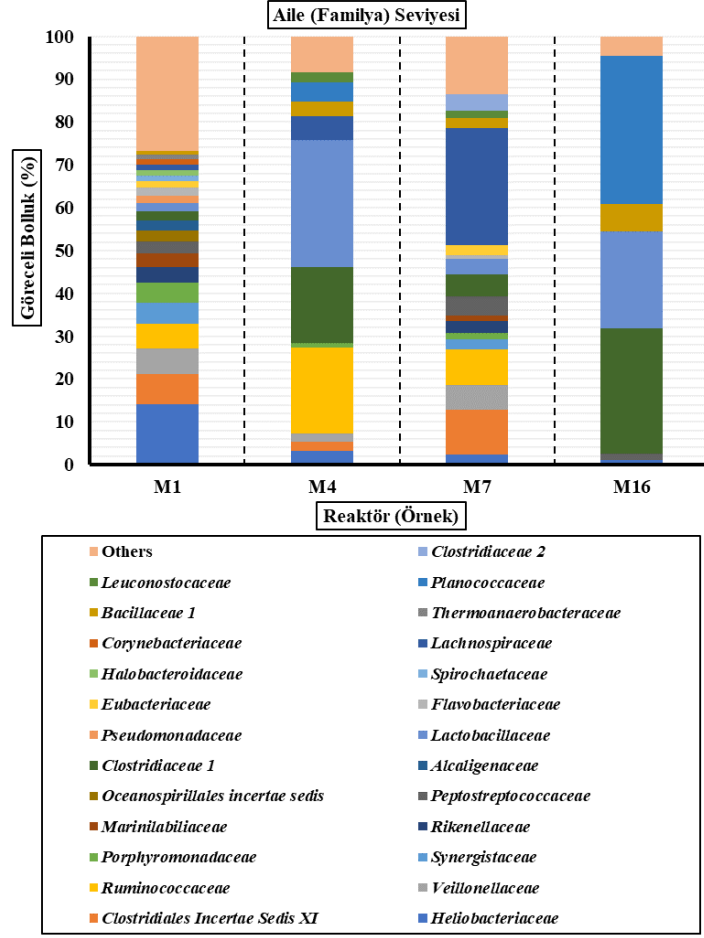


Şekil 4.6 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen takım seviyeleri

M1, M4, M7 ve M16 reaktör örneklerine ait takım seviyelerinin gösterildiği grafikte M1'de %37,89 oranında *Clostridiales* takımı en yüksek seviyede bulunmaktadır. Aşı örneği olan M1'in %12,75 *Bacteroidales*. %6 *Selenomonadales*, %4,84 *Synergistales*, %3,96 *Bacillales*, %3,29 *Oceanospirillales*, %2,74 *Burkholderiales*, %2,66 *Actinomycetales*, %2,66 *Pseudomonadales*, %2,52 *Lactobacillales*, %2,18 *Cytophagales*, %1,86 *Flavobacteriales*, %1,53 *Halanaerobiales*, %1,34 *Spirochaetales*, %1,28 *Sphingobacteriales* ve %1,17 *Thermoanaerobacterales* takımları oluşturmaktadır. Bu aşı örneğinin (M1) takım seviyelerinin geriye kalan

%11,15'ini ise diğer takımlar oluşturmaktadır. M4 reaktör örneğinde *Clostridiales* (%50,37) ve *Lactobacillales* (%31,86) takımlarının baskın olduğu Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu örnekte; *Bacillales* takımının %8,48 oranında, *Selenomonadales* takımının %1,82 oranında ve *Bacteriodales* takımının %1,79 oranında bulundukları tespit edilmiştir. Diğer takımların toplam bolluk oranları ise %5,65'tir. *Clostridiales* (%67,68) takımının en bol bulunduğu M7 reaktör örneğinde ise; *Bacteroidales* (%5,83), *Lactobacillales* (%5,80), *Selenomonadales* (%5,31), *Bacillales* (%2,93), *Synergistales* (%2,19), *Actinomycetales* (%1,51), *Cytophagales* (%1,23) takımları bulunmaktadır. Diğer mevcut takımlar ise %7,46 oranında tespit edilmiştir. M16 reaktör örneğinde ise; mikrobiyal profilin %41,9'unu *Bacillales* takımı oluşturmaktadır. Diğer baskın olan takımlar; %32,91 oranında *Clostridiales* ve %22,82 oranında *Lactobacillales*'tir (Şekil 4.6).

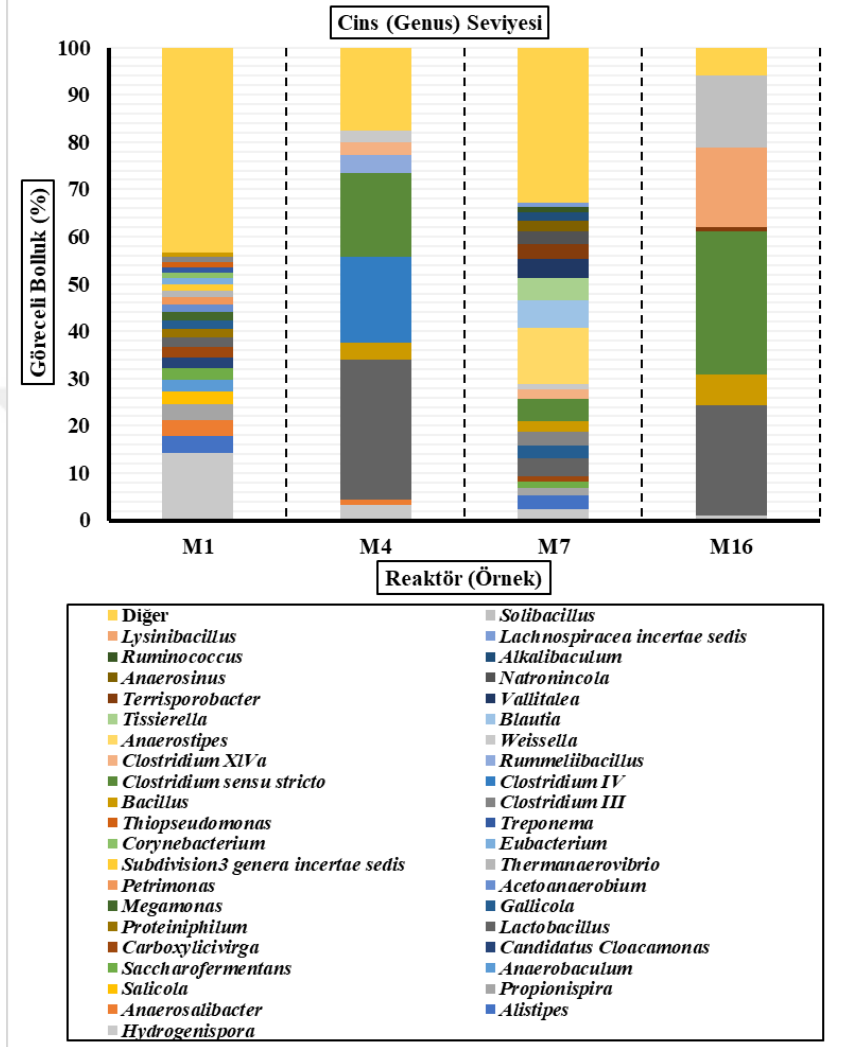
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 311 aile tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen aileler (familya) Şekil 4.7'deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen aile (familya) seviyeleri

Aile seviyelerinin verildiği Şekil 4.7’de M1 aşısı örneğinde %14 oranında olan *Heliobacteriaceae* en baskın olan ailedir. Bu aileyi takip eden ilk üç aile ise; *Clostridiales incertae sedis XI* (%7), *Veillonellaceae* (%6) ve *Ruminococcaceae* (%5,72)’dir. M4 reaktör örneğinde %29,67 oranında *Lactobacillaceae*, %20,17 oranında *Ruminococcaceae* ve %17,82 oranında *Clostridiaceae 1* baskın olan aileler olduğu görülmektedir. M7 reaktör örneğinde %27,32 oranında *Lachnospiraceae* ve %10,45 oranında *Clostridiales incertae sedis XI* ailelerinin baskın olduğu tespit edilmektedir. Reaktör denemeleri arasında en düşük hidrojen üretiminin gerçekleştiği M7 örneğinin %8,35’i *Ruminococcaceae*, %5,66’sı *Veillonellaceae*, %5’i *Clostridiaceae 1* ve %3,62’si *Lactobacillaceae*’dir. M16 reaktör örneğinde ise; *Clostridiaceae 1* (%29,29) ve *Lactobacillaceae* (%22,5) ailelerinin en bol bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 1350 cins tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen cinsler Şekil 4.8'deki grafikte gösterilmiştir.

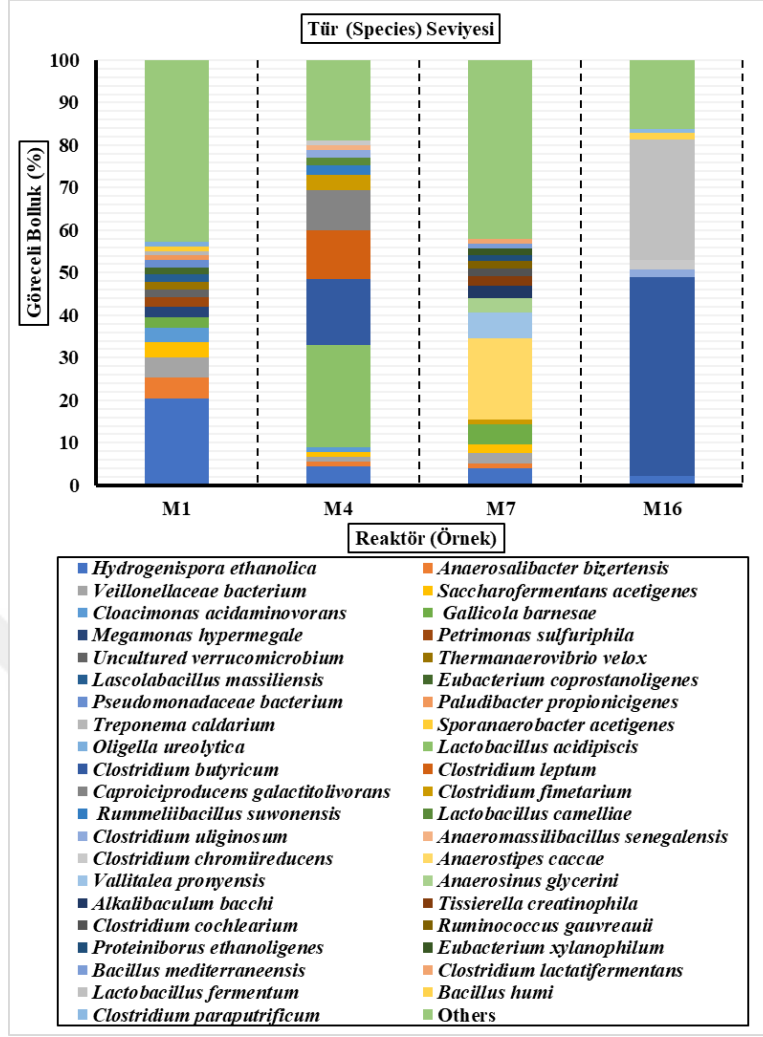


Şekil 4.8 Reaktör örneklerine ait metagenomik analiz sonucunda elde edilen cins seviyeleri

Cins seviyelerinin gösterildiği Şekil 4.8'de en fazla çeşitliliğin bulunduğu M1 aşısı örneğinde %14,17 oranında *Hydrogenispora* en bol bulunan genustur. M1'de bulunan diğer genuslar; *Alistipes* (%3,76), *Anaerosalibacter* (%3,35), *Propionispira* (%3,29), *Salicola* (%2,61), *Anaerobaculum* (%2,51), *Saccharofermentans* (%2,44), *Candidatus Cloacamonas* (%2,31), *Carboxylicivirga* (%2,28), *Lactobacillus* (%1,91), *Proteiniphilum* (%1,87), *Gallicola* (%1,79), *Megamonas* (%1,67), *Acetoanaerobium* (%1,64), *Petrimonas* (%1,61), *Thermanaerovibrio* (%1,32), *Subdivision3 genera incertae sedis* (%1,3), *Eubacterium* (%1,26),

Corynebacterium (%1,17), *Treponema* (%1,17), *Thiopseudomonas* (%1,13), *Clostridium* III (%1,09), *Bacillus* (%1) ‘tur. M4 reaktör örneğinde en bol bulunan genuslar; %29,75 oranında *Lactobacillus*, %18,2 oranında *Clostridium* IV ve %17,59 oranında *Clostridium sensu stricto* ‘dur (Şekil 4.8). M4’te bulunan diğer genuslar; *Rummeliibacillus* (%3,79), *Bacillus* (%3,54), *Hydrogenispora* (%3,27), *Clostridium* XIVa (%2,89), *Weissella* (%2,28) ve *Anaerosalibacter* (%1) şeklindedir. M7 reaktör örneğinde *Anaerostipes* genusu %11,97 oranında en bol bulunan genustur. Bu reaktör örneğinde %5,83 *Blautia*, %4,64 *Clostridium sensu stricto*, %4,65 *Tissierella*, %3,95 *Vallitalea*, %3,68 *Lactobacillus*, %3,15 *Terrisporobacter*, %2,89 *Clostridium* III, %2,83 *Natronincola*, %2,8 *Alistipes*, %2,75 *Gallicola*, %2,45 *Hydrogenispora*, %2,24 *Bacillus*, %2,11 *Clostridium* XIVa, %2 *Anaerosinus*, %1,84 *Alkalibaculum*, %1,63 *Propionispira*, %1,27 *Saccharofermentans*, %1,22 *Carboxylicivirga*, %1,1 *Ruminococcus* ve %1 *Weissella* genusları bulunmaktadır. Son olarak M16 örneğinde bulunan genuslar şu şekildedir; *Clostridium sensu stricto* (%30,2), *Lactobacillus* (%23,2), *Lysinibacillus* (%16,8), *Solibacillus* (%15,11), *Bacillus* (%6,59), *Hydrogenispora* (%1) ve *Terrisporobacter* (%1)’dir (Şekil 4.8).

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 2475 tür tespit edilmiştir. %1 ve daha büyük oranda görülen türler Şekil 4.9’daki grafikte gösterilmiştir.

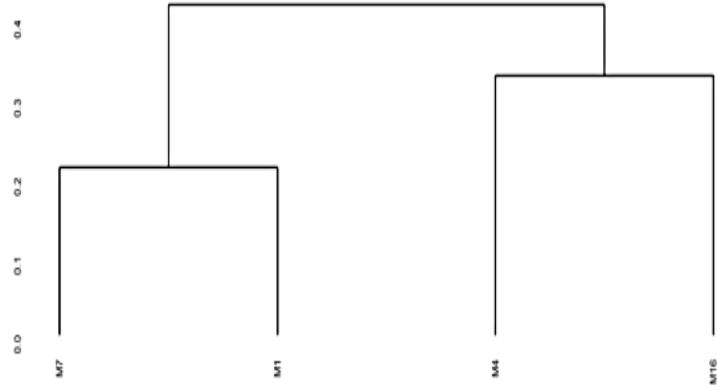


Şekil 4.9 Reaktör örneklerine ait metagenom analizi sonucunda elde edilen tür seviyeleri

Şekil 4.9’da verilen grafikte M1, M4, M7 ve M16 reaktör örneklerine ait mikrobiyal profillerin tür seviyeleri gösterilmektedir. M1 aşı örneğinde %20 oranında *Hydrogenispora* genusundan *Hydrogenispora ethanolica* (AB669474) türü en fazla bulunan türdür. Aşı örneğinde diğer en bol bulunan türler; %4,83 oranında *Anaerosalibacter* genusundan *Anaerosalibacter bizertensis* (HQ534365), %4,75 oranında *Propionispira* genusundan *Veillonellaceae bacterium* (AB298743) ve %3,53 oranında *Saccharofermentans* genusundan *Saccharofermentans acetigenes* (AY949857) ‘tir. M4 reaktör örneğinin %23,96’sı *L. acidipiscis* (NR 112693.1), %15,72’si *C. butyricum* (AJ458420) ve %11,29’unu *C. leptum* (AJ305238) oluşturmaktadır. Bu örnekte bulunan diğer türler; %9,56 *Caproiciproducens galactitolivorans* (NR 145929.1), %4,35 *H. ethanolica* (AB669474), %3,51 *C. fimetarium* (AF126687), %2,33 *Rummeliibacillus*

suwonensis (KC677630), %1,85 *Rummeliibacillus pycnus* (AB271739), %1,82 *L. camelliae* (AB257864), %1,8 *C. uliginosum* (AJ276992), %1,32 *Anaerosalibacter bizertensis* (HQ534365), %1,25 *S. acetigenes* (AY949857), %1,1 *Anaeromassilibacillus senegalensis* (NR 144727.1), %1 *C. chromiireducens* (AY228334) ve %1 *Cloacimonas acidaminovorans* (CU466930)'dır (Şekil 4.9). M7 reaktör örneğinde *Anaerostipes* genusundan *Anaerostipes caccae* (AJ270487) türü %19,19 oranında en fazla bulunan türdür. Bu reaktör örneğinde %5,93 oranında *Vallitalea pronyensis* (KC876639), %4,51 oranında *Gallicola barnesae* (AB038361), %4 oranında *H. ethanolica* (AB669474) ve %3,38 oranında *Anaerosinus glycerini* (AJ010960) diğer bulunan türler arasındadır. Son olarak M16 reaktör örneğinde ise mikrobiyal profilin %46,93'ünü *C. butyricum* (AJ458420) ve %28,28'ini *L. fermentum* (JN175331) türleri oluşturmaktadır. M16'da bulunan diğer türler; %2,18 *C. chromiireducens* (AY228334), %2,12 *H. ethanolica* (AB669474), %1,72 *C. uliginosum* (AJ276992), %1,54 *Bacillus humi* (AJ627210) ve %1 *C. parapatrificum* (X75907) 'dur (Şekil 4.9).

Şekil 4.10'da reaktör deneme örneklerine ait hiyerarşik kümelemesi gösterilmektedir. Hiyerarşik kümelemede benzer mikrobiyal profil dağılımı gösteren örnekler birbirine yakın dallarda gösterilmektedir. Hiyerarşik kümeleme hesaplanmasında cins basamağındaki mikrobiyal profil esas alınmış; analiz için R hclust paketi kullanılmış ve grup ortalaması esas alınmıştır.



Şekil 4.10 Metagenom analizi sonucunda reaktör denemelerinin örneklerine ait hiyerarşik kümelenmesi

Şekil 4.10’da verilen hiyerarşik kümelemede aşı örneğinin (M1) ve M4, M7, M16 reaktör örneklerinin birbirleriyle olan benzerlikleri gösterilmektedir. Bu analiz sonucunda M7 reaktör örneğinin aşı örneğiyle yakın benzerlikte olduğu görülmektedir. Hidrojenin yüksek üretildiği M4 (%44 H₂) ve M16 (%36 H₂) reaktör örneklerinin de birbiriyle yakın ilişkide oldukları tespit edilmiştir.

