



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ

**ÇEVRESEL ÖNEME SAHİP MİKROBİYAL TOPLULUKLARIN KISIT TABANLI
DİNAMİK METABOLİK MODELLERİNİN OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE SİDDİKA KIZILIRMAK

ARALIK 2020



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ

**ÇEVRESEL ÖNEME SAHİP MİKROBİYAL TOPLULUKLARIN KISIT TABANLI
DİNAMİK METABOLİK MODELLERİNİN OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE SİDDİKA KIZILIRMAK

TEZ DANIŞMANI:

DR. ÖĞR. ÜYESİ MUHAMMED ERKAN KARABEKMEZ

ARALIK 2020

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrencisi olan Ayşe Sıddıka KIZILIRMAK' ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu “ÇEVRESEL ÖNEME SAHİP MİKROBİYAL TOPLULUKLARIN KISIT TABANLI DİNAMİK METABOLİK MODELLERİNİN OLUŞTURULMASI” başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr.Üyesi Muhammed Erkan KARABEKMEZ

.....

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Dr. Öğr. Üyesi Hilal TAYMAZ NİKEREL

.....

İstanbul Bilgi Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Senem TEKSOY BAŞARAN

.....

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi:

24.12.2020

ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Yüksek Lisans tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezde;

- 1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;
- 2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;
- 3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dahil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;
- 4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Ayşe S. KIZILIRMAK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca ve bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresinde bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan KARABEKMEZ'e öğrettikleri, yönlendirmeleri ve yardımları için şükranlarımı sunarım. Bilim tarihi, bilim felsefesi gibi alanlara ilgimin uyanmasına vesile olan kitap önerileri, biyoloji-yaşam-bilim üzerine, bakış açımı değiştiren, perspektif kazandıran sohbetleri ve verdiği motivasyonlar için ayrıca teşekkür ederim.

Katkılarından ötürü arkadaşım Zeynep Merve TİRYAKİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimime her zaman destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2020

Ayşe S. KIZILIRMAK

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

ONAY	i
ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iii
KISALTMA LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. MEMBRAN BİYOREAKTÖRLER.....	3
2.2. SİSTEM BİYOLOJİSİ VE MATEMATİKSEL MODELLEME	4
2.2.1 Metabolik Ağ Analizleri	8
2.2.1.1. Akı Denge Analizi (FBA).....	9
2.2.1.2. Dinamik Akı Dengesi Analizi (dFBA)	12
2.3. MİKROBİYAL KOMÜNİTE MODELLEME.....	13
3. YÖNTEM	18
3.1. GELİŞTİRİLEN YAZILIMLAR.....	20
3.2. VARSAYILAN BAŞLANGIÇ SUBSTRAT VE HÜCRE KONSANTRASYONLARI. 22	

3.3. TÜRLE İÇİN SUBSTRAT ALIM ORANLARININ HESAPLANMASI	23
3.4. TÜRLEİN BÜYÜME HIZLARININ HESAPLANMASI	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. TÜRLEİN SUBSTRAT TÜKETİM VE ÜRETİM MİKTARLARI	25
4.2. TÜRLEİN BÜYÜME HIZLARI	31
4.3. TÜRLEİN HÜCRE KONSANTRASYONLARI	32
4.4. TÜR BOLLUKLARI	33
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKÇA	37
EKLER	41
EK 1.....	41
EK 2.....	51
ÖZGEÇMİŞ	53