Çeşitlilik endeksi (filogenetik endeksler veya filogenetik metrikler olarak da adlandırılır), bir veri kümesinde (bir toplulukta) kaç farklı türün (tür gibi) bulunduğunu ve aynı zamanda dağıtılan bireyler arasındaki filogenetik ilişkileri (eş-dağılım, tür yakınlığı, tür zenginliğini) yansıtan nicel bir ölçüdür. Bu tez çalışması kapsamında, çeşitlilik hesaplamasında Shannon endeksi 6 kullanılmıştır. Çizelge 4.5’te, her bir türün Shannon, Simpson ve Inverse Simpson endeksleri ve tespit edilen türlerin sayısı belirtilmiştir. Endekslerin hesaplanmasında R:vegan paketi kullanılmıştır (Oksanen et al., 2019).

Çizelge 4.5 Reaktör denemelerinde örneklerle ait her bir türün Shannon, Simpson ve Inverse Simpson endeksleri ve tespit edilen türlerin sayısı

Örnek Adı	Shannon Endeksi	Simpson Endeksi	Inverse Simpson Endeksi	Tür Sayısı
M1	4,5	0,95	18,49	1963
M4	3,13	0,89	9,1	1262
M7	4,32	0,95	19,7	679
M16	2,12	0,7	3,31	984

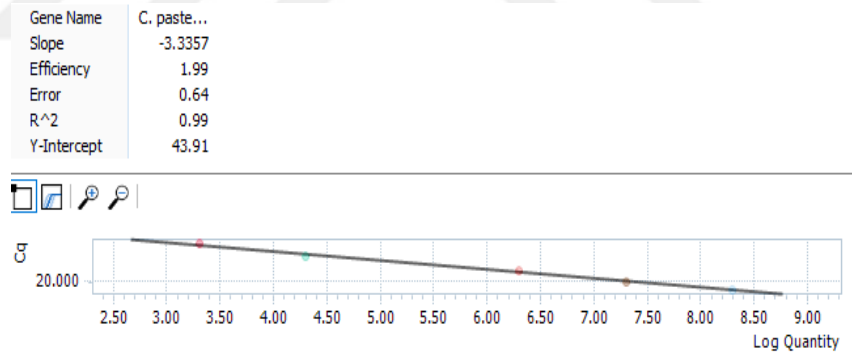
Çizelge 4.5’te, her bir örneğin Shannon, Simpson ve Inverse Simpson endekslerine göre filogenetik ilişkileri ve tür sayıları verilmiştir. Buna göre; M1 aşı örneği en fazla tür çeşitliliğine sahip örnektir. 1292 adet tür sayısı ile M4 reaktör örneği de aşı örneği gibi fazla tür çeşitliliğine sahiptir. M16 reaktör örneğinde 984 adet tür bulunurken, tür sayısının en az olduğu M7 örneğinde ise 679 adet tür tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

4.2 Real-Time PCR Analizlerinin Sonuçları

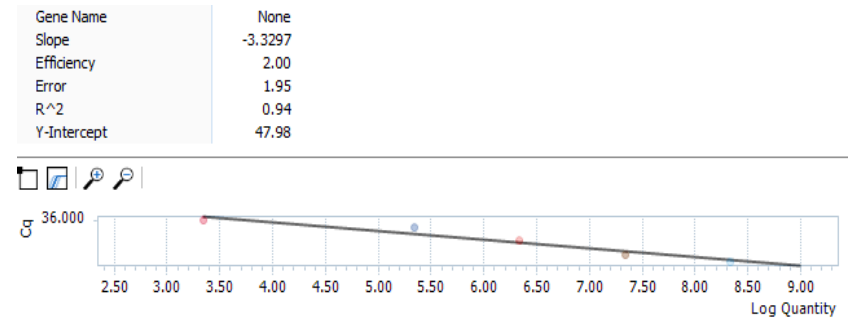
Kalitatif ve kantitatif sonuçların elde edilmesi için hidrojen üretiminde sorumlu olan *Clostridium* türlerine ait primer çiftleri ile Real-time

PCR’da KF ve PT sisteminden alınan örnekler çalışılmıştır. Kantitatif sonuçların belirlenmesi için; DSMZ’den satın alınan *Clostridium* türlerinden *C. pasteurianum* (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702), *C. tyrobutyricum* (DSM-2637) izole edilen plazmid DNA’larından her bir primer seti için ayrı ayrı Real-time PCR’da seyreltmeleri yapılarak standart eğri grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Standart eğrinin oluşturulabilmesi için her bir plazmidin gen kopya sayısı (a) formülü ile hesaplanmıştır. Plazmid DNA’ları $10^9 - 10^2$ arasında seyreltilmiştir. Daha sonra KF sisteminden ve PK’dan alınan örnekler tüm gen bölgeleri için ayrı ayrı Real-time PCR’da çalışılmıştır ve örneklerdeki gen kopya sayıları hesaplanmıştır. Tüm primer setlerinde örnekler çalışılırken; standart eğri oluşturma aşamasında kullanılan her bir gen bölgesi için oluşturulan 10^6 ’lık seyreltmeler, her çalışılan PCR reaksiyonunda o çalışmanın referans standartı olarak kullanılmıştır.

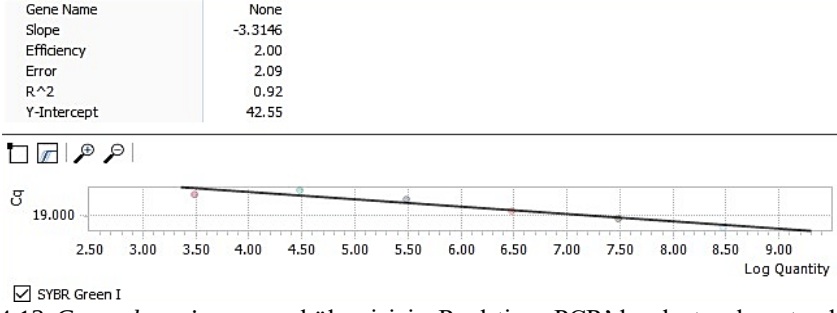
$$(a) \quad \text{DNA kopya sayısı} = \frac{\text{Kütle (gr)} \times \text{Avagadro Sayısı}}{\text{bazın ortalama mol ağırlığı} \times \text{bölge uzunluğu}}$$



Şekil 4.11 *C. pasteurianum* gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği



Şekil 4.12 *C. butyricum* gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği



Şekil 4.13 *C. tyrobutyricum* gen bölgesi için Real-time PCR’da oluşturulan standart eğri grafiği

4.2.1 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait Real Time PCR analizi sonuçları

Kuru fermentör sistemindeki sonuçlara bakıldığında otoklavlanmış küçük partiküller denemesinde KF 2. gün’e ait hidrojen verimleri en yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek hidrojen çıkışı %44 olarak belirlenmiştir. Özellikle hidrojen çıkışı en yüksek ve en düşük anda alınan örneklerden DGGE analizi için mikrobiyal profilin belirlenmesinin yanında kalitatif ve kantitatif değerlendirme için Real-time PCR yapılmıştır. Örneklere ait kodlamalar ve hidrojen çıkışlarının belirtildiği *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*’a ait kalitatif ve kantitatif sonuçlar Çizelge 4.6, Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14’da gösterilmiştir (215M314 nolu TÜBİTAK projesi çıktıları kullanılmıştır).

Çizelge 4.6 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif sonuçları ve Tm dereceleri (°C)

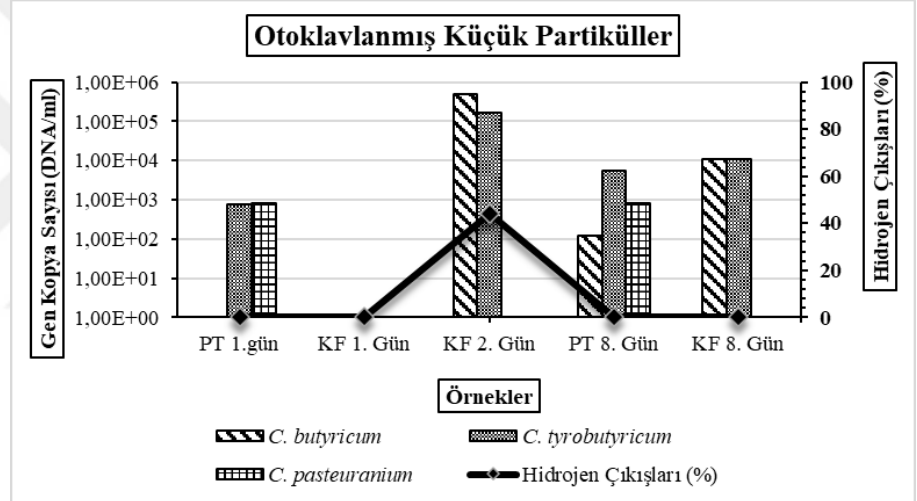
Örnekler	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>		<i>C. tyrobutyricum</i>	
	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)
Saf Kültürler	28	79,86	17	78,47	21	81,97
PT 1. gün	36	80.87	32	78,21	36	81,95
KF 1. gün	-	-	-	-	-	-
KF 2. gün	32	80.74	17	78,32	31	82
PT 8. gün	-	-	32	78,45	25	81,65
KF 8. gün	-	-	21	78,44	20	82

Çizelge 4.6’da otoklavlanmış küçük partiküller reaktör denemesine ait örneklerin Real Time PCR kalitatif sonuçları ve Tm dereceleri verilmiştir. Sadece KF 1. gün örneğinde gen bölgelerinin hepsinde negatif sonuç elde edilmiştir. Diğer günlerin örneklerinde ise *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*

ait gen bölgelerinin varlığı tespit edilmiştir. *C. pasteurianum*'a ait gen bölgesi ise sadece PT 1. gün ve KF.2 gün örneklerinde pozitif sonuç vermiştir. Diğer günlerde *C. pasteurianum* bulunmamıştır. Real Time PCR analizleri sonucunda *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*'a ait gen bölgelerinin yaklaşık Tm dereceleri sırasıyla 80 °C, 78,47 °C ve 82 °C'dir.

Çizelge 4.7 Otoklavlanmış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı DNA/mL)

Örnekler	<i>C. pasteurianum</i> gen kopya sayısı	<i>C. butyricum</i> gen kopya sayısı	<i>C. tyrobutyricum</i> gen kopya sayısı
PT 1. gün	8,13E+02	-	7,76E+02
KF 1. gün	-	-	-
KF 2. gün	-	4,84E+05	1,68E+05
PT 8. gün	8,33E+02	1,20E+02	5,48E+03
KF 8. gün	-	1,06E+04	1,06E+04



Şekil 4.14 Otoklavlanmış küçük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların gen kopya sayılarının karşılaştırılması

Otoklavlanmış küçük partiküllerin denendiği reaktör düzeneğinden perkolasyon tankından 1. günde alınan örnekte *C. pasteurianum* gen kopya sayısı $8,13 \times 10^2$ DNA/mL ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayısı $7,76 \times 10^2$ DNA/mL olarak ölçülmüştür. Bu örnekte *C. butyricum* gen kopya sayısı 10^2 mertebesinin altında ölçülmüştür. Kuru fermentörün 1. gününde alınan örnekte ise bu organizmaların DNA'larına rastlanmamıştır. Kuru fermentörün 2. gününde alınan örnekte %44 hidrojen üretimini olmuştur. Bugün de *C. pasteurianum* DNA'sına rastlanmamıştır. *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayıları ise sırasıyla $4,84 \times 10^5$ DNA/mL ve $1,68 \times 10^5$ DNA/mL olarak ölçülmüştür. Perkolasyon tankından 8. günde alınan örnekte

ise; *C. pasteurianum* gen kopya sayısı $8,33 \times 10^2$ DNA/mL olarak ölçülürken; *C. butyricum* gen kopya sayısı $1,2 \times 10^2$ DNA/mL ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayısı $5,48 \times 10^3$ DNA/mL miktarlarında tayin edilmiştir. Kuru fermentörün çıkış örneği olan 8. günde ise *C. butyricum*'un gen kopya sayısı $1,06 \times 10^4$ DNA/mL ve *C. tyrobutyricum*'un gen kopya sayısı $1,06 \times 10^4$ DNA/mL olarak ölçülürken, *C. pasteurianum* DNA'sına rastlanmamıştır (Şekil 4.14).

4.2.2 Otoklavlanmamış Küçük Partiküller Denemesi Real Time PCR Analizi Sonuçları

Otoklavlanmamış küçük partiküllere ait örneklerde Real Time PCR ile kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır. Örneklerle ait kodlamalar ve hidrojen çıkışlarının belirtildiği *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*'a ait kalitatif ve kantitatif sonuçlar Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Şekil 4.15'de gösterilmiştir (215M314 nolu TÜBİTAK projesi çıktıları kullanılmıştır).

Çizelge 4.8 Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif sonuçları ve Tm dereceleri (°C)

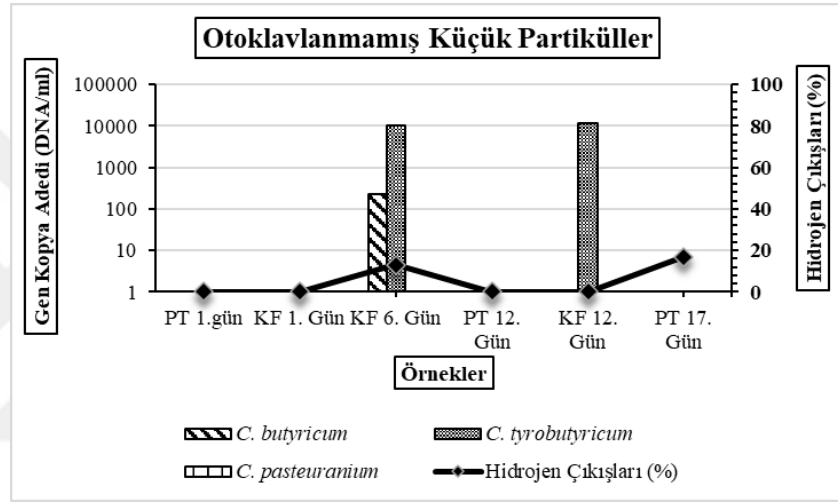
Örnekler	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>		<i>C. tyrobutyricum</i>	
	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)
Saf Kültürler	28	79,86	17	78,47	21	81,97
PT 1.gün	-	-	-	-	-	-
KF 1. gün	-	-	-	-	-	-
KF 6. gün	-	-	28	78,37	29	82
PT 12. gün	-	-	-	-	-	-
KF 12. gün	-	-	29	78,39	28	82
PT 17. gün	-	-	-	-	-	-

Kalitatif sonuçların verildiği Çizelge 4.8'de en yüksek hidrojen üretiminin 17. günde negatif sonuç alınmıştır. Hidrojenin %13 olduğu 6. günde ise; bu set için çalışan gen bölgelerine ait kopya sayılarının en yüksek olduğu gün olarak tespit edilmiştir. *C. pasteurianum* ait gen bölgesine bu reaktör denemesinde rastlanmamıştır. Diğer gen bölgeleri için ise sadece KF 6. gün ve KF 12. gün örneklerinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Real Time PCR analizleri sonucunda *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ve *C.*

tyrobutyricum 'a ait gen bölgelerinin yaklaşık Tm dereceleri sırasıyla 80 °C, 78,47 °C ve 82 °C'dir.

Çizelge 4.9 Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı/mL)

Örnekler	<i>C. pasteurianum</i> gen kopya sayısı	<i>C. butyricum</i> gen kopya sayısı	<i>C. tyrobutyricum</i> gen kopya sayısı
PT 1.gün	-	-	-
KF 1. gün	-	-	-
KF 6. gün	-	2,22E+02	1,03E+04
PT 12. gün	-	-	-
KF 12. gün	-	-	1,17E+04
PT 17. gün	-	-	-



Şekil 4.15 Otoklavlanmamış küçük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların gen sayılarının karşılaştırılması

Çizelge 4.9'da da görüldüğü gibi *C. pasteurianum* DNA'sına bu reaktör denemesi örneklerinde rastlanmamıştır. Hidrojen miktarının 6. günde artmasıyla (%17) birlikte *C. butyricum* gen kopya sayısı $2,22 \times 10^2$ DNA/mL ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayısı $1,03 \times 10^4$ DNA/mL'e yükseldiği görülmüştür. Kuru fermentörün 12. gününde *C. butyricum* gen kopya sayısı 100'ün altında değerlerde ölçülmüştür. *C. tyrobutyricum*'a ait gen kopya sayısı ise $1,17 \times 10^4$ DNA/mL olarak tayin edilmiştir. Hidrojenin %13 değerlerinde elde edildiği perkolasyon tankının 17. gününde ise *Clostridium*'a ait bu 3 tip türün DNA'sına rastlanmamıştır (Şekil 4.15).

4.2.3 Otoklavlanmış Büyük Partiküller Denemesinde Real Time PCR Analizi Sonuçları

Otoklavlanmış büyük partiküllerin denendiği KF sisteminden alınan örneklerden Real Time PCR ile yapılan kalitatif ve kantitatif analizlerin sonuçları Çizelge 4.10, Çizelge 4.15 ve Şekil 4.16’de verilmiştir (215M314 nolu TÜBİTAK projesi çıktıları kullanılmıştır).

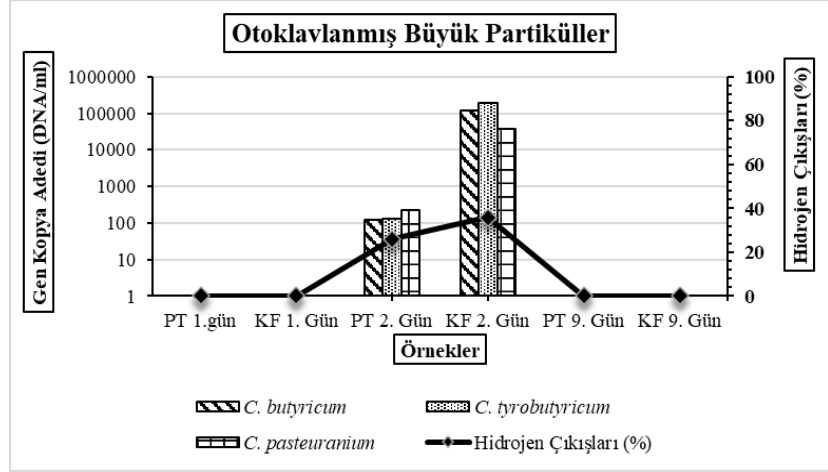
Çizelge 4.10 Otoklavlanmış büyük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve Tm dereceleri (°C)

Örnekler	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>		<i>C. tyrobutyricum</i>	
	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)	Ct	Tm(°C)
Saf Kültürler	28	79,86	17	78,47	21	81,97
PT 1.gün	-	-	-	-	-	-
KF 1. gün	-	-	-	-	-	-
PT 2. gün	33	80.46	19	78,14	18	82
KF 2. gün	31	80.42	13	78,25	12	82
PT 9. gün	-	-	-	-	-	-
KF 9. gün	-	-	-	-	-	-

Kalitatif sonuçların verildiği Çizelge 4.10’da sadece KF 2. gün ve KF 9. gün örneklerinde tüm genlere ait bölgelerin varlığı tespit edilmiştir. Diğer günlerin örneklerinde ise gen bölgelerine rastlanmamıştır. Real Time PCR analizleri sonucunda *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum*’a ait gen bölgelerinin yaklaşık Tm dereceleri sırasıyla 80 °C, 78,47 °C ve 82 °C’dir.

Çizelge 4.11 Otoklavlanmış büyük partiküller denemesine ait örneklerin kalitatif ve kantitatif sonuçları (gen kopya sayısı/mL)

Örnekler	<i>C. pasteurianum</i> gen kopya sayısı	<i>C. butyricum</i> gen kopya sayısı	<i>C. tyrobutyricum</i> gen kopya sayısı
PT 1. gün	-	-	-
KF 1. gün	-	-	-
PT 2. gün	2,28E+02	1,22E+02	1,34E+02
KF 2. gün	3,77E+04	1,23E+05	1,95E+05
PT 9. gün	-	-	-
KF 9. gün	-	-	-

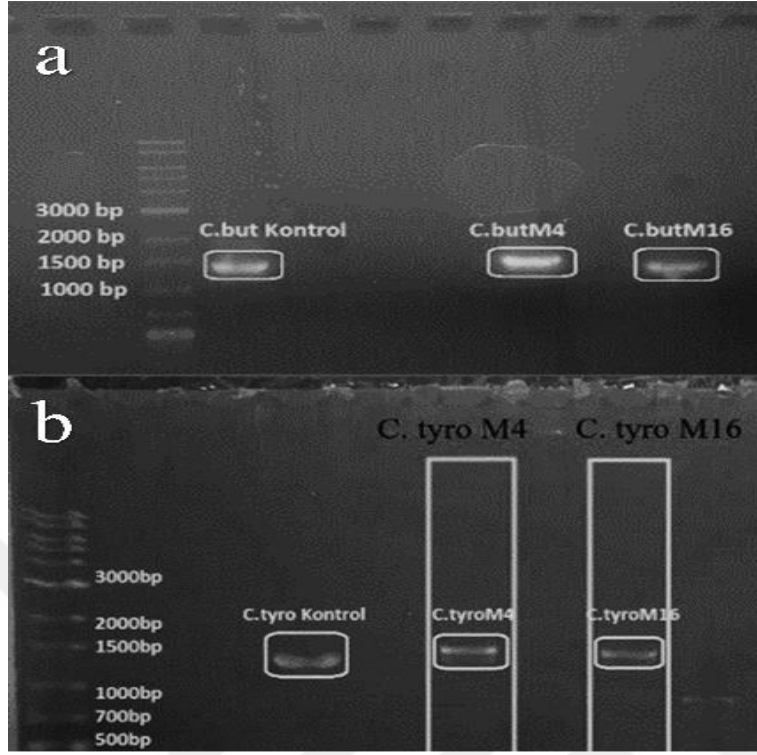


Şekil 4.16 Otoklavlanmış büyük partiküllere ait örneklerin hidrojen yüzdesi ile ilgili organizmaların sayılarının karşılaştırılması

Otoklavlanmış büyük partiküllerin denendiği KF sisteminde ilk günlerinde H₂ üretimine paralel olarak *Clostridium* türlerine de rastlanmamıştır. Perkolasyon tankının 2. gününde H₂'nin %26 değerlerinde elde edilmesiyle birlikte *C. pasteurianum* gen kopya sayısı 2,28x10² DNA/mL, *C. tyrobutyricum* gen kopya sayısı 1,34x10² DNA/mL ve *C. butyricum*'un gen kopya sayısı 1,22x10² DNA/mL olarak ölçülmüştür. Kuru fermentörün 2. gününde ise; en yüksek (%36) hidrojen üretilmiştir. Bugün de *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayıları ise sırasıyla; 1,23x10⁵ DNA/mL ve 1,95x10⁵ DNA/mL'dir. *C. pasteurianum* gen kopya sayısı ise; 3,77x10⁴ DNA/mL olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.16).

4.3 *HydA* Geninin Karakterizasyonu ve Analiz Sonuçları

Karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretim süreçlerinde sorumlu olan FeFe-hidrojenaz (*hydA*) geninin mezofilik koşullar altında yapılan denemedeki karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla DGGE analizinin sonuçlarına göre baskın olan *Clostridium* türleri seçilerek; her bir organizmaya özgü *hydA* gen bölgesine ait primer setleri tasarlanmıştır. Her bir reaktör denemesinden alınan hidrojen üretiminin en yüksek olduğu örnekler (İnokulum (M1), otoklavlanmış küçük partiküller KF 2. gün (M4), otoklavlanmamış küçük partiküller KF 17. gün (M7) ve otoklavlanmış büyük partiküller KF 2. gün (M16)) seçilmiştir. Bu genlerin varlığı konvansiyonel PCR ile analiz edilmiştir (Şekil 4.17).



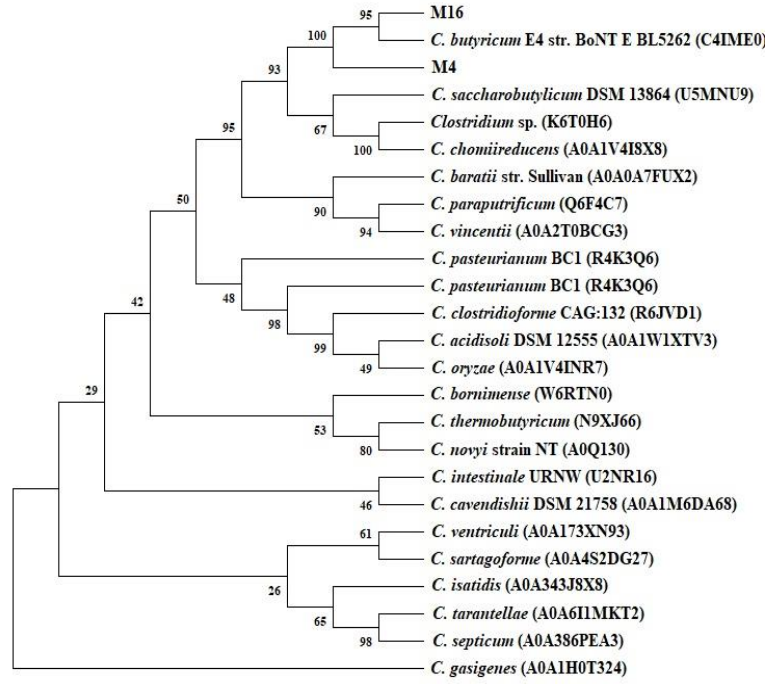
Şekil 4.17 *hydA* genine özgü primerlerle yapılan PCR analizi sonuçları. Jel elektroforez görüntüsü *hydA* genine özgü primerlerle yapılan PCR analizi sonuçlarını göstermektedir. (a) *C. butyricum*'a ait *hydA* genine, (b) ise *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* genine özgü PCR ürün bantlarıdır.

Çizelge 4.12 PCR sonuçlarını özetleyen amplifikasyon tablosu

Örnekler	<i>C. pasteurianum</i> <i>hydA</i> geni	<i>C. butyricum</i> <i>hydA</i> geni	<i>C. tyrobutyricum</i> <i>hydA</i> geni	<i>C. acetobutylicum</i> <i>hydA</i> geni
M1	-	-	-	-
M4	-	+	+	-
M7	-	-	-	-
M16	-	+	+	-

PCR analizleri sonucunda M1 (inokulum) 'de *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum* ve *C. acetobutylicum* türlerine ait *hydA* gen bölgesinin olmadığını göstermektedir. *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* türlerine ait *hydA* geninin M4 (otoklavlanmış küçük partiküller) ve M16 (otoklavlanmış büyük partiküller) örneklerinde tespit edilmiştir. M7 (otoklavlanmamış küçük partiküller) örneğinde ise negatif sonuç elde edilmiştir. M4 ve M16 örneklerinde sırasıyla %44 ve %36 oranlarında hidrojen üretimi gerçekleştirilirken; M7 örneğinde ise diğerlerine göre düşük olup %17'dir. *C. acetobutylicum*'a ait *hydA* genine hiçbir örnekte tespit edilmemiştir (Çizelge 4.12).

C. butyricum ve *C. tyrobutyricum* türlerine ait *hydA* gen bölgesi konvansiyonel PCR ile çoğaltıldıktan sonra dizi analizine yollanmıştır. Dizi analizlerinin sonuçları MEGA-X programında ayrıntılı bir şekilde incelenerek dizi temizlemeleri yapılmıştır. Aminoasit dönüşümü yapıldıktan sonra dizi UniProt veri tabanında BLAST edilerek taranmıştır. %70'in üzerinde benzerlik gösteren ve metagenom analizi sonucunda reaktörde bulunan *Clostridium* türlerine ait kısmi aminoasit dizileri seçilmiştir. Seçilen bu aminoasit dizilerinin hizalanması BioEdit programında yapılmıştır. Hizalanan dizilerin birbirleriyle olan ilişkilerini belirlemek amacıyla MEGA-X programında filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç oluşturulurken Maximum-Likelihood istatistiksel yöntemi ile 1000 tekrarlı bootstrap filogeni test metodu kullanılmıştır. Şekil 4.18'te *C. butyricum* *hydA* gen bölgesine ait filogenetik ağaç gösterilmektedir.

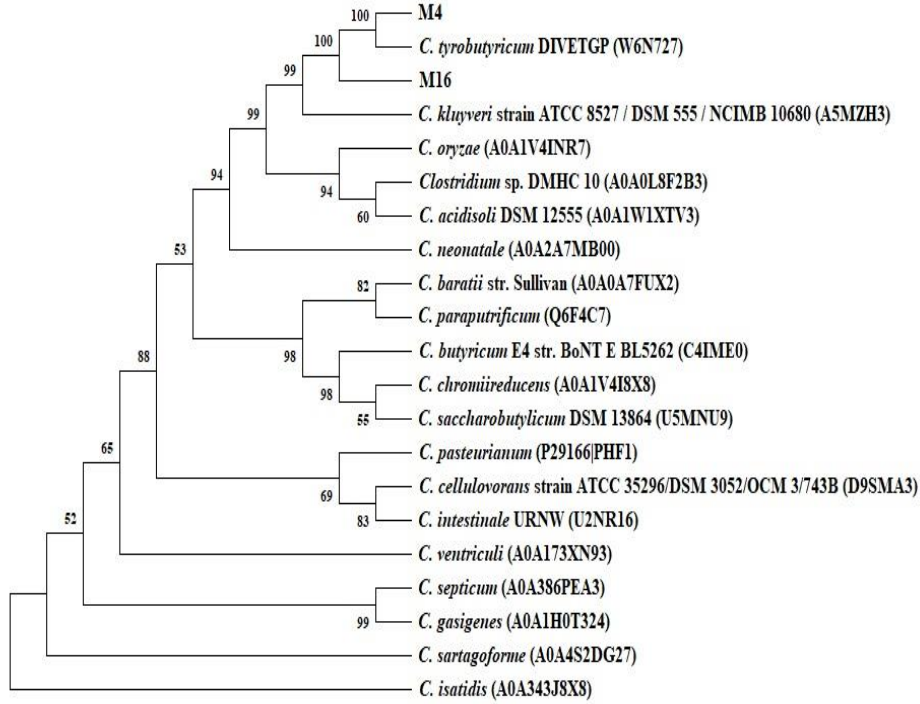


Şekil 4.18 *C. butyricum*'a ait *hydA* gen bölgesinin benzerliklerini ve ilişkilerini gösteren aminoasit dizilerinden oluşturulan filogenetik ağaç

C. butyricum'a ait *hydA* gen bölgesine ait filogenetik ağaç Şekil 4.14'te %100-%70 benzerlik aralığında yakınlık ve uzaklıklarını göstermektedir. M4 ve M16 reaktör örnekleri için ortak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu reaktör örneklerinde *C. butyricum*'a ait *hydA* geni %100 benzerlikte olup; *C. butyricum* E4 str. BONT E BL5262 suşuna ait hidrojenaz

geni ile yakın benzerliktedirler. Diğer yakın benzerlikler *C. saccharobutyricum*, *Clostridium* sp. ve *C. chromiireducens*'a ait *hydA* gen bölgesidir. *C. baratii* str. Sullivan ve *C. vincentii* reaktörlerde bulunan *C. paraputrificum* ile *hydA* genleri yakın benzerlikte olup; aynı dal üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca bu organizmalar *C. butyricum* *hydA* geni ile de yakından benzerlik göstermektedir. *C. oryzae* ve *C. acidisoli* ise *C. pasteurianum* ile filogenetik ağaçta aynı dal üzerinde bulunmaktadır (Şekil 4.18).

C. tyrobutyricum *hydA* gen bölgesine ait filogenetik ağaç Şekil 4.19'te %100-%70 benzerlik aralığında yakınlık ve uzaklıklarını göstermektedir.

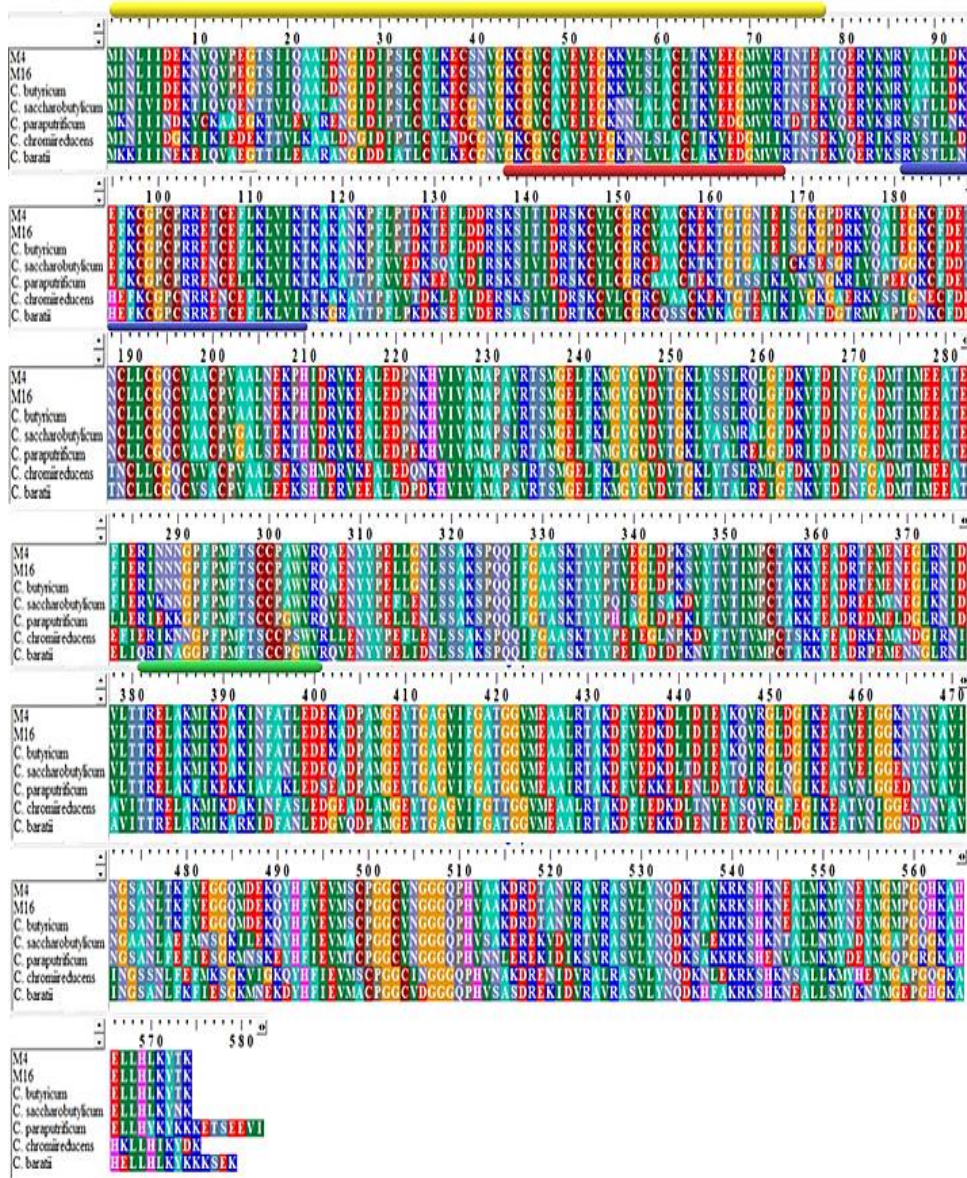


Şekil 4.19 *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* gen bölgesinin benzerliklerini ve ilişkilerini gösteren aminoasit dizilerinden oluşturulan filogenetik ağaç

C. tyrobutyricum'a ait *hydA* gen bölgesine ait filogenetik ağaç Şekil 4.19'te %100-%70 benzerlik aralığında yakınlık ve uzaklıklarını göstermektedir. M4 ve M16 reaktör örnekleri için ortak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu reaktör örneklerinde *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* geni %100 benzerlikte olup; *C. tyrobutyricum* DIVETGP suşuna ait hidrojenaz geni ile yakın benzerliktedirler. Diğer yakın benzerlikler *Clostridium* sp., *C.*

kluyveri, *C. acetobutylicum* ve *C. acidisoli* ait *hydA* gen bölgesidir. M4 ve M16 reaktör örneklerinde bulunan *C. baratii* str. Sullivan, *C. paraputrificum*, *C. butyricum*, *C. chromiireducens* ve *C. saccharobutylicum* ile *hydA* genleri yakın benzerlikte olup; aynı dal üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca bu organizmalar *C. tyrobutyricum* *hydA* geni ile de uzak benzerlik göstermektedir (Şekil 4.19).

C. butyricum'a ait *hydA* geni için filogenetik açıdan en yakın ilişkili ve metagenom analizi sonuçlarına göre reaktörlerde bulunan *Clostridium* türleriyle olan *hydA*'nın amino asit dizilerinin çoklu hizalaması BioEdit veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. M4 ve M16 reaktör örneklerinin diğer *Clostridium* türleriyle olan *hydA* geni aminoasit dizilerinin benzerlik ve farklılıkları Şekil 4.20'da verilmiştir.