KISALTMA LİSTESİ

AnMBR : Anaerobik Membran Biyoreaktör

FBA : Akı Denge Analizi

dFBA : Dinamik Akı Denge Analizi

GEMs : Genom Ölçekli Metabolik Modeller

GPR : Gen Protein Reaksiyon

DMMM : Dinamik Mikrobiyal Metabolik Modelleme

COBRA : Kısıtlama Temelli Yeniden Yapılandırma ve Analiz

gDW : Gram Kuru Ağırlık

vd.: ve diğerleri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Model Organizmalar ve Temel Özellikler	18
Tablo 2. Reaksiyonların Hayatilik Analizi	19
Tablo 3. Model Organizmalar ve Temel Biokütle Bileşenleri	20
Tablo 4. Ortamda Asetat 3 Mm iken Zamanla Substratların Türlerle Göre Değişim	26
Tablo 5. Ortamda Laktat Yokken Zamanla Substratların Türlerle Göre Değişimi	27
Tablo 6. Amonyum Yokken Zamanla Türlerle Göre Substratların Değişimi	28
Tablo 7. Türlerin zamanla h^{-1} cinsinden büyüme oranları değerleri	31
Tablo 8. Türlerin hücre konsantrasyonlarının zamanla değişimi	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>E.coli</i> 'nin Metabolik Ağı	5
Şekil 2. Biyoproses Geliştirme İçin Sistem Biyolojisinin Uygulanması	6
Şekil 3. Organizmalara ve Kürasyon Durumlarına göre Model Sayıları	7
Şekil 4. Metabolik Ağ Analizi Aşamaları	9
Şekil 5. Metabolik Sistem Sınırları İçerisinde Sitokiometrik Matris Oluşturma	10
Şekil 6. Mikrobiyal Topluluk Modelleme ile Yakalanabilecek Etkileşimler.....	14
Şekil 7. Mikrobiyal Komünite Modelleme Yaklaşımları.....	15
Şekil 8. Çalışmadaki Türlerin Modellemesi için Genel Algoritma Şeması	21
Şekil 9. Ortamdaki Asetat Miktarı 3 İken Diğer Substratların Değişimi	29
Şekil 10. Ortamdaki Laktat Miktarı 0 iken Diğer Substratların Değişimi	29
Şekil 11. Ortamdaki Amonyum Miktarı 0 iken Diğer Substratların Değişimi	30
Şekil 12. Büyüme Oranları Değişimi	32

ÖZET

Biyolojik arıtma günümüzde çevre kirliliğini azaltmakta sıklıkla başvurulanan bir yaklaşımdır. Endüstriyel atık sularındaki ağır metallerin indirgenmesi gibi amaçlarla biyoreaktörler kullanılmaktadır. Bu tip çalışmalarda kullanılan biyoreaktörlerin performansı, içeriğindeki mikrobiyal topluluğun kompozisyonu, metabolizmaları ve birbirleriyle olan etkileşimleri ile ilgilidir. Organizmaların kimyasal, biyolojik ve moleküler etkileşimlerini bütüncül şekilde ele almak ve yapıları hakkında fikir edinmek amacıyla genom ölçekli metabolik modeller kurulmakta ve bunlar aracılığıyla bilgisayar ortamında simülasyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Çok sayıda farklı tür içerebilen çevresel mikrobiyal toplulukların davranışlarının uzun zaman ve maliyet gerektiren deneysel çalışmalara belirlenmesi yerine, topluluk üyelerinin entegre metabolik modelleri kurularak farklı koşullardaki etkileşimleri modellenenilmekte ve biyoreaktörlerin optimum şekilde tasarlanması için veri üretilebilmesi sağlanmaktadır. Bu çalışma biyoreaktör mikrobiyal topluluklarında sıklıkla karşılaşılan *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina barkeri*, *Shewanella oneidensis* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinin, bütünleşik metabolik modelinin kurulması ve değişen ortam koşullarının büyüme performanslarına etkisinin Dinamik Akı Denge Analizi (dFBA) metodu yardımıyla simüle edilmesi üzerinedir. Çalışmada her zaman noktasında, organizmalar için akı kısıtlamaları, belirlediğimiz substrat konsantrasyonuna göre değişmiş ve bu değişiklikler büyüme hızını dolayısıyla hücre konsantrasyonlarını etkilemiştir. Tüm türlerin hücre konsantrasyonları artış göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoreaktör, mikrobiyal topluluk, metabolik model, Akı Denge Analizi

ABSTRACT

Biological treatment is a practical approach to reduce environmental pollution. Bioreactors are used for purposes such as the reduction of heavy metals in wastewater. The microbial metabolism and contact with each other used in such studies. Genome-scale metabolic models are established in order to take a holistic view of the chemical, biological and molecular interactions of organisms and to learn about their structures, and computer simulations can be performed using these models.

Instead of determining the behavior of environmental microbial communities, which can contain a large number of different species, with long and costly experimental studies, integrated metabolic models of the community members can be constructed. Modeling their interactions in different conditions can produce data for the optimum design of bioreactors.

This study is about the construction of an integrated metabolic model of *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina barkeri*, *Shewanella oneidensis* and *Pseudomonas aeruginosa* species, which are frequently encountered in bioreactor microbial communities, and simulation of the effects of changing environmental conditions on growth performance with the help of Dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) method.

At each time point of the simulations, the flux constraints for organisms are changed according to the substrate concentration we determined, and these changes affected the growth rate and thus the cell concentrations. Cell concentrations of all species are increased.