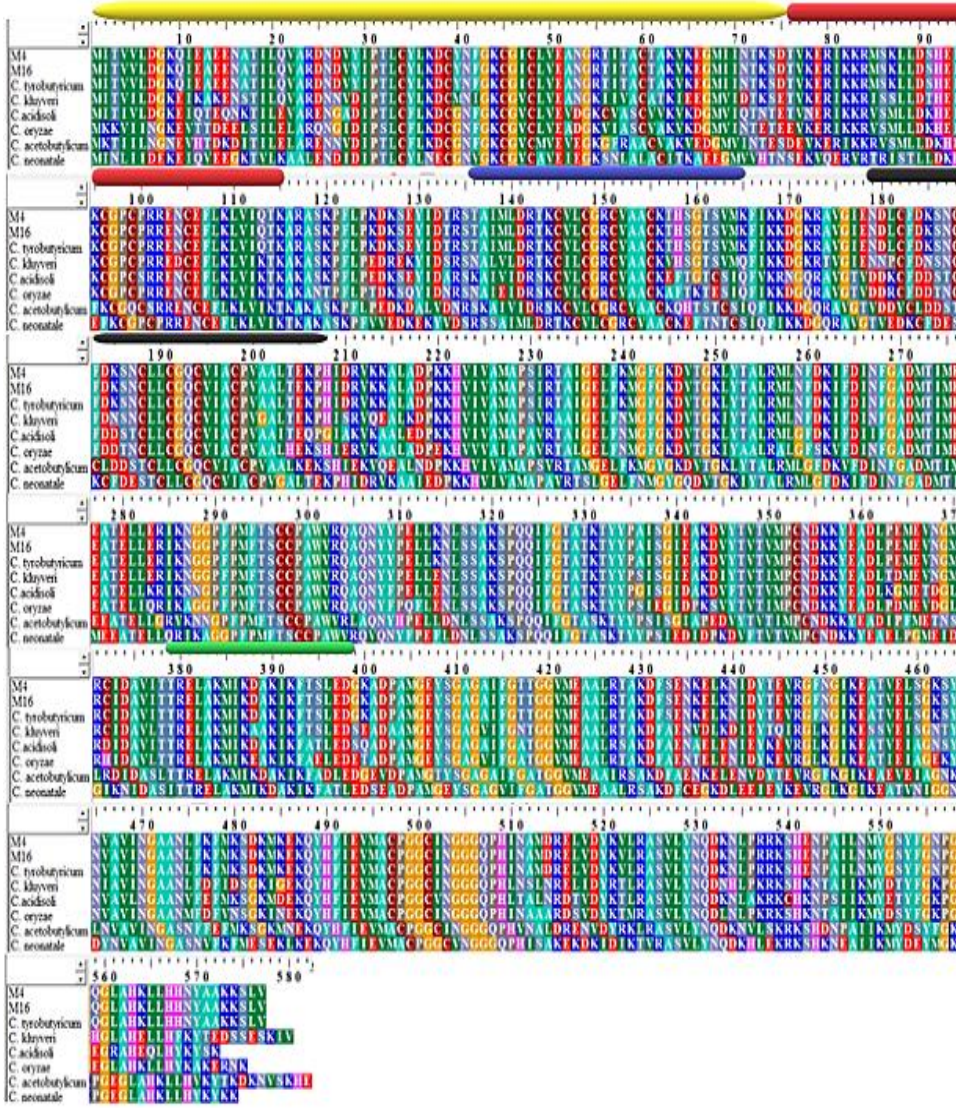
Şekil 4.20 *C. butyricum* *hydA* gen bölgesinin aminoasit dizilerinin yakın benzerlikte olan *Clostridium* türleriyle çoklu hizalanması

Şekil 4.20’da M4 ve M16 reaktör örneklerinin *C. butyricum*, *C. saccharobutylicum*, *C. paraputrificum*, *C. chromiireducens* ve *C. baratii*, türlerinin *hydA* genlerinin çoklu hizalanması gösterilmektedir. M4 ve M16 reaktör örnekleri 1648 bç uzunluğunda *hydA* gen bölgesiyle çoğaltılmıştır. Çoklu aminoasit dizilerinin hizalanması sonucunda; bu iki reaktör örneğinin birbiriyle ve *C. butyricum* ile *hydA* genleri %100 benzerlikte olduğu tespit edilmiştir. *C. saccharobutylicum* *hydA* gen bölgesi %81,5 benzerlik ile *C. butyricum*’dan sonra en yakın *Clostridium* türüdür. M4 ve M16 reaktör örneklerinde bulunan *C. chromiireducens* *hydA* geni ise %79,5 benzerlik göstermektedir. M4 ve M16 reaktör örneklerinin *hydA* genleri *C. baratii* ile

%78 benzerliktedir. Reaktörlerin mikrobiyal profilinde bulunan *C. paraputrificum*'a ait *hydA* gen bölgesi %75,7 oranında yakın benzerlik içerisindedir (Şekil 4.20).

C. butyricum'a ait *hydA* geninde 3 farklı domain içerdiği görülmüştür (Şekil 4.20). 1 – 120 pozisyonlarında 2Fe-2S ferrodoksin tip sarı çubuk ile işaretlenmiştir. 138-167 arasında kırmızı çubuk ile gösterilen bölge 4Fe-4S ferrodoksin tip kümesini göstermektedir. Mavi çubuk ile işaretlenmiş 181-210 pozisyonunda ise 4Fe-4S ferrodoksin tip kümesi bulunmaktadır. Bu korunmuş bölgeler M4 ve M16 reaktör örnekleri ile *C. butyricum*, *C. saccharobutylicum* ve *C. paraputrificum* tip türlerinde de benzer şekilde görülmektedir. *C. chromiireducens* ve *C. baratii* aminoasit dizilerinde kaymalar olduğu Şekil 4.16'daki hizalama sonucunda görülmektedir. Ayrıca 381 – 401 pozisyonları arasında L1 motifi bulunmaktadır. Bu motifin bulunduğu bölge ise Şekil 4.20'da yeşil çubuk ile gösterilmiştir.

C. tyrobutyricum'a ait *hydA* geni için filogenetik açıdan en yakın ilişkili *Clostridium* türleriyle olan *hydA*'nın aminoasit dizilerinin çoklu hizalaması BioEdit veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. M4 ve M16 reaktör örneklerinin diğer *Clostridium* türleriyle olan *hydA* geni aminoasit dizilerinin benzerlik ve farklılıkları Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21 *C. tyrobutyricum* *hydA* gen bölgesinin aminoasit dizilerinin yakın benzerlikte olan *Clostridium* türleriyle çoklu hizalanması

Şekil 4.21’de M4 ve M16 reaktör örneklerinin *C. tyrobutyricum*, *C. kluyveri*, *C. acidisoli*, *C. oryzae*, *C. acetobutylicum* ve *C. neonatale* türlerinin *hydA* genlerinin çoklu hizalaması gösterilmektedir. M4 ve M16 reaktör örnekleri 1602 bç uzunluğunda *hydA* gen bölgesiyle çoğaltılmıştır. Çoklu aminoasit dizilerinin hizalanması sonucunda; bu iki reaktör örneğinin birbiriyle ve *C. tyrobutyricum* ile *hydA* genleri %100 benzerlikte olduğu tespit edilmiştir. *C. kluyveri* *hydA* gen bölgesi %81 benzerlik ile *C. tyrobutyricum*’dan sonra en yakın *Clostridium* türüdür. *C. acidisoli*, *C. oryzae*, *C. acetobutylicum* ve *C. neonatale* türlerine ait *hydA* geniyle benzerlikleri ise sırasıyla; %77,1; %75,2; %79,2 ve %74,1’dir (Şekil 4.21).

C. tyrobutyricum'a ait *hydA* geninde 4 farklı domain içerdiği görülmüştür (Şekil 4.21). 1 – 76 pozisyonlarında 2Fe-2S ferrodoksin tip sarı çubuk ile işaretlenmiştir. 76 – 115 arasında kırmızı çubuk ile gösterilen bölge 4Fe-4S His(Cys)3-bağlı tip kümesini göstermektedir. Mavi çubuk ile işaretlenmiş 136-165 pozisyonunda ise 4Fe-4S ferrodoksin tip kümesi bulunmaktadır. Son olarak 179-208 pozisyonunda 4Fe-4S ferrodoksin tip kümesi siyah çubuk ile işaretlenmiş bölgede bulunmaktadır. Bu korunmuş bölgeler M4 ve M16 reaktör örnekleri ile *C. tyrobutyricum*, *C. kluyveri* ve *C. acidisoli* tip türlerinde de benzer şekilde görülmektedir. *C. oryzae*, *C. acetobutylicum* ve *C. neonatale* baz farklılıklarına bağlı olarak aminoasit dizilerinde kaymalar olduğu Şekil 4.21'deki hizalama sonucunda görülmektedir. Ayrıca 381 – 401 pozisyonları arasında L1 motifi bulunmaktadır. Bu motifin bulunduğu bölge ise Şekil 4.21'de yeşil çubuk ile gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Biyohidrojen Üretiminden Sorumlu Mikrobiyal Profilin Değerlendirilmesi

Hidrojen üretimi sırasında değişen işletme parametrelerine bağlı olarak; sistemin toleransı ve buna bağlı olarak performans değişimleri ile eş zamanlı olarak proste iş gören biyokütle mikrobiyotası izlenmiştir. Biyokütle mikrobiyotasının izlenmesi ile farklı koşullarda aktif olarak iş gören mikroorganizma grupları ve bu grupları oluşturan üyelerin DGGE ve metagenom analizleriyle tespiti yapılmıştır.

Mezofilik koşullar altında parçacık boyutu ve ısıl ön işlem etkisinin denendiği 3 farklı reaktör çalışması yapılmıştır. Reaktörlerden alınan örnekler ile yapılan DGGE analiz sonuçlarında hidrojen üretimi saptanmayan örneklerde hidrojen üretimi yüksek olan örneklerle göre daha az sayıda ve daha az parlaklıkta bant profili bulundurmaktadır. DGGE bantlarının dizileme analizi sonuçlarına göre; reaktör örneklerinde *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Clostridium* türlerine yakın benzerlikte olan Uncultured bacterium gruplarının mikrobiyal profili oluşturduğu görülmüştür. Genel olarak tüm deneme setlerinde *Clostridium* ve *Lactobacillus* gruplarının baskın olduğu görülmüştür. En parlak olan bantlar (yoğun olan organizma türleri) *C. butyricum*, *L. acidipiscis*, *Bacillus* sp., Uncultured *Clostridia* bacterium, Uncultured bacterium, olarak DGGE jelinde tespit edilmiştir.

Otoklavlanmış küçük partiküller denemesinde maksimum hidrojenin (%44) üretildiği KF 2. günde bantların *L. acidipiscis*, *C. pasteurianum*, Uncultured bacterium, Uncultured *Clostridium* sp., Uncultured *Clostridia* bacterium, Uncultured bacterium, *C. butyricum* ve *Bacillus* sp. ile benzer olduğu görülmektedir. Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesinde hidrojen çıkışının en yüksek olduğu (%17) KF 17. gün örneğinde elde edilen bantlar *L. acidipiscis*, *C. pasteurianum*, Uncultured bacterium ve Uncultured bacterium ile benzerlik göstermektedir. Son olarak

otoklavlanmış büyük partiküller reaktör denemesinde ise; KF 2. Gün örneğinde hidrojen en yüksek (%36) üretilmiş olup *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, Uncultured bacterium, *Bifidobacterium animalis*, *Bacillus* sp. ve *L. mucosae* bantları elde edilmiştir. Yapılan tüm reaktör denemelerinde *Clostridium* türlerinin mevcut olduğu özellikle de hidrojen üretiminin yüksek olduğu örneklerde baskın organizma grubu olduğu belirlenmiştir. *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp., ve *Bacillus* sp. karanlık bir ortamda karbonhidratca zengin substratlardan H₂ üretebilme kapasitelerine sahiptirler (Lazaro and Hallenbeck, 2019). Bununla birlikte, yapılan çalışmaların çoğu *Clostridium* sp.'ye odaklanmıştır. Çünkü çalışmalardan çıkan ortak sonuç bu organizma grubundan en yüksek H₂ verimi elde edildiği yönünde olduğu ve doğal ortamlarda bol miktarda bulunduğu şeklindedir (Hawkes ve diğerleri, 2002). Bu sürecin ana avantajı hızlı H₂ üretim oranıdır. Davila-Vazquez et al. (2009), sürekli karıştırmalı fermentatif tank reaktöründe peynir altı suyunu kullanarak maksimum 46,61 mmol H₂/L/h oranında hidrojen üretim verimini elde etmişlerdir. Mikrobiyal profilin DGGE ile izlendiği bu çalışmada *Clostridium* türlerinin baskın olduğu ve bantların *C. butyricum* CM-C86 ile %99; *C. butyricum* CM-C97 ile %96; *C. paraputrificum* ile %96; D: *Enterococcus faecium* ile %99; *Streptococcus* sp. ile %98; *Clostridium* sp. ile %96; *C. butyricum* CGS6 ile %97 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yukarı akışlı anaerobik reaktörde glukozdan biyohidrojen üretimini gerçekleştiren Ferraz et al. (2014), maksimum elde ettikleri hidrojen veriminin 2,1 mol-H₂ mol⁻¹-glukoz oranında olduğunu saptamışlardır. Moleküler biyolojik analizler sonucunda (PCR/DGGE); biyohidrojen üretiminin, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *M. elsdenii* ve *Propionispira arboris* gibi hidrojen ve uçucu asit üreticilerinin varlığından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Keskin vd., (2018)'de meyve – sebze atıklarıyla Biyokimyasal Hidrojen Potansiyeli (BHP) reaktörlerini kullanarak iz elementlerin biyohidrojen üretimi üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. Mevcut mikrobiyal profili ortaya çıkarmak için tüm BHP atık numunelerinde DGGE analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda; *Clostridium* sp., *C. baratii*, Uncultured bacterium, Uncultured *Streptococcus* sp.'nin baskın türler olduğu tespit edilmiştir ve DGGE bantlarının bu organizmalar ile NCBI veri tabanındaki benzerlik oranlarının sırasıyla %99, %100, %89, %98 olduğu

görülmüştür. Başka bir çalışmada ise; Doi et al., (2009)'da yaptıkları çalışmada pirinç rizosferini kullanarak anaerobik koşullarda biyohidrojen üretimini gerçekleştirmişlerdir. 35 °C'de 12-36 saat HRT, 30-70 kg-COD/m³ günlük hacim yükü ile 1,30 mol-H₂/mol-heksoz maksimum hidrojen üretim hızı elde ettikleri reaktör denemesinde mikrobiyal profili belirlemek amacıyla DGGE analizi yapmışlardır. Sonuçlara göre; bir bakterinin bandı *Megasphaera elsdenii*'ye yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Megasphaera* sp. laktik asit, karbondioksit ve az miktarda hidrojen gazı ürettikleri bilinmektedir. Bu çalışmada, *Megasphaera* sp. ve *Bifidobacterium* sp. reaktörde hidrojen üretimi süresince mikrobiyotada mevcut olduğu görülmüştür. Ayrıca *C. tyrobutyricum* reaktör çalışmasının 46. gününde ve 55. gününde varlığı tespit edilmiştir (Doi et al., 2009).

Otoklavlanmış küçük partiküller (PT 8. gün) ve otoklavlanmış büyük partikül denemelerinde (PT 9. gün, KF 2. gün ve KF 9. gün) DGGE bantlarından biri *Bifidobacterium animalis* ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu örneklerden sadece otoklavlanmış büyük partikül denemesinde KF 2. gününde hidrojen üretimi olmuşken diğer günlerde üretim gerçekleşmemiştir. *B. animalis* gram pozitif, anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. *Bifidobacterium* türlerinin ham substratlar ile hidrojen üretiminde hidrolizör görevi gördükleri tespit edilmiştir (Cabrol et al. 2017). Cheng et al. (2008)'de nişasta ile besledikleri granüler çamur reaktöründe karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimini gerçekleştirdikleri çalışmada mikrobiyal profili belirlemek amacıyla DGGE analizi yapmışlardır. Bunun sonucunda bantların birçoğunun *Clostridium* sp. ile benzerlik gösterdiği gibi bir kısmının ise *Bifidobacterium* sp. ile de benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *Bifidobacterium* sp.'nin önce nişastayı küçük moleküllere parçaladığını ve daha sonra *Clostridium* türlerinin bu daha az karmaşık olan substratı hidrojen üretiminde kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle de *Bifidobacterium* sp. gibi nişastayı parçalayabilen organizma türlerinin hidrojen üretiminde kullanılmasını önermişlerdir.

Hidrojen üretiminin gerçekleştiği üç farklı reaktörde metagenom analizi sonuçlarına baktığımız zaman tüm örneklerde toplamda 1350 genus

tespit edilmiştir. DGGE sonuçlarına benzer şekilde *Clostridium* ve *Lactobacillus* genusları baskın olan iki gruptur. M1 (aşı) organizma çeşitliliğinin en fazla olduğu örnektir. Reaktör örneklerinin aksine M1’de baskın olan %14,17 oranında *Hydrogenispora* genusudur. *Firmicutes* filumundan *Hydrogenispora* genusu zorunlu anaerobik, hareketsiz, basil formda spor oluşturan bakterilerdir. Çeşitli şekerleri fermente edebilirken amino asitleri veya aromatik bileşikler fermente edemezler (Liu et al., 2014). M1 örneğinde; *Clostridium* III (%1,09), *Bacillus* (%1) ve *Lactobacillus* (%1,91) genuslarını ise çok az miktarlarda bulundurduğu analiz sonucunda görülmektedir. M1 ve M7 örnekleri mikrobiyal çeşitlilik açısından birbirleriyle yakın benzerlik içerisinde oldukları tespit edilmiştir. Bu iki örnekte ısıl ön işlem görmemiş (otoklavlanmamış) örneklerdir. Ayrıca M7 reaktör denemesinde diğer denemelere göre daha az hidrojen üretimi gerçekleşmiştir. Burada ısıl ön işlem ile muamelenin hidrojen üretimini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Karışık kültür kullanılarak gerçekleştirilen fermentatif hidrojen üretimi ile ilgili karşılaşılan en büyük sıkıntı, aynı ortamda hidrojen tüketen mikroorganizmaların da bulunmasıdır (Duangmanee vd., 2007; Kapdan ve Kargı, 2006). Literatür çalışması sonucu, birçok çalışmada yüksek sıcaklık uygulaması ile bu sorunun çözüldüğü görülmüştür. Çünkü anaerobik fermentasyon ile hidrojen üretimi büyük ölçüde spor oluşturan mikroorganizmalarca (*Clostridium*, *Bacillus* vb.) gerçekleştirilmektedir (Yi vd., 2014). Lay (2000) ve Okamoto (2000) bu amaçla kaynatma yöntemini kullanırken; Van Ginkel et al. (2001), kurutma tekniğini (104°C 'de 10 dakika) kullanarak potansiyel hidrojen tüketen mikroorganizmaları elimine etmişlerdir (Duangmanee vd., 2007). Bu tez çalışmasında da M4 ve M16 reaktör denemelerinde aşı ve substrat olarak kullanılan meyve – sebze atıklarına 105°C'de 5 dakika otoklavlama ile ısıl ön işlem uygulanmıştır. Hidrojen üretiminin maksimum seviyelerde elde edildiği M4 ve M16 reaktör örneklerinde *Clostridium* ve *Lactobacillus* genusları baskın olan iki gruptur. M4 reaktör örneğinde *Lactobacillus* (%29,75), *Clostridium* IV (%18,2) ve *Clostridium sensu stricto* (%17,59), *Clostridium* XIVa (%2,89) ve *Bacillus* (%3,54) genel olarak mikrobiyal profili oluşturan genuslardır. *Clostridium*’a ait genusların toplam oranı %38,68’dir ve bu da profilin neredeyse yarısını oluşturmaktadır. M16

örneğinde ise; *Clostridium sensu stricto* (%30,2), *Lactobacillus* (%23,2), *Lysinibacillus* (%16,8), *Solibacillus* (%15,11) genusları baskındır. M16'da M4'ün aksine *Bacillus*'a ait genuslar mikrobiyal profilde daha fazla yer almaktadır. Bu iki reaktör denemesi arasında tek fark substratların boyutudur. KKAOF boyutları M4 denemesinde <1 cm olacak şekilde parçalayıcıdan geçirilerek elde edilmiş ve M16 denemesinde ~5 cm olacak şekilde bıçak ile kesilerek kuru fermentöre yüklenmiştir. Parçacık etkisi açısından bakıldığında kümülatif H₂ üretim değerleri açısından 5 cm'den büyük parçacıklarla daha yüksek H₂ değerleri elde edildiği görülmektedir. 1 cm'den küçük parçacıklarla yapılan denemelerde perkolasyon tankından 3220 mL H₂ üretimi elde edilirken büyük parçacıklarla yapılan deneme setinde 10508 mL H₂ üretiminin gözlenmesi atıkların parçalanması ve ısı ön işlem uygulanması sırasında açığa çıkan fazla miktarda KKAOF suyundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kuru fermentörde H₂ üretim değerlerine bakıldığında 1 cm'den küçük parçacıklarla kurulan deneme setinde 7027 mL H₂ üretimine karşılık büyük parçacıklarla kurulan deneme setinde 4064 mL H₂ üretimi gözlenmiştir. Küçük parçacıklarla kurulan deneme setinde H₂ üretimi kuru fermentörde gerçekleşirken büyük parçacıklarla kurulan deneme setinde H₂ üretiminin çoğunluğunun perkolasyon tankında gerçekleştiği görülmüştür. Toplamda büyük parçacıklarla kurulan deneme setinde daha yüksek H₂ üretimlerinin olması ve parçalama sırasında harcanan enerji bakımından 5 cm'den büyük parçacık kullanılmasının kuru fermentasyon sisteminde daha yüksek üretimlerle sonuçlandığı gözlenmiştir (Abubakar vd., 2019).

Reaktör denemelerinde tür düzeyinde irdelendiğinde hidrojen üretiminin yüksek olduğu reaktörlerde (M4 ve M16) DGGE ve metagenom analizleri sonucunda baskın olan *Clostridium* türünün *C. butyricum* olduğu görülmektedir. M7 reaktör örneğinde *C. butyricum* türüne rastlanmamıştır. Bu bakteri M4 reaktör örneğinde %15,72 oranında bulunurken; M16 reaktör örneğinde %46,93 oranı ile en baskın olan tür olmuştur. *C. butyricum* kümülatif olarak hidrojenin en yüksek üretildiği M16 reaktörünün mikrobiyal profilinin neredeyse yarısını oluşturmuştur. Hem M4 reaktöründe hem de M16 reaktöründe hidrojen üretiminden sorumlu olan *Clostridium* türü olmuştur. *C. butyricum* anaerobik asit oluşturan bir bakteridir. Organik

substratlardan ve özellikle karbonhidratlardan hidrojen üretiminde çok etkilidir. En bilinen hidrojen üreten bakteri konsorsiyumlarından biridir (Liu et al., 2012). Glukoz kullanımından çıkan ana yan ürünler olarak laktat, bütirat, asetat, etanol ve CO₂ üretir. Pirüvatın laktat, bütirat ve etanole dönüştürülmesi, NADH'nin oksidasyonunu içerir (Cai et al., 2012). Bu tez çalışmasında yapılan moleküler analizlerdeki *C. butyricum* miktarlarının yoğun olması bütirik asit üretiminin yoğun olmasına neden olmuştur. Her iki reaktörden günlük alınan örneklerde yapılan uçucu yağ asidi (VFA) analizleri sonucunda perkolasyon tankında bütirik asit üretimlerinin 8000-12000 mg/L arasında değiştiği görülmüştür. Asetik asit üretimleri de M4'te 1000-6000 mg/L M16'da ise 2000-4000 mg/L arasında değişiklik göstermiştir. Kuru fermentörde bütirat üretimi 9000-12000 mg/L arasında değişiklik gösterirken perkolasyon tankına benzer şekilde asetik asit üretimleri daha düşük değerlerde kalmış, 2000-4000 mg/L arasında değişmiştir (Abubackar vd., 2019).

Karanlık fermentasyon ile karışık kültürle hidrojen üretimi çalışmalarında yüksek verimin elde edilmesi ortamdaki *Clostridium*'ların bolluğundan kaynaklanmaktadır. Literatüre bakıldığında; birçok hidrojen üreten türün bulunduğu *Clostridium* cluster I; en büyük *Clostridial* gruptur (Park et al., 2014). *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. thermolacticum*, *C. thermocellum* ve *C. paraputrificum* anaerobik koşullar altında spor oluşturan hidrojen üreticilerinin umut verici örnekleridir (Gopalakrishnan et al., 2019). Zagrodnik et al., (2021)'de yaptıkları çalışmada ham selülozdan karanlık fermentasyon ile H₂ üretimi gerçekleştirdirler. Karışık kültür ile 2,14 L H₂/L H₂ üretiminin gerçekleştiği reaktörde *Clostridium sensu stricto* 1 grubundan baskın olan türlerin *C. chromiireducens* (%99 benzerlik) ve *C. butyricum* (%100 benzerlik) olduğunu tespit etmişlerdir. Denemeler sırasında nispi bolluklarını sırasıyla *C. chromiireducens* ve *C. butyricum* için %1,2-33,2 ve %0,5-12,9 olarak elde etmişlerdir. Başka bir çalışmada Lo et al. (2008), sukrozun (18 g/L) *C. butyricum* ve *C. pasteurianum* ile fermentasyonu sırasında 1,5 mol H₂/mol verimde yüksek hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Yang and Wang (2019), yüksek verimli piro

sekanslama ile karanlık fermantasyon işlemi sırasında mikrobiyal profildeki değişimleri ayrıntılı bir şekilde araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada mikrobiyal profilin zaman içerisinde önemli ölçüde değiştiğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Mikrobiyal çeşitlilik, fermantasyon işlemi sırasında sabit bir azalma eğilimi göstermiştir. Mikrobiyal topluluk kompozisyonunun analizi, aşıda nadiren bulunan *Clostridium sensu stricto* 1, *Paraclostridium*, *Romboutsia* ve *Paeniclostridium*'un, 6 saatlik fermentasyondan sonra, %99'dan fazla toplam nispi bolluk ile sistemde baskın genuslar haline geldiğini tespit etmişlerdir. *Clostridium sensu stricto* 1 genusunun bu çalışmada hidrojen fermantasyon performanslarına ana katkısı olduğunu ve karanlık fermantasyonda tanımlanan iki yaygın hidrojen üreticisi olan *C. butyrium* ve *C. paraputrificum* olduğu bildirilmiştir (Yang and Wang, 2019).

DGGE ve metagenom analizlerinin sonucunda *Lactobacillus* türlerinin de çalışılan reaktör denemelerinde varlığı tespit edilmiştir. Özellikle hidrojen çıkışının yüksek olduğu ısıl ön işlem görmüş M4 ve M16 örneklerinde *Clostridium* ile baskın olan gruptur. Isıl ön işlem görmemiş M7 reaktör örneğinde ise düşük hidrojen üretimi gerçekleşmiştir. Bu reaktör örneğinde *Anaerostipes* (%11,97) genusu baskın olup; *Clostridium sensu stricto* (%4,68) ve *Lactobacillus* (%3,68) genuslarının nispi bollukları daha az oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Reaktör denemelerinde kullanılan inokulum süt üretim tesisinde bulunan fermentörden alınmıştır. LAB'lar özellikle süt ürünlerinde bulunmaktadır. Ancak reaktör denemelerinde ısıl ön işlemin hidrojen üretimi üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla otoklavlanmış ve otoklavlanmamış aşı ile ayrı ayrı reaktör denemeleri yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda hidrojen üretiminin ısıl ön işlem görmüş inokulum ve substrat ile gerçekleştirilen reaktörlerde üretimin daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak ısıl ön işlem uygulamasının LAB'lar üzerinde ayırt edici bir farkının olmadığı düşünülmektedir. Yapılan ısıl ön işlem görmüş M4 ve M16 reaktör denemelerinde LAB'ların varlığı tespit edilmiştir. Genellikle 50°C ile 90°C arasında substratın ısıl işlemi LAB büyümesinin önlenmesini sağlamaktadır (Noike et al., 2002). Gıda atıklarının asitle ön işleme tabi tutulması, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* gibi LAB'nin baskın olduğu (>90) işlenmemiş kontrole kıyasla hidrojen üreticisi olan

Clostridia türlerini seçmek ve en yüksek hidrojen verimine ulaşmak için de etkili olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2014). Ancak inokula ve/veya substratın ön işlemleri LAB büyümesini önlemede her zaman etkili olmadığı da belirtilmiştir. Monlau et al. (2013), ayçiçeği sapları hidrolizatını H₂ üretimi öncesi kombine ısı ve asitle muamele etmelerine rağmen LAB'yi baskılamak için etkili olamamışlardır. *Clostridium*'a rağmen *Sporolaktobasil* baskın hale geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada yazarlar asit muamelesi (asetat, format, furfural ve fenolik bileşikler gibi) tarafından salınan lignoselülozik bozunmanın ikincil yan ürünlerinin, LAB'ye doğru bir topluluk kaymasına neden olduğunu ve LAB'nin müteakip aktivitesinin ortamda bulunan *Clostridium* türleri için stresli koşullar oluşturduğunu öne sürmüşlerdir (Monlau et al., 2013). Başka bir çalışmada ise; deniz gelgitleri arası çamurdan zenginleştirilmiş kesikli reaktörlerde LAB'nin spor oluşturmayan bakteriler olmasına rağmen, şiddetli ısı şoku veya donma-çözülme ön işlemlerinden sonra varlığını sürdürdüğünü ve egemen olduklarını belirtmişlerdir (Liu et al., 2009). Bu tez çalışmasında da benzer şekilde yapılan 3 farklı deneme setinde ısı ön işlem etkisi incelenmiştir ve bunun sonucunda LAB'lar üzerinde belirteç olabilecek bir etkisi olmamıştır. Metagenom analizi sonuçlarına göre M1 (aşı) örneğinde *Lactobacillus* (%1,91) oranında iken; H₂ üretiminin %44 olduğu M4 örneğinde %29,75'e, %17 H₂ üretimi ile M7 örneğinde %3,68'e ve %36 H₂ üretiminin olduğu M16'da ise %23,20'e yükselmiştir. M4 ve M16 reaktör örneklerinde karanlık fermentasyon ile H₂ üretiminin artmasıyla *Lactobacillus* genusun bolluğu tıpkı *Clostridium* genusu gibi artış göstermiştir ve bu 2 genus baskın olmuşlardır. M7 reaktör örneğinde ise; bu 2 genusun miktarları süreç içerisinde artış göstermiştir. Ancak bu artış M4 ve M16 reaktör örneklerindeki gibi önemli oranlarda olmadığı görülmüştür. Karanlık fermentasyonda *Clostridium* grubunun en iyi hidrojen üreticisi olduğu bilinmektedir. Fakat *Lactobacillus* ya da LAB grubu bakteriler için durum biraz karmaşıktır. Laktat, hidrojen fermente edicilerinde sıfır hidrojen dengesi yolu ile üretilen önemli bir ara metabolittir. Birçok bakteri, fermentasyonun birincil veya ikincil son ürünü olarak laktik asit üretse de LAB terimi geleneksel olarak *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, vb. dahil olmak üzere *Lactobacillales* ordosuna ait türler için ayrılmıştır. LAB spor oluşturmayan aerotolerant anaeroblardır.

Literatürde karanlık fermentasyonda karışık kültür ile H_2 üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalarda ya da derlemelerde LAB'leri ile ilgili iki karşıt fikir ortaya konulmuştur: (i) Birinci düşünce LAB varlığı, substrat rekabeti veya toksinlerin (bakteriyosin) salınması yoluyla hidrojen üreten mikroorganizmaları baskılayarak biyohidrojen üretimini baskılayıcı yönde işlev gördükleri; (ii) İkincisi ise; laktat, LAB ve hidrojen üreticisi olan *Clostridium* bakterileri arasında faydalı bir simbiyoz yolla hidrojen üretimini teşvik edebildikleridir (Cabrol et al. 2017). LAB'nin H_2 üretiminde düşülen olumsuz etkilerinden biri antimikrobiyal aktivitesi; laktik, asetik ve propiyonik asitlerin sentezinin neden olduğu pH düşüşüdür. Ayrıca karışık kültürlerle yapılan çalışmalarda toksik bileşiklerin (hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin polipeptitleri) üretimine bağlı olarak hidrojen üreten bakterilerin büyümelerini olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir (Noike ve ark. 2002). Bu nedenle, LAB büyümesini destekleyen topluluk kaymaları genellikle proses başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir. Bunun sonucunda önerilen ise fermentasyon süresince düzenli pH kontrolünün yapılmasıdır (Kawagoshi ve diğerleri 2005; Jo ve diğerleri 2007). Bu tez çalışmasında reaktörlerin pH'nın düzenli olarak kontrol edildiği hazne bulunmaktadır. Tüm reaktör denemelerinde aşının bazik yapısından dolayı başlangıç pH'sı 7,5 değerinde iken H_2 üretiminin başlamasıyla birlikte artan asitleşme ile pH 5,5'e düşmüş ve pH kontrol sistemi ile bu değerde sabitlenmiştir. Bu sebeple kontrol altında tutulan pH'ın reaktör sistemleri üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı düşünülmektedir.

LAB varlığının düşünülen diğer bir olumsuz etkisi; H_2 üreten bakterilerinin büyümelerini etkilemeleridir. Literatürde yapılan çalışmaların çoğunda düşük H_2 verimlerini LAB varlığından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Bundhoo and Mohee, 2016). Pattra et al., (2011) saf bir *C. butyricum* kültüründen steril olmayan şeker kamışı suyunun fermentasyonu sonucunda düşük H_2 üretimi elde etmişlerdir. Yaptıkları moleküler analizler sonucunda *L. harbinensis*'in tüm reaktör denemelerinde baskın bir topluluk üyesi olduğunu ve daha düşük hidrojen üretimi ile daha yüksek laktat birikiminden sorumlu olabileceklerini bildirmişlerdir (Pattra et al., 2011). Wang and Zhao, (2009) ısıtılmış işlem görmemiş karışık kültürü aşısıyla gıda

atıklarının işlenmesi için hidrojen ve metan üretimini birleştiren iki aşamalı bir fermantasyon sürecini incelemişlerdir. Bu çalışmada laktik asit konsantrasyonunun 2345,6 mg/L'den 4425,6 mg/L'ye yükselirken biyo-hidrojen veriminde 0,071'den 0,049 m³/kg'a düştüğünü bildirmişlerdir. Wang et al. (2010), elma suyunu substrat olarak kullandıkları çalışmada ultraviyole ve ultrasonik ön işleme görmüş aktif çamurun karanlık fermentasyonu ile hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada laktik asidin mikro ilavesi ile 101,5 mL/g toplam katı miktarına kıyasla mikro ilavesiz elma posasının fermentasyonu ile 138,9 mL/g arttırılmış bir hidrojen üretimi ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (Wang et al., 2010).

LAB'nin farklı mekanizmalar yoluyla küresel hidrojen üretimine katkısı olduğu belirtilmektedir (Sikora et al., 2013). *Lactobacillus* sp. karbonhidrat bakımından zengin substratların fermantasyonu üzerine birincil ürün olarak laktik asit üretir, ancak amino asitler ve nükleotitler üzerinde de beslenebilirler. Baghchehsaraee et al. (2010), nişasta ile beslenen ve aktif çamur ile aşılınmış biyohidrojen reaktörlerinde laktik asitin hem hidrojen verimini hem de üretim hızını arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda asetat-etanolden bütirat üretimine metabolik bir geçişle birlikte bir laktik asit konsantrasyonu yaklaşık 650 mg/L eşik değerine kadar varlığını öne sürdüğü; ancak bu eşik değerinin üzerinde hidrojen veriminin keskin bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir (Baghchehsaraee et al., 2010). Geliştirilmiş H₂ üretimi için laktatı yeniden kullanma kapasitesi, en yüksek H₂ veriminin ana metabolit laktat olduğunda elde edildiği nişasta fermentasyonlarında *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. felsineum* ve özellikle *C. pasteurianum*'un saf ve tanımlanmış ortak kültürlerinde de görülmüştür (Masset et al., 2012). Matsumoto and Nishimura (2007)'de, *C. diolis* ile yaptıkları çalışmada asetat varlığında tatlı patates bulamacının fermentasyonu sonucunda laktatın; bütirata, CO₂ ve H₂'ye dönüştürdüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca başka çalışmalar ile laktatın H₂'e dönüşümü *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum* ve *C. tyrobutyricum* gibi diğer *Clostridia* türleri için de kanıtlanmıştır (Cheng et al., 2010; Mariakakis et al., 2011). Gıda atığı çöp bulamacı ile beslenen bir fermenterde, hidrojen üreticisi *Megasphaera elsdenii*'nin laktatı kullanarak iyi miktarda H₂ üretimini gerçekleştirdiğinden dolayı bu substratın H₂

üretimini ana substratlarından birisi olduğu belirtilmiştir (Ohnishi et al., 2010). Park et al. (2021), *Sporolactobacillus vineae* ve *C. butyricum* birlikte kültüre ederek optimal biyohidrojen üretimini elde etmek için her iki suşun sinerjik mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunmuşlardır. Hidrojen üretim veriminin 1,57 mol H₂/mol glukozdan 1,84 mol H₂/mol glukoza yükseldiğini ve mikrobiyal kompozisyonun % 90'ını *C. butyricum*'un oluşturduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar *S. vinea*'nın tek başına hidrojen üretimindeki farkı açıklayamamışlardır. Ancak; *S. vineae* ile ortak kültürde bütirat üretmemesine rağmen, laktat ile bütirat ve H₂ yolu ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir (Park et al., 2021). Detman et al. (2021), şeker pancarı melasından karışık kültür kullanarak beş farklı dolgu yatak reaktörlerinde 130–160 cm³ COD/g melas verim ile en yüksek H₂ üretimini *Clostridia*'lar ile LAB'leri yaklaşık olarak 4:2,5 oranında olduğunda elde etmişlerdir. Ancak; LAB'nin *Clostridia*'lara (3:1–4:1) veya *Clostridia*'nın LAB'ye (5:1–60:1) göre çoklu baskınlığı, hidrojen üretimini azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (Detman et al., 2021). Bu tez çalışmasında ise; *Clostridia*'lar ile LAB'leri arasında reaktörlerdeki yaklaşık oranları, hidrojenin %44 üretildiği M4'te 1:1, %17 hidrojenin üretildiği M7'de 7:1 ve %36 hidrojenin üretildiği M16'da 1:2'dir. M7'de *Clostridia*'ların LAB'lerine oranla çoklu baskınlığı mevcuttur ve düşük H₂ üretimi elde edilmiştir. M4'te *Clostridia*'lar ve LAB'leri eşit bir denge içerisindeyler ve yüksek H₂ üretimi gerçekleşmiştir. M16'da ise; LAB'leri neredeyse *Clostridia*'ların 2 katı oranında bulunmuştur. Ancak; M4 ve M16 örneklerinin reaktörlerinde üretilen kümülatif H₂ değerleri karşılaştırıldığında M16 reaktöründe M4'e göre daha yüksek kümülatif hidrojen üretimi gerçekleşmiştir.

Tür düzeyinde reaktörlerde baskın olan LAB'lerini değerlendirecek olursak; M4 reaktör örneğinde *L. acidipiscis* (NR_112693.1) %23,96 bolluk oranı ile en fazla bulunan organizmadır. *L. acidipiscis* (NR_112693.1)'i takip eden *Clostridia* genus %15,72 oranında *C. butyricum* (AJ458420)'dur. M16 reaktör örneğinde ise; *L. fermentum* (JN175331) %28,28 bolluğunda reaktörde dominant olan *C. butyricum* (AJ458420) (%46,93)'dan sonra en baskın olan cinstir. Her iki reaktörde de *C. butyricum* H₂ üretiminden genel

olarak sorumlu olan organizmadır ve *Lactobacillus* cinsleri ile bir arada bulunmaktadır. *L. acidipiscis*; homofermentatif, basıl bir laktik asit bakterisidir (Tanasupawat et al., 2000). *L. fermentum* ise heterofermentatif, gram pozitif bir laktik asit bakterisidir (Dickson et al., 2005). Homofermentatif bakteriler, glukoz fermentasyonunda birincil yan ürün olarak yalnızca laktik asit üretirken; heterofermentatifler ise laktik aside ek olarak etanol, asetik asit, propiyonik asit ve CO₂ gibi diğer bileşikler de üretebilmektedirler (Puntillo et al., 2020). Park et al., (2021) *Sporolactobacillus vineae* ve *C. butyricum* birlikte kültüre ederek optimal biyohidrojen üretimini elde etmek için her iki suşun sinerjik mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunmuşlardır. Hidrojen üretiminin 1,57 mol H₂/mol glukoz'dan 1,84 mol H₂/mol glukoz'a yükseldiğini ve mikrobiyal kompozisyonun %90'ının *C. butyricum*'un oluşturduğunu belirtmişlerdir. *S. vinea*'nın tek başına hidrojen üretimindeki farkı açıklayamamışlardır. Ancak; *S. vineae* ile ortak kültürde bütirat üretmemesine rağmen, laktat ile bütirat ve H₂ yolu ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir (Park et al., 2021). LAB arasından seçilen 249 suşun *C. butyricum*'un büyümesi üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada 24 suşun büyüme engelleyemediği bildirilmiştir (So et al., 2021). Yazarlar bu çalışmada bu 24 suş içerisinde 4'ünün özellikle *L. brevis* JL16 ve *L. parabucheri* MH44 suşlarının *C. butyricum* büyümesini iki kat arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Laktik asidin asetik asit gibi başka bir karbon kaynağına karıştırılması H₂ üretiminde verimi arttırmak için gerekli olduğu ön görülmektedir. Buna karşılık laktik asidin tek karbon kaynağı olduğu durumlarda da hidrojen üretim verimini olumsuz yönde etkilediği de bildirilmiştir (Cabrol et al., 2017). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında hidrojen üretimi için optimal koşullar altında hidrojen üreticileri ile LAB arasında hidrojen üreticilerinin hakim olma eğilimiyle belirli bir dengenin kurulduğu belirlenmiştir. LAB'nin hidrojenin yüksek olduğu reaktörlerde sayılarını arttırarak *Clostridia*'larla dominant olmaları üretimde olumlu yönde etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

Mezofilik koşullar altında H₂ üretiminin gerçekleştirildiği 3 farklı reaktör denemelerinde üretimin ve verimin en düşük (%17) olduğu reaktör M7 reaktörüdür. Bu reaktör denemesinin diğerlerine göre en büyük farkı ısı ön işlem uygulanmamasıdır. Bu sebeple M7 reaktör örneğinin mikrobiyal profilinin aş örneği (M1) ile yakından benzerlik gösterdiği metagenom analizleri sonucunda belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; M7 reaktör örneğinin mikrobiyal profilinde en baskın olan organizma %19,19 bolluk oranında *A. caccae* (AJ270487)'dir. *A. caccae*, insan dışkılarından izole edilmiş *Clostridia* takımının *Anaerostipes* genusundan gram değişkenli, anaerobik sakkarolitik, çubuk şeklinde bütirat üreten, asetat ve laktat kullanan bir bakteridir (Schwiertz et al., 2002; Sato et al., 2008). Faloy et al. (2009), *A. caccae* DSM 14662^T nin früktoz – asetat ve laktat – asetatı enerji kaynağı olarak kullanarak bütirat, CO₂ ve H₂ üretim potansiyelini gözlemlemişlerdir. Früktoz- asetat enerji kaynağı olduğunda 67,4 mM; laktat – asetatı ise 42,8 mM H₂ üretimi elde etmişlerdir. Ayrıca yazarlar *A. caccae* DSM 14662^T suşunun H₂ üretimi sırasında asetat tüketiminin H₂ üretimi ile negatif ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Faloy et al., 2009). M7 reaktör örneğinde *A. caccae*'den sonra *V. pronyensis* (KC876639) %5,93; *G. barnesae* (AB038361) %4,51 ve *H. ethanolic* (AB669474) %4 bolluk oranlarında reaktörde bulunmaktadır. *V. pronyensis*; Ben Aissa et al. tarafından 2014 yılında tanımlanmıştır. Termotolerant, anaerobik, gram-pozitif, spor oluşturan bakteri Prony Bay, Yeni Kaledonya'daki bir hidrotermal bacadan izole edilmiştir. Firmicutes filumuna ait *Clostridia* sınıfı, *Clostridiales* takımı, *Vallitalea* cinsinin yeni bir türünün tip suşu olarak önerilmektedir. Yazarlar *V. pronyensis*'in büyümesinde maya özütü, glukoz, selobiyoz, maltoz, mannoz, galaktoz, laktoz, ramnoz, rafinoz, riboz, früktoz, sukroz, ksiloz, pepton ve triptonu substrat olarak kullandıklarını belirtmişlerdir. Bunun sonucunda glukoz metabolizmasından kaynaklanan son ürünlerin asetat, etanol, H₂ ve CO₂ olduğu bildirilmiştir (Ben Aissa et al., 2014). M7 reaktör örneğinde bulunan *G. barnesae* Firmicutes filumuna ait *Tissierellales* takımı, *Gallicola* cinsinin zorunlu anaerobik, gram pozitif, hareketsiz kok şeklinde bakterilerdir (Ezaki et al., 2001; Euzeby and Tindall, 2004; Schiefer-Ullrich et al., 1985). Glukoz,

laktoz, rafinoz, riboz ve mannoz fermente edemezler ve pepton/maya özü/glukoz (PYG) ortamında metabolik son ürünleri asetik ve bütirik asitlerdir (Ezaki et al., 2001). %4 bolluk oranında M7 reaktör örneğinde bulunan *H. ethanolica* ise; 2014 yılında Liu et al. tarafından herbisit atıksu arıtan anaerobik, mezofilik çamurdan izole edilmiştir. *H. ethanolica* ile glukozun fermentasyonu sonucunda elde edilen başlıca son ürünler asetat, etanol ve hidrojen (Liu et al., 2014).

Mezofilik koşullar altında karanlık fermentasyon ile meyve-sebze atıklarından 3 farklı reaktör denemesinde biyohidrojen üretiminde reaktörlerdeki mikrobiyal profillerin belirlenmesi DGGE ve metagenom analizleri ile yapılmıştır. Moleküler teknikler arasında DDGE; mikrobiyal karakterizasyon teknikleri arasında taksonomik sınıflandırma ve geniş veritabanı gibi avantajlara sahiptir. Ancak analiz işleminin zaman alıcı ve külfetli sürecinden dolayı yeni nesil sekanslamaya göre dezavantajlıdır. Yeni nesil sekanslama ise; DGGE'nin aksine; hızlı, basit, ucuz, ölçeklenebilir, yüksek verime sahiptir. Yalnızca tek sarmallı DNA üzerinde yararlıdır, yüksek oranda sıralama hataları ve yüksek kaliteli dizinin düşük verimi gibi dezavantajları da olabilmektedir (Kumar et al., 2018). Bu tez çalışmasında en detaylı ve verimli moleküler karakterizasyon sonuçları yeni nesil sekanslama ile gerçekleştirilen metagenom analiziyle elde edilmiştir. Reaktörlerden alınan örnekler ile ilk olarak sistemin toleransı ve mikrobiyal profildeki değişimleri incelemek amacıyla DGGE analizleri yapılmıştır. Ancak DGGE analizinin çeşitli güçlüklerinden (jelden istenen bantların alınamaması, zaman aşımından bantların solması, bantların birbirine yakın olması vb.) dolayı yüksek verimde sonuçlar alınamamıştır. DGGE analizi yapılırken; satın alınan saf kültürlerin genomik DNA'larında (*C. pasteurianum* (DSM-525), *C. butyricum* (DSM-10702) ve *C. tyrobutyricum* (DSM-2637) analizde belirteç olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunda D bantının *C. pasteurianum* strain JCM 1408 ile %100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ancak metagenom analizleri sonuçlarında hiçbir örnekte *C. pasteurianum*'un herhangi bir suşuna rastlanmamıştır. Ayrıca DGGE analizi sonuçlarında bantların birçoğu kültüre edilemeyen bakteriler ile benzerlik göstermiştir. Bu sebeple; hidrojen üretiminde mikrobiyolojik açıdan detaylı ve verimli

değerlendirmek pek mümkün olamamıştır. Genel olarak yapılan iki farklı mikrobiyal karakterizasyon analizinde de H₂ üretiminin yüksek olduğu reaktör örneklerinde *Clostridium* ve *Lactobacillus* cinslerinin baskın olduğu görülmüştür.

5.2 Real Time – PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Mikrobiyal yapının izlenmesi, belirli genlerin ve dizilerin saptanarak nicelenmesi; değişen işletme parametrelerine bağlı olarak reaktör sisteminin performansının ve toleransının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen PCR analizleri temel bir araçtır. Konvansiyonel PCR'nin yalnızca kalitatif analiz yapabilme dezavantajından dolayı kantitatif tabanlı PCR (qPCR) geliştirilmiştir. Bu, mikrobiyal topluluğun tanımlanması ve değerlendirilmesi için basit niceleme veya gerçek zamanlı analiz gerçekleştirmek için doğaçlama bir yöntemdir (Savichtcheva et al., 2011). Bu tez çalışmasında kuru fermentör düzeğinde karışık kültürden üretilen H₂ yüzdelere göre *Clostridium* türlerindeki (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*) değişimlerin irdelenmesi qPCR analizleriyle yapılmıştır. Analizlerde seçici olmayan bir floresan boya olan SYBR Green farklı *Clostridium* türlerine özgü primerlerle kullanılmıştır. SYBR Green'nin iyi tasarlanmış primer setleriyle qPCR'de kullanımı, TaqMan problemlerini kullanan qPCR kadar hassas olabilmektedir. Ancak SYBR Green ile çalışılması çok daha ucuzdur. Bu nedenle, qPCR analizinin mikrobiyal profilde hidrojen üreticileri olan *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* ve *C. pasteurianum* türlerinin hızlı tanımlanması ve miktar tayini için spesifik, güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Otoklavlanmış küçük partiküller denemesinde fermentörde PT 1. günde *C. tyrobutyricum* ve *C. pasteurianum* gen kopya sayıları 10² DNA/mL olarak ölçülmüştür. Hidrojenin kuru fermentörde 2. günde %44 değerlerine yükselmesiyle *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayıları 10⁵ DNA/mL'e yükselmiştir. *C. pasteurianum* DNA'sına ise bugün de rastlanmamıştır. Fermentörün diğer günlerinde H₂ üretiminin düşmesiyle *Clostridium* türlerinin de miktarları düşmüştür. Otoklavlanmamış küçük

partiküllere denemesinde de reaktörün ilk günlerinde *Clostridium* türlerine rastlanmamıştır. Bugünlerde H₂ üretimi de gerçekleşmemiştir. H₂ üretiminin %17'e çıkmasıyla gen kopya sayıları *C. butyricum*'un 10² gen kopya sayısı DNA/mL ve *C. tyrobutyricum*'un 10⁴ gen kopya sayısı DNA/mL'e yükselmiştir. Bu reaktör denemesinde H₂ miktarı 6. günde artmaya başlamış olup; *Clostridium* türlerinin de üretimle paralel olarak arttığı gözlemlenmiştir. Otoklavlanmış büyük partiküller denemesinde de diğer denemelere benzer şekilde reaktörün ilk günlerinde H₂ üretimi gerçekleşmemiş olup *Clostridium* türlerine de rastlanmamıştır. Kuru fermentörün 2. gününde hidrojenin %36'a yükselmesiyle birlikte *Clostridium* 16S rRNA, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gen kopya sayıları 10⁵ DNA/mL; *C. pasteurianum* ise; DNA/mL'ye yükselmiştir. Tüm reaktör denemelerinde H₂ üretiminin artış veya azalışına paralel olarak *Clostridium* türlerinin de miktarlarının paralel şekilde artış ya da azalış gösterdiği tespit edilmiştir. qPCR analizlerinin sonuçlarından da anlaşıldığı gibi hidrojen üreticilerinin reaktördeki miktarları H₂ üretimini doğrudan etkilemektedir. Savichtcheva et al. (2011), hidrojen üreten *C. butyricum*, *C. felsineum* ve *C. pasteurianum*'un gyrA ve recA genlerini hedefleyen yeni primer setleri tasarlamışlardır ve qPCR analizleri sonucunda genlerin miktarlarını 10⁶ adet/mL olarak tayin etmişlerdir. Bir başka çalışma da ise; ekolojik olarak birbirine uzak olan *Thermatoga neapolitana* ve *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*'un ortak kültüründe biyohidrojen üretimi potansiyelinin *T. neapolitana*'a ait *hydA* geninin kopya sayısı ile paralel şekilde artışı qPCR analiziyle gösterilmiştir (Okonkwo et al., 2018).

Farklı koşullarda çalışılan 3 farklı reaktör denemesinde önemli H₂ üreticilerinden olan *C. butyricum* türünün üretimin yüksek olduğu örneklerin hepsinde mevcut olduğu görülmüştür. H₂ üretiminin düşük yüzdelerde (%17) üretildiği M7 reaktör örneğinde düşük miktarlarda (10² gen kopya sayısı DNA/mL) ölçülürken; üretimin yüksek olduğu M4 ve M16 reaktör örneklerinde ise daha yüksek (10⁵ gen kopya sayısı DNA/mL) miktarlarda olduğu tayin edilmiştir. Bu da fermentörde *C. butyricum* varlığının H₂ üretimini önemli ölçüde etkilediğini ve üretimi arttırdığını göstermektedir. DGGE ve metagenom analizlerinde de benzer şekilde mikrobiyal profilde

baskın olan türlerden biri olmuştur. *C. butyricum* bilinen en iyi hidrojen üreticisi organizmalardan biridir. 156 gün boyunca sürekli akış modunda çalıştırılan bir karma kültür biyoreaktöründeki ana hidrojen üreticisi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada; qPCR analizleriyle *C. butyricum* gen kopya sayısının $10^2 - 10^5$ değiştiğini ve H_2 üretiminin de *C. butyricum* miktarına bağlı olarak azalış ya da artış gösterdiğini vurgulamışlardır (Tolvanen et al., 2008). Masset et al. (2012), *C. butyricum* CWBI1009, *C. pasteurianum* DSM525, *C. beijerinckii* DSM1820 ve *C. felsineum* DSM749 suşlarını saf ve kombineli olarak nişasta/glukozun fermentasyonu ile H_2 üretimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında en yüksek H_2 verimini saf *C. butyricum* ve *C. pasteurianum* suşuyla birlikte kültüre ettikleri reaktörlerde elde etmişlerdir. Yazarlar; qPCR analizleri sonucunda *C. butyricum* ve *C. pasteurianum* gen kopya sayılarının reaktör düzeneğinde maksimum $10^8 - 10^9$ mertebelerine ulaştığını bildirmişlerdir (Masset et al., 2012).

C. pasteurianum türü qPCR analizleri sonuçlarına göre reaktör denemelerinde genel olarak bulunmamaktadır ya da var olduğu günlerde miktar olarak çok azdır. Otoklavlanmamış küçük partiküller denemesinde reaktörden alınan örneklerin hiçbirinde rastlanmamıştır. Otoklavlanmış küçük partikül denemesinde sadece perkolasyon tankının 1. ve 8. günlerinde 10^2 gen kopya sayısı DNA/mL mertebelerinde tespit edilmiştir. Bu günlerde de H_2 üretimi gerçekleşmemiştir. Otoklavlanmış büyük partiküller denemesinde ise; H_2 en yüksek üretildiği M16 örneğinde *C. pasteurianum* DNA'sı 10^4 gen kopya sayısı DNA/mL olarak ölçülmüştür. DGGE analizinde de *C. pasteurianum*'un D bantıyla %100 benzerlikte olduğu görülmektedir. Buna rağmen metagenom analizi sonuçlarına göre de M16 reaktör örneğinde rastlanmamıştır. Ancak bilindiği üzere qPCR analizlerinin çok daha düşük DNA seviyesini bile seçme veya izleme konusunda önemli bir stratejiye sahiptir (Kumar et al., 2018). Benzer şekilde *C. tyrobutyricum* DNA'sı reaktör örneklerinde; özellikle H_2 üretiminin yüksek olduğu günlerde, neredeyse *C. butyricum* DNA'sı ile aynı miktarlarda ölçülmüştür. Ancak DGGE analizleri sonucunda bantların *C. tyrobutyricum* ile yakından benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Metagenom analizlerinde ise; H_2 çıkışının yüksek olduğu reaktör örneklerinde (M4 ve M16) %1'in altında

değerlerde (%0,5) olduğu belirlenmiştir. 3 farklı moleküler yöntemde de bu türler için analizlerde farklı sonuçlar elde edilmesi, farklı primer setlerinin kullanılmasından kaynaklı da olabileceğini düşündürmektedir. Herbir analiz de çoğaltılan bölgelerin konumu, dizi ve baz uzunluklarındaki farklılıklar söz konusudur. Ayrıca; qPCR tekniği DNA miktar belirleme çalışmaları için oldukça spesifik bir yöntem olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte; bu teknik ile elde edilen sonuçların etkin şekilde değerlendirilebilmesi için hedef oligonüklotidlerin erişilebilir ve bütünlüğünü koruyor olması gerektiği açıkça belirtilmektedir. Nicel ölçüm yöntemi performansını tanımlamak için kullanılan iki önemli parametre vardır. Bunlar, LoD (limit of detection) ve LoQ (limit of quantification) yani hedef molekül saptama limiti ile bu molekülün nicelik limiti kavramları önemlidir. Buradaki anlatılmak istenen ise şudur; LoD değeri her bir qPCR çalışması için reaksiyon başına güvenle saptanabilen en küçük ölçülebilir miktardır ve LoD değeri en düşük 100 kopya olarak kabul edilmektedir. LoQ ise, örnekteki kabul edilebilir tekrarlanabilirlik ve doğruluk ölçümleri ile ölçülen en düşük oligonükleotid miktarı olarak tanımlanabilir (Olson and Morrow 2012; Frootan et al. 2017). LOD ve LOQ arasındaki bir ölçüm sonucu, LOQ değerinin üzerindeki bir değer ise hedef molekülün gerçek konsantrasyonunu göstermektedir (Stephenson, 2003). Bu tez çalışmasında metagenom analizleri ile elde edilen bakterilerin yüzdesel oranları popülasyon içerisindeki yoğunluklarını gösteren nicel bir yöntem iken, Real-Time PCR ile oligonükleotid belirlenmesi ve nicel tayini ise sadece popülasyon içerisinde belirlenmek istenen bakteri grubu veya gruplarının sayısal değerlerini göstermektedir. Bu iki moleküler biyolojik yöntemin kendi içinde özel anlamlar taşıması yanında, sonuçlar açısından birbiri ile korelasyon göstermesi önemlidir. Metagenom analizleri ile yüzdesel yoğunlukları, Real-Time PCR ile ise popülasyonu oluşturan bireyler içerisinde önem arz eden mikroorganizmaların sayısal değerleri gösterilmiştir.

5.3 Hidrojenaz Geninin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretim süreçlerinden sorumlu olan *hydA* geninin mezofilik koşullar altında yapılan denemedeki

karakterizasyonu yapılmıştır. [FeFe]-hidrojenazın farklı birçok korunan bölgelerde ikamelere sahip olabildiğinden dolayı karışık kültürde türlere özgü *hydA* gen bölgesine ait ayrı ayrı primer setleri tasarlanmıştır. Bunun aksine literatürde çevresel örneklerdeki hidrojenazların çeşitliliğini belirlemek amacıyla tek bir evrensel primer seti kullanan çalışmalar bulunmaktadır. Bu primer çiftleri, H-kümesinin yüksek oranda korunan bölgelerini hedef almaktadır. Bu nedenle, bu primerler karışık kültürde uygulandığında farklı bağlanmalar meydana gelmiştir (Calusinska et al., 2011). Boyd et al. (2009), mikrobiyal toplulukta hidrojenaz çeşitliliğini tanımlamak amacıyla çalışmalarında yaklaşık 500 bç'lik evrensel primer seti kullanmışlardır. Bunun sonucunda hidrojenaz dizilerinin genel olarak *Firmicutes* ile benzerlik gösterirken; *Clostridium* sp. ile yakından benzerlik göstermediğini tespit etmişlerdir. Schmidt et al. (2010) benzer bir yaklaşım ile H-kümesinin yüksek oranda korunmuş L1-L3 motiflerine karşılık gelen evrensel bir [FeFe]-hidrojenaz primer çiftini kullanarak çevresel örnekte tüm hidrojenaz çeşitliliğini hedef alacak şekilde tasarlamışlardır. Ancak çalışmalarında farklı [FeFe]-hidrojenaz genleri çoğalmıştır ve yeni varsayılan hidrojenazların varlığını doğrulamışlardır. Literatürde bulunan bu çalışmalara dayanarak farklı birçok [FeFe]-hidrojenazın korunan bölgelerde ikameleri olabileceğinden tüm çeşitliliğin keşfedilip keşfedilmediğini bilmek zordur. Türe özgü primer setleri ile bu tez çalışmasındaki yaklaşım karışık kültür üzerinde uygulandığında, mevcut farklı kümelerle bağlanma bilgileriyle birlikte yeni bir hidrojenaz sekans çeşitliliği sağlayabileceği düşünülmektedir.

C. butyricum ve *C. tyrobutyricum* türlerine ait *hydA* geninin M4 ve M16 örneklerinde tespit edilmiştir. M7 örneğinde ise negatif sonuç elde edilmiştir. *C. butyricum*'a ait *hydA* gen bölgesine ait filogenetik ağaç Şekil 4.18'de %100-%70 benzerlik aralığında yakınlık ve uzaklıklarını göstermektedir. M4 ve M16 reaktör örneklerinin filogenetik ilişkilerine bakıldığında; *C. butyricum*'a ait *hydA* geni %100 benzerlikte ve *C. butyricum* E4 str. BONT E BL5262 suşuna ait hidrojenaz geni ile birebir ilişkili olduğu tespi edilmiştir. Diğer yakın filogenetik ilişkiler ise; *C. saccharobutyricum*, *Clostridium* sp. ve *C. chromiireducens*'a ait *hydA* gen bölgesidir. Benzer

şekilde *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* gen bölgesinde de M4 ve M16 reaktör örneklerinde *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* geni %100 benzerlikte olup; *C. tyrobutyricum* DIVETGP suşuna ait hidrojenaz geni ile yakın benzerliktedirler. Diğer yakın benzerlikler *Clostridium* sp., *C. kluyveri*, *C. acetobutylicum* ve *C. acidisoli* ait *hydA* gen bölgesidir. Zhao et al., (2019) çalışmalarında *C. guangxiense* ZGM211T ve *C. neuense* G1T suşlarından *hydA* geninin filogenetik ilişkilerini bu genin kısmi dizileri ile değerlendirmişlerdir. 3 farklı filogenetik ağaç oluşturulan bu çalışmada bu suşların birbiriyle yüksek afinite gösterdiğini ve *Clostridium*'un yeni türleri olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *C. acetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. felsineum* ve *C. roseum* tarafından oluşturulan kümenin dışında ayrı bir dal oluşturduğunu ve en yakın ilişkide *C. acetobutylicum* ile olduklarını vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada; 16S rRNA dizi analizine dayalı olarak altı farklı filogenetik kümeyi temsil eden 57 *Clostridium* suşunun (34 farklı genotipik tür) genomları, farklı [FeFe]-hidrojenazlar için ilişkilendirilmiştir. Çalışmada on çift [FeFe]-hidrojenaz kümesine özgü dejenere primerler yeni tasarlanmıştır ve on *Clostridium* suşunda primerlerin özgüllüğünü değerlendirmek ve [FeFe]-hidrojenazların genetik çeşitliliğini incelenmiştir. Sonuçta yazarlar; hidrojen üreticisi olan *C. sartagoforme*, *C. felsineum*, *C. roseum* ve *C. pasteurianum* türlerinde çeşitli hidrojenaz genlerini keşfettiklerini bildirmişlerdir (Calusinska et al., 2011).

Çoklu aminoasit dizilerinin hizalanması sonucunda; M4 ve M16 reaktör örneğinin birbiriyle ve *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* ile *hydA* genleri %100 benzerlikte olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda [FeFe]-hidrojenaz ile yakından benzerlik gösterirken; NiFe hidrojenaz ailesiyle yakından bir ilişkisi bulunmadığı da tespit edilmiştir. *HydA* nükleotid dizisinden bir amino asit dizisi çıkarılarak diğer [FeFe]-hidrojenazlarla amino asit dizisi hizalaması yapıldığında *C. butyricum* *hydA* geninin *C. saccharobutylicum* ile %81,5 ve *C. chromiireducens* *hydA* geni ise %79,5 yakın benzerlik göstermektedir. *C. tyrobutyricum*'a ait *hydA* geninin amino asit dizileri ise; *C. kluyveri* *hydA* gen bölgesi %81 benzerlik ile en yakın *Clostridium* türüdür. BioEdit programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu hizalamada *C. butyricum*'a ait [FeFe]-hidrojenazın 3 farklı küme

bulundururken; *C. tyrobutyricum*'da ise 4 küme bulunduğu tespit edilmiştir. *C. butyricum* CWBI1009 ve DSM 2477 suşlarının en az üç farklı monomerik hidrojenaza ve *C. butyricum* için karakteristik olan trimerik hidrojenaza sahip olduğu bildirilmiştir (Calusinska et al., 2011). *Clostridial* hidrojenaz yapısının paradigması olarak bilinen *C. tyrobutyricum* [FeFe]-hidrojenazın H-kümesi alanı dışında FeS kümeleri içeren üç alan daha içerdiği bilinmektedir. Bu alanların her biri *Clostridium* türlerine özgü olmayanlar da dahil olmak üzere çok sayıda redoks ortağı ile verimli etkileşimlere izin vermektedir. Ayrıca bu FeS proteinlerinin fotosentezde elektron taşıyıcıları olarak görev yapan bitki ve alg ferredoksinlerini ve bakterilerden memelilere redoks zincirlerine katılan ferredoksinleri içerdiği de bilinmektedir (Jo et al. 2010).

C. pasteurianum ve *C. acetobutylicum*'a ait *hydA* geni örneklerde tespit edilmemiştir. Bu türlerin metagenom analizi sonucunda da bulunmadıkları tespit edilmiştir. Ancak Real Time PCR sonuçlarına göre M1 ve M16 örneklerinde sırasıyla $8,13 \times 10^2$ ve $3,77 \times 10^4$ gen kopya sayısı/ml miktarlarında bulunmaktadır. Bunun sebebinin Real Time – PCR'da kantitatif çalışmalarda çok düşük miktarlardaki ürünü belirleme hassasiyeti varken; konvansiyonel PCR'da ürün çoğalmasına rağmen elektroforez sonucunda jelde görüntülenecek miktarlarda olmadığı düşünülmektedir.

Karışık kültürlerde *hydA* geninin karakterizasyonunu ve filogenetik ilişkilerinin tek bir ortak evrensel primerle belirlemek oldukça karmaşıktır. Bu şekilde tasarlanan primer setlerinin kullanılması karışık kültürde özellikle baskın olan türlerin PCR'da amplifiye olabilecektir ve net bir sonuca ulaşamamak mümkündür. Literatürde saf kültürler ile hidrojenaz geninin farklı *Clostridial* türlerindeki yapısını dejenere primerlerle araştıran birçok çalışma mevcuttur. Hidrojenazın birden fazla alt tipi ve hidrojen üretici organizmalarda farklı karakteristik yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Bu sebeple; karışık kültürden H₂ üreten baskın türler belirlenerek; bu işten sorumlu olan hidrojenazın karakterizasyonu ve diğer *Clostridium*'lar ile filogenetik ilişkisini belirlemek amacıyla türe özgü tasarlanan primer setlerinin tez çalışmasında başarılı olduğu görülmüştür. Bu yaklaşım ile

karışık kültürdeki hidrojenazın karakteristik yapısının filogenetik ilişkisi ve çoklu amino asit dizilerinin hizalanarak irdelenmesi ilk kez araştırıldığı düşünülmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Hidrojen; taksonomik olarak geniş bir dağılıma sahip birçok mikroorganizmanın metabolik yolunda mevcut olan bir yan üründür. Yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılan biyohidrojen; temiz, ucuz ve sürdürülebilir bir yakıt enerjisidir. Hızla gelişen mikrobiyal dünyada, potansiyel hidrojen üreten mikroorganizmaların belirlenmesi ve nicelendirilmesi hidrojen verimi açısından oldukça önemlidir. Bu tez çalışması ile mezofilik koşullar altında karanlık fermentasyon ile meyve-sebze atıklarından 3 farklı reaktör denemesinde biyohidrojen üretiminde reaktörlerdeki mikrobiyal profillerin belirlenmesi ve çapraz doğrulama amacıyla hem DGGE ve hem de OTU analizleri ile yapılmıştır. İki farklı mikrobiyal karakterizasyon analizinde de H₂ üretiminin yüksek olduğu reaktör örneklerinde genel olarak *Clostridium* ve *Lactobacillus* cinslerinin baskın olduğu görülmüştür. Özellikle *C. butyricum*'un hidrojen üretimindeki öncü *Clostridium* türü olduğu tespit edilmiştir. Isıl ön işlemin etkilerinin incelendiği çalışmada; ısıyla ön muamele görmüş inokulum ile gerçekleştirilen reaktör denemelerinde hidrojen üreticilerinin baskın hale geldiği ve hidrojen veriminin arttığı gözlenmiştir. Ancak; bu ısıl ön işleme rağmen reaktör denemelerinde *Lactobacillus* türlerinin de baskın olduğu görülmüştür. *Lactobacillus*'ların genel olarak hidrojen üretimi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu öne sürülerek bu bakterilerle ilgili detaylı irdelemeler yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında; hidrojen üretiminin artmasıyla birlikte önemli hidrojen üreticileri olan *Clostridium* genusuna ait türler artarken; *Lactobacillus*'ların da arttığı görülmüştür. Literatürde son yıllarda yapılan çalışmalar; karanlık fermentasyonda *Lactobacillus*'ların metabolik ürünü olan laktatı kullanan *Clostridium* türlerinin büyümelerini ve hidrojen üretimlerini arttırdığını da göstermektedir. Bu sebeple; *Lactobacillus*'ların hidrojen üretimi üzerindeki etkilerinde herhangi bir sonuca varmadan önce daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretim süreçlerinde sorumlu olan *hydA* geninin mezofilik koşullar altında yapılan denemelerde

karakterizasyonu yapılmıştır. Karışık kültürde tüm grupları aynı anda hedefleyen tek bir ortak primer seti tasarlamak karmaşık ve yanıltıcı sonuçlar elde edilmesine sebep olabileceği bilinmektedir. Bu amaçla; tez çalışmasında reaktörlerde bulunan *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum* ve *C. acetobutylicum* türlerine özgü *hydA* gen bölgesine ait ayrı ayrı primer setleri tasarlanmıştır. Bu türe özgü primer setleri ile karışık kültür içerisinde hidrojenaz geninin dağılımının incelenmesi yeni ve etkili bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca *hydA* genlerinin spesifik amplifikasyonuna dayanan burada sunulan tahlil, farklı enzim formlarının moleküler tespiti için etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Etkili bir hidrojen üreten sistem tasarlamak için, tür hidrojen metabolizmasının tam olarak anlaşılması gerekir.

Literatürde biyohidrojen üretimi için saf kültür yerine karışık kültür ile yapılan çalışma sonuçlarının verim açısından daha etkin olabileceğinden sıklıkla bahsedilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan moleküler biyolojik ve metagenomik analizler ile, biyohidrojen üretiminde belirli bazı mikroorganizmaların baskın olduğu ve bu mikroorganizma gruplarının birbirleri ile üretim açısından pozitif bir ilişki içerisinde olabilecekleri görülmektedir. Ayrıca, reaktörler içerisinde baskın olan bu mikroorganizmaların in vitro koşullarda çoğaltılabileceği bilinmektedir. Bu yolla kültüre edilebilen mikroorganizmaların uygun ortamlarda çoğaltılarak seçilmesi ile etkin biyohidrojen üretimi için biyokaynak elde edilebilecektir. Bu sayede, ileride yapılacak çalışmalarla çeşitli deneysel parametreler ve mikroorganizma kombinasyonları ile en fazla verimle biyohidrojen üretilebilecek koşulların sağlanmasının yolu açılmış olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdin, Z., Zafaranloo, A., Rafiee, A., Mérida, W., Lipiński, W., Khalilpour, K.R.**, 2020, Hydrogen as an energy vector, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 1-32p.
- Abo-Hashesh, M., Hallenbeck, P.C.**, 2012, Fermentative hydrogen production, in microbial technologies, *Advanced Biofuels Production*, Springer, USA, 77-92p.
- Abo-Hashesh, M., Wang, R., Hallenbeck, P.C.**, 2011, Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice, *Bioresource Technology*, 102, 8414-8422p.
- Abubackar, H. N., Keskin, T., Arslan, K., Vural, C., Aksu, D., Yavuzylmaz, D. K., Ozdemir G., Azbar, N.**, 2019, Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(33), 17767–17780s.
- Azbar N, Çetinkaya-Dokgöz FT, Peker Z.**, 2009a, Optimization of basal medium for fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater, *International Journal of Green Energy*, 6(4), 371-380p.
- Azbar, N., Çetinkaya-Dokgöz F.T., Keskin T, Korkmaz, K.S., Syed, H.M.**, 2009b, Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7441-7447p.
- Babraham Institute**, A quality control tool for high throughput sequence data, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Erişim tarihi:15 Kasım 2021).
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev D., Margoles, A.**, 2010, Fermentative hydrogen production by diverse microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 5021–5027p.
- Ben Aissa, F., Postec, A., Erauso, G., Payri, C., Pelletier, B., Hamdi, M., Ollivier, B., Fardeau, M. L.**, 2014, Vallitalea pronyensis sp. nov., isolated from a marine alkaline hydrothermal chimney, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(4), 1160–1165p.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B.**, 2014, Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data bioinformatics, <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic> (Erişim tarihi:15 Kasım 2021).
- Boodhun, B.S.F., Mudhoo, A., Kumar, G., Kim, S., Lin C.**, 2017, Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 27471-27481p.
- Boyd, E.S., Spear, J.R. and Peters, J.W.**, 2009, [FeFe] hydrogenase genetic diversity provides insights into molecular adaptation in a saline microbial mat community, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 75, 4620–4623p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Boyd, E.S., Spear, J.R., and Peters, J.W.**, 2009, [FeFe] hydrogenase genetic diversity provides insight into molecular adaptation in a saline microbial mat community, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4620-4623p.
- Budiman, P.M., Wu, T.Y., Ramanan, R.N., Jahim J. Md.**, 2015, Improvement of biohydrogen production through combined reuses of palm oil mill effluent together with pulp and paper mill effluent in photofermentation, *Energy & Fuels*, 29, 5816-5824p.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G., Trably, E.**, 2017, Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function, *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181p.
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., Saint, C.**, 2012, A genetic and metabolic approach to redirection of biochemical pathways of *Clostridium butyricum* for enhancing hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 338–342p.
- Cai, J., Wang, G.**, 2014, Hydrogen production from glucose by a mutant strain of *Rhodovulum sulfidophilum* P5 in single-stage photofermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 20979-20986p.
- Calusinska, M., Joris, B., and Wilmotte, A.**, 2011, Genetic diversity and amplification of different *Clostridial* [FeFe]-hydrogenases by group-specific degenerate primers, *Letters in Applied Microbiology*, 53, 473–480p.
- Chandrasekhar, K., Lee, Y.J., Lee, D.W.**, 2015, Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8266-8293p.
- Cheng, C.H., Hung, C.H., Lee, K.S., Liao, P.Y., Liang, C.M., Yang, L.H., Lin, P.J.**, 2008, Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5242–5249p.
- Cheng, S., Logan, B.E.**, 2007, Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 18871–18873p.
- Cheng, S.A., Xing, D.F., Call, D.F., Logan, B.E.**, 2009, Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis, *Environmental Science and Technology*, 43, 3953-3958p.
- Chittibabu, G., Nath, K. and Das, D.**, 2006, Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21, *Process Biochemical*, 41, 682-688p.
- Chung, K.T.**, 1976, Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellobioparum*, *Applied Environmental Microbiology*, 31, 342-348p.
- Constant, P. and Hallenbeck, P.C.**, 2019, Chapter 3- Hydrogenase, Pandey, A., Mohan, S.V., Chang, J.S., Hallenbeck, P.C., Larroche, C. (Eds.), In Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biohydrogen (Second Edition), Elsevier, USA, 49-78p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cusick, R.D., Bryan, B., Parker, D.S. Merrill M.D., Mehanna, M., Kiely, P.D., Liu, G., Logan, B.E., 2011, Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 2053–2063p.
- Dange, P., Pandit, S., Jadhav, D., Shanmugam, P., Gupta, P.K., Kumar, S., Kumar, M., Yang, Y.H., Bhatia, S.K., 2021, Recent Developments in Microbial Electroly Cell-Based Biohydrogen Production Utilizing Wastewater as a Feedstock, *Sustainability*, 13, 8796.
- Das, D. and Veziroglu, T.N., 2001, Hydrogen Production by Biological Processes: A Survey of Literature, *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13–28p.
- Das, D., 2009, Advancements in biohydrogen production processes: a step towards commercialization, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7349-7357p.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2009, Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296-4304p.
- Dawood, F., Anda, M., Shafiullah, G.M., 2020, Hydrogen production for energy: An overview, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(7), 3847-3869p.
- De Vrije, T., Budde, M.A.W., Lips, S.J., Bakker, R.R., Mars, A.E., and Claassen, P.A.M., 2010, Hydrogen production from carrot pulp by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13206–13213p.
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J., Salamon, A., Ka'zmierzak, W., Błaszczyk, M.K., Barberan, A., Chen, Y., Łupikasza, E., Yang, F., Sikora, A., 2021, Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors, *Frontiers in Microbiology*, 11, 612344p.
- Dickson, E. M., Riggio, M. P.; Macpherson, L., 2005, A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*, *Journal of Medical Microbiology*, 54(3), 299–303p
- Doi, T., Matsumoto, H., Abe, J., Morita, S., 2009, Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the biohydrogen production from wasted bread, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(4), 1735-1743p.
- Duangmanee, T., Padmasiri, S.I., Simmons, J.J., Raskin, L., Sung, S., 2007, 'Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments, *Water Environment Research*, 79, 975–83p.
- Edgar, R.C., 2018, Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs, *Bioinformatics*, 34(14), 2371–2375p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eroglu, E., and Melis, A.**, 2011, Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art, *Bioresource technology*, 102(18), 8403–8413p.
- Euzeby, J.P., Tindall, B.J.**, 2004, Status of strains that contravene Rules 27(3) and 30 of the Bacteriological Code, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 293-301p.
- Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z.-Y., Zhao, L., Shu, S.**, 2001, Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1521-1528p.
- Falony, G., Verschaeren, A., Bruycker, F., Preter, V., Verbeke, K., Leroy, F., Vuyst, L.**, 2009, In vitro kinetics of prebiotic inulin-type fructan fermentation by butyrate-producing colon bacteria: implementation of online gas chromatography for quantitative analysis of carbon dioxide and hydrogen gas production, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 5884–5892p.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.H., Hintz, W. and Almadidy, A.**, 2005, Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey, *Journal of. Biotechnology*, 120, 402-409p.
- Ferraren-De Cagalitan, D.D.T., Abundo, M.L.S.**, 2021, A review of biohydrogen production technology for application towards hydrogen fuel cells, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111413.
- Ferraz Júnior, A.D.N., Zaiat, M., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G.**, 2014, Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UANPBR), *Bioresource Technology*, 164, 371-379p.
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M.**, 2017, Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR), *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1-6p.
- Gopalakrishnan, B., Khanna, N., Das, D.**, 2019, Chapter 4 - Dark-fermentative biohydrogen production, *In Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biohydrogen (Second Edition)*, USA, 79-122p.
- Hallenbeck, P.C. and Ghosh, D.**, 2009, Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?, *Trends Biotechnology*, 27, 287-297p.
- Hallenbeck, P.C.**, 2009, Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379-7389p.
- Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I.**, 2002, Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347p.
- Heidrich, E.S., Edwards, S.R., Dolfing, J., Cotterill, S.E., Curtis, T.P.**, 2014, Performance of a pilot scale microbial electrolysis cell fed on domestic wastewater at ambient temperatures for a 12-month period, *Bioresource Technology*, 173, 87-95p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hsiao, C.L., Chang, J.J., Wu, J.H., Chin, W.C., Wen, F.S., Huang, C.C., Chen, C.C. and Lin, C.Y.**, 2009, *Clostridium* strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7173-7181p.
- Illumina**, 16s metagenomic library prep guide document, <https://support.illumina.com> (Erişim tarihi: 15 Kasım 2021).
- Jayasinghearachchi, H.S., Sarma, P.M., Singh, S., Aginihotri, Mandal, A.K. and 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(17), 7197-7207p.
- Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, S.Y., Lee, D.S., Park, J.M.**, 2010, Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]-hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(3), 1065-1073p.
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D. and Park, J.M.**, 2008, Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process, *Bioresource Technology*, 99, 6666-6672p.
- Kadier, A., Simayi, Y., Abdesahian, P., Azman, N.F., Chandrasekhar, K., Kalil, M.S.**, 2006, A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production, *Alexandria Engineering Journal*, 55, 427-443p.
- Kapdan, I.K., Kargi, F.**, 2006, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569-582s.
- Kim, D.H., Jang, S., Yun, Y.M., Lee, M.K., Moon, C., Kang, W.S., Kwak, S.S., Kim, M.S.**, 2014, Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste: microbial community analysis by next generation sequencing, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 16302-16309p.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplles, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O.**, 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1-11p.
- Kossalbayev, B.D., Tomo, T., Zayadan, B.K., Sadvakasova, A.K., Bolatkhan, K., Alwasel, S., Allakhverdiev, S.I.**, 2020, Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 2627-2639p.
- Kumar, G., Cho, S.-K., Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Mahapatra, D.M., Park, J.H., Pugazhendhi, A.**, 2018, Insights into evolutionary trends in molecular biology tools in microbial screening for biohydrogen production through dark fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 19885-19901p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Kim, S-H., Bakonyi, P., and Lin, C-Y.,** 2015, Modeling and Optimization of Biohydrogen Production from De-oiled Jatropha Using the Response Surface Method, *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40, 15–22p.
- Kumar, N. and Das, D.,** 2000, Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochemical*, 35, 589-593p.
- Lan, E.I. and Liao, J.C.,** 2012, ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6018-23p.
- Lay, J.J.,** 2000, Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen, *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 269–278p.
- Lin, C.Y. and Lay, C.H.,** 2004, Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microfora, *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 41-45p.
- Lin, P.Y., Whang, L.M., Wu, Y.R., Ren, W.J., Hsiao, C.J., Li, S.L., Chang, J.S.,** 2007, Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1728-1735p.
- Litti, Yu.V., Kovalev, D.A., Kovalev, A.A., Merkel, A.Yu., Vishnyakova, A.V., Russkova, Yu.I., and Nozhevnikova, A.N.,** 2021, Auto-selection of microorganisms of sewage sludge used as an inoculum for fermentative hydrogen production from different substrates, *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(58), 29834-29845p.
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Cheng, C.L., Lee, D.J., Chang, J.S.,** 2012, Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15458-15464p.
- Liu, G. and Shen, J.,** 2004, Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 251-256p.
- Liu, H., Wang, G., Zhu, D., Pan, G.,** 2009, Enrichment of the hydrogen producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 9696–9701p.
- Liu, Y., Qiao, J.T., Yuan, X.Z., Guo, R.-B., Qiu, Y.L.,** 2014, *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1756-1762p.
- Liu, Y., Yu, P., Song, X., and Qu, Y.,** 2008, Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2927-2933p.
- Lo, Y.C., Chen, W.M., Hung, C.H., Chen, S.D., Chang, J.S.,** 2008, Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies, *Water Research*, 42, 827-842p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., Steinmetz, H.**, 2011, Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale, *International Journal of Hydrogen Energ*, 36, 10690–10700p.
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., Thonart, P.**, 2012, Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* sp., *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 35p.
- Matsumoto, M., Nishimura, Y.**, 2007, Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(3), 236–241p.
- Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z. and Liangshu, X.**, 2005, Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring, *Research in Microbiology*, 156(1), 76-81p.
- Mishra, P., Roy, S. and Das, D.**, 2015, Comparative evaluation of the hydrogen production by mixed consortium, synthetic co-culture and pure culture using DE, *Bioresource Technology*, 198, 593-602p.
- Mohan, S.V. and Pandey, A.**, 2019, Chapter 1- Sustainable Hydrogen Production: *In Biomass, Biofuels, Biochemicals (Second Edition)*, USA, 1-23p.
- Mohanraj, S., Pandey, A., Mohan, S.V., Anbalagan, K., Kodhaiyolii, S., Pugalenth, V.**, 2019, Chapter 17 - Metabolic Engineering and Molecular Biotechnology of Biohydrogen Production, *In Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biohydrogen (Second Edition)*, Elsevier, 413-434p.
- Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J.P., Carrere, H.**, 2013, Specific inhibition of biohydrogen producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 12273–12282p.
- Monroy, I., Buitrón, G.**, 2020, Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: a review, *Journal of Biotechnology*, 317, 39–47p.
- Mulder, D.W., Boyd, E.S., Sarma, R., Lange, R.K., Endrizzi, J.A., Broderick, J.B., and Peters, J.W.**, 2010, Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydADEF_G, *Nature*, 465, 248-251p.
- Nath, K., Kumar, A. and Das, D.**, 2006, Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11, *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 525-532p.
- Niu, K., Zhang, X., Tan, W-S. and Zhu, M-L.**, 2010, Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 71-80p.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M.**, 2002, Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1367–1371p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oh, Y.K Raj, S.M., Jung, G.Y., Park, S.,** 2013, Chapter 3 - Metabolic Engineering of Microorganisms for Biohydrogen Production, *Biohydrogen*, Elsevier, 45-65p.
- Oh, Y-K., Seol, E-H., Kim, J.R. and Park, S.,** 2003, Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19, *International Journal of Hydrogen Energy*, 28(12), 1353-1359p.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M.,** 2010, Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 8544– 8553p.
- Okamoto, M., Noike, T., Miyahara, T., Mizuno, O.,** 2000, Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes, *Water Science and Technology*, 41(3), 25-32p.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H.,** 2019, Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists, *Vegan: Community Ecology Package*, R package version 2.5-6.
- Olson, N.D., Morrow, J.B.,** 2012, DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation, *BMC Research Notes*, 5 (668), 1-14p.
- Osman, A.I., Deka, T.J., Baruah, D.C., Rooney, D.W.,** 2020, Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks, *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., and Angelidaki, I.,** 2008, Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1204-1214p
- Pandit, S., Balachandar, G. and Das, D.,** 2014, Improvement of energy recovery from cane molasses by dark Fermentation followed by microbial fuel cells, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8, 43-54p.
- Park, J.H., Kim, D.H., Baik, J.H., Park, J.H., Yoon, J.J., Lee, C.Y., Kim, S.H.,** 2021, Improvement in H₂ production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae*, *Fuel*, 285, 119051p.
- Park, J.H., Lee, S.H., Yoon, J.J., Kim, S.H., Park, H.D.,** 2014, Predominance of cluster I *Clostridium* in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges, *Bioresource Technology*, 157, 98-106p.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A.,** 2008, Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5256-5265p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pradhan, N., Dipasquale, L., D'Ippolito, G., Panico, A., Lens, P.N.L., Esposito, G. and Fontana, A.,** 2015, Hydrogen Production by the Thermophilic Bacterium *Thermotoga neapolitana*, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12578-12600p.
- Puntillo, M., Gaggiotti, M., Oteiza, J. M., Binetti, A., Massera A., Vinderola G.,** 2020, Potential of lactic acid bacteria isolated from different forages as silage inoculants for improving fermentation quality and aerobic stability, *Frontiers in Microbiology*, 11, 3091p.
- Rai, P., Pandey, A. and Pandey, A.,** 2019, In-silico-mining of small sequence repeats in hydrogenase maturation subunits of *E. coli*, *Clostridium*, and *Rhodobacter*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44 (33), 17813-17822p.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Molenkamp, R.J., Buisman, C.J.N.,** 2007, Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes, *Water Research*, 41, 1984–1994p.
- Sato, T., Matsumoto, K., Okumura, T., Yokoi, W., Naito, E., Yoshida, Y., Nomoto, K., Ito, M., Sawada, H.,** 2008, Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and in vivo administration of *Anaerostipes caccae* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model, *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 528–36p.
- Savichtcheva, O., Joris, B., Wilmotte, A., Calusinska, M.,** 2011, Novel FISH and quantitative PCR protocols to monitor artificial consortia composed of different hydrogen-producing *Clostridium* sp., *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7530-7542p.
- Schiefer-Ullrich, H., Andreessen, J.R.,** 1985, *Peptostreptococcus barnesae* sp. nov., a gram-positive, anaerobic, obligately purine utilizing coccus from chicken feces, *Archives of Microbiology*, 143, 26-31p.
- Schmidt, O., Drake, H.L. and Horn, M.A.,** 2010, Hitherto unknown [Fe-Fe]-hydrogenase gene diversity in anaerobes and anoxic enrichments from a moderately acidic fen, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 76, 2027–2031p
- Schwiertz, A., Hold, G.L., Duncan, S.H. Gruhl, B., Collins, M.D., Lawson, P.A. Flint, H.J. Blaut, M.,** 2002, *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces, *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 46–51p.
- Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Xing, X-H., Li, B., Duan, N., and Lu, H.,** 2015, Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(8), 3191-3200p.
- Sikora, A., Blaszczyk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U.,** 2013, Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence? *Lactic Acid Bacteria- R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, London, 487– 514p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sinha, P., Roy, S., and Das, D.**, 2015, Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(29), 8806-8815p.
- Sivagurunathan, P., Sen, B., and Lin, C-Y.**, 2015, High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater, *Applied Energy*, 147, 1-9p.
- So, J.S., Oh, K., Shin, Y.**, 2021, Growth stimulation of *Clostridium butyricum* in the presence of *Lactobacillus brevis* JL16 and *Lactobacillus parabuchneri* MH44, *Food Science and Technology*, 1-8p.
- Soares, L.A., Borges Silva Rabelo, C.A., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Silva, E.L., and Varesche M.B.A.**, 2018, Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse, *Biomass Bioenergy*, 117, 78-85p.
- Sompong, O., Prasertsan, P., Intrasingkha, N., Dhamwichukorn, S., and Birkeland, N.K.**, 2007, Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 583-590p.
- Stephenson, F.H.**, 2003, Quantitation of Nucleic Acids, *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*, Academic Press, Chapter 5, New York, 90-108p.
- Stephenson, M., Stickland, L.H.**, 1932, Hydrogenlyases: bacterial enzymes liberating molecular hydrogen, *Biochemical Journal*, 26(3), 712-724p.
- Steven, W., Ginkel, V., Logan, B.**, 2005, Increased biological hydrogen production with reduced organic loading, *Water Research*, 39, 3819-3826p.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., Komagata, K.**, 2000, *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1479-1485p.
- Tang, J., Yuan, Y., Guo, W.Q., Ren, N.Q.**, 2012, Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinese* B49, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 741-747.
- Therien, J.B., Artz, J.H., Poudel, S., Hamilton, T.L., Liu, Z., Noone, S.M., Adams, M.W.W., King, P.W., Bryant, D.A., Boyd, E.S. and Peters, J.W.**, 2017, The physiological functions and structural determinants of catalytic bias in the [FeFe]-hydrogenases CpI and CpII of *Clostridium pasteurianum* strain W5, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-11p.
- Thong, S.O., Prasertsan, P., Karakashev, D., and Angelidaki, I.**, 2008, Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1204-1214p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tolvanen, K.E.S., Koskinen, P.E.P., Ylikoski, A.I., Ollikka, P.K., Hemmälä, I.A., Puhakka, J.A., Karp, M.T.,** 2008, Quantitative monitoring of a hydrogen-producing *Clostridium butyricum* strain from a continuous-flow, mixed culture bioreactor employing real-time PCR, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 542-549p.
- Tsygankov, A.A.,** 2012, Hydrogen production: light-driven processes e green algae microbial technologies, *Advanced Biofuels Production*, Boston, 29-51p.
- Van Ginkel, S.W., Lay, J.J., Sung, S.,** 2001, Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration, *Environmental Science and Technology*, 35(24), 4726–4730p.
- Wang, A., Ren, N., Shi, Y., and Lee, D.J.,** 2008, Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture *Clostridium acetobutylicum* X9 and *Ethanoligenens harbinense* B49, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 912-917p.
- Wang, H., Fang, M., Fang, Z., Bu, H.,** 2010, Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation, *Bioresource Technology*, 101, 8731-8735p.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J. R.,** 2007, Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Applied Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267p.
- Wang, X., Zhao, Y.,** 2009, A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 245-254p.
- Winkler, M., Esselborn, J., and Happe, T.,** 2013, Molecular basis of [FeFe]-hydrogenase function: An insight into the complex interplay between protein and catalytic cofactor, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827 (8–9), 974-985p.
- Yang, G., Wang, J.,** 2019, Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47), 25542-25550p.
- Yi, J., Dong, B., Xue, Y., Li, N., Gao, P., Zhao, Y., Dai, L., Dai, X.,** 2014, Microbial community dynamics in batch high-solid anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 270–279p.
- Zagrodnik, R., Duber, A., Seifert, K.,** 2021, Hydrogen production during direct cellulose fermentation by mixed bacterial culture: The relationship between the key process parameters using response surface methodology, *Journal of Cleaner Production*, 314, 127971p.
- Zhang, T., Liu, H., and Fang, H.H.P.,** 2003, Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition, *Journal of Environmental Management*, 69, 149-156p.
- Zhao, X., Wang, Z., Zhou, X., Qi, N., Chen, F., Li, D., Li, X.,** 2019, Full length obtains of *hydA* and phylogenetic analysis of bio-hydrogen production new species of *Clostridium* based on efficient *hydA* degenerate primers, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(56), 29493-29499p.

TEŞEKKÜR

Başta; bu tezi hazırlamamda değerli katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü konuda bana yol gösteren, çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e; sağladıkları fikir ve akademik destekleri ile yanımda olduklarını hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Nuri AZBAR ve Prof. Dr. Ataç UZEL'e; değerli bilgilerini ve deneyimlerini asla esirgemeyen, her zaman fikirleriyle ve akademik destekleriyle yanımda olan kıymetli eşim Dr. Öğr. Üyesi Caner VURAL'a; TÜBİTAK projesi kapsamında çalışmalarına katkı sağlayan Arş.Gör.Dr. DİDEM AKSU, Doç.Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU ve Dr. Haris Nalakath ABUBACKAR'a; teknik desteklerinden dolayı Bahtiyar YILMAZ'a ve Behiye Nur AKSOY'a ve Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve elemanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin oluşması için TÜBİTAK – MAG grubu tarafından desteklenen 215 M 314 no'lu proje ile mali destek sağlayan TÜBİTAK'a, tez çalışmalarım süresince TÜBİTAK 2211 C - Yurtiçi Öncelikli Alanlar ve YÖK 100/2000 Doktora Burs Programlarına maddi destekleklerinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan çok kıymetli annem Sıdika DOĞAN'a, babam Nihat DOĞAN'a, ağabeyim Utku DOĞAN'a sevgilerini, emeklerini ve desteklerini bir an olsun eksiltmedikleri için minnettarım. Çok değerli dostlarım Binnaz KIRBIYIK, Hatice Merve GÜNERİ ve Tuğba TOPBAŞ'a manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri için ayrıca teşekkür ederim.

Biricik kızım Nil'e

02 / 03 / 2022

Cansu VURAL

ÖZGEÇMİŞ

Cansu Vural sırasıyla; 2003 yılında Mersin Barbaros ilkokulu'ndan, 2007 yılında Mersin Hacı Sabancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nden, 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun olmuştur. 2012 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitime başlamış ve 2016 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitime başlamıştır. Yine 2016 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Dalında yatay geçiş yaparak Doktora eğitime devam etmiştir. 2016 – 2018 yılları arasında 24 ay süre ile TÜBİTAK 215 M 314 no'lu "Kentsel Katı Atıkların Organik Fraksiyonlarından Biyohidrojen ve Biyokömür Üretimi" başlıklı projesinde tez çalışmalarını sürdürmek amacıyla bursiyer olarak görev almıştır. 2017-2021 yılları arasında 48 ay süre ile 'Hidrojen ve Yakıt Pilleri' öncelikli alanında YÖK 100/2000 Doktora bursunu almaya hak kazanmıştır. 2018-2021 yılları arasında TÜBİTAK 2211 C - Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı 'Hidrojen ve Yakıt Pilleri' alanında burs almıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.