Keywords: Bioreactor, microbial community, metabolic model, Flux Balance Analysis(FBA)

1.GİRİŞ

Organizmaların organik kirleticileri parçalaması, dönüştürmesi veya iyileştirmesi işlemine biyoarıtma denir. Çeşitli kirleticileri parçalayabilen mikroorganizmalar biyoarıtma potansiyellerini kullanma amacı ile izole edilmiştir (Paul, Pandey, Pandey ve Jain, 2005).

Mikrobiyal topluluklar iyi performans gösteren biyoreaktörler için kirleticiler ve besin maddelerinin mikrobiyal metabolizma yoluyla uzaklaştırılması nedeniyle çok önemlidir. Bir atıksu arıtım sisteminin devamlılığı için fiziksel, kimyasal, operasyonel faktörlerin yanı sıra reaktörün içerdiği mikrobiyal toplulukların reaktördeki yerleşimi ve zaman içindeki değişimi de önemlidir. İçme suyu ve endüstriyel atık su arıtımında yaygın olarak kullanılan membran biyoreaktörlerin performansı, içeriğindeki mikrobiyal topluluğun bileşimi ile yakından ilgilidir (Sahinkaya ve Dilek, 2007).

Karmaşık mikroorganizma popülasyonlarındaki bileşenleri tanımlamak için çeşitli morfolojik, biyokimyasal ve genetik özellikler kullanılmıştır. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir (Ludwig & Schleifer, 1994).

Genomik alanındaki çeşitli gelişmeler sonucu mikroorganizmalar hakkında detaylı bilgilerin sağlanmasıyla birlikte organizmaların metabolik modelleri kurulmuştur (Schilling, Letscher, & Palsson, 2000). Mikrobiyal topluluk üyelerinin metabolik modelleri entegre edilerek, ortam koşullarındaki değişikliklerin etkileri daha ayrıntılı olarak simüle edilebilir. Çevre Biyoteknolojisi alanında mikroorganizmaların bütünsel metabolik modellemesine öncü olacak çalışmalar mevcuttur (Stolyar, 2007; Zhuang 2011; Koch 2011).

Bu tez bağlamında atıksu arıtımında kullanılan anaerobik membran biyoreaktörde (AnMBR) ortam koşulları değiştiğinde hangi suşların ortamda baskın olacağını araştırmak üzere, biyoreaktörde mevcut *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina barkeri*, *Shewanella oneidensis*, ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinin, bütünsel metabolik modelinin kurulması ve farklı ortam kompozisyonlarında büyüme performanslarının ortamda yarattığı farklılıkların

dFBA (dinamik akı denge analizi) metodu yardımıyla simüle edilmesi amaçlanmıştır. Oldukça uzun zaman ve maliyet gerektiren deneysel çalışmalarla çoklu organizmaların davranışlarını belirlemek yerine, kurulacak metabolik model ile bu davranışların tahmin edilmesi ve biyoreaktörlerin optimum şekilde tasarlanması için veri üretilebilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. MEMBRAN BİYOREAKTÖRLER

Anaerobik metabolizma sürecini ve membran teknolojisini birleştiren (AnMBR), hem araştırmalarda hem de sanayide kayda değer bir ilgi görmektedir. Anaerobik arıtma ve MBR teknolojisi total biyokütle tutma, yüksek atık kalitesi, düşük çamur üretimi, ve enerji üretimi avantajlarına sahiptir (Lin vd., 2013).

Atıksu arıtma sistemlerinin sürdürülmesi fizikokimyasal ve operasyonel parametreler ile reaktör performansı arasındaki ilişkilerin yanı sıra mikrobiyal topluluklarının biyoreaktörler ve zaman içindeki değişkenliği ile de bağlantılıdır. Etkili bir biyolojik arıtma sistemi tasarlamak için; arıtmada rol alan mikrobiyal grupların hangi mekanizmalarla arıtımı gerçekleştirdiğinin bilinmesi gerekmektedir (Ludwig & Schleifer, 1994).

Literatürdeki çalışmaların çoğu, beklenen iyileştirme özelliklerini sağlayan mikrobiyal popülasyona hangi tür mikroorganizmaların hakim olduğunu belirlemek için mikroorganizmaların 16S rRNA analizi ile karakterizasyonu üzerinedir (Sahinkaya ve Dilek 2007). Tüm bakterilerde ortak genler bulunur ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. Ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S rRNA molekülü tüm canlılarda bulunmaktadır. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların tespitine imkân vermektedir.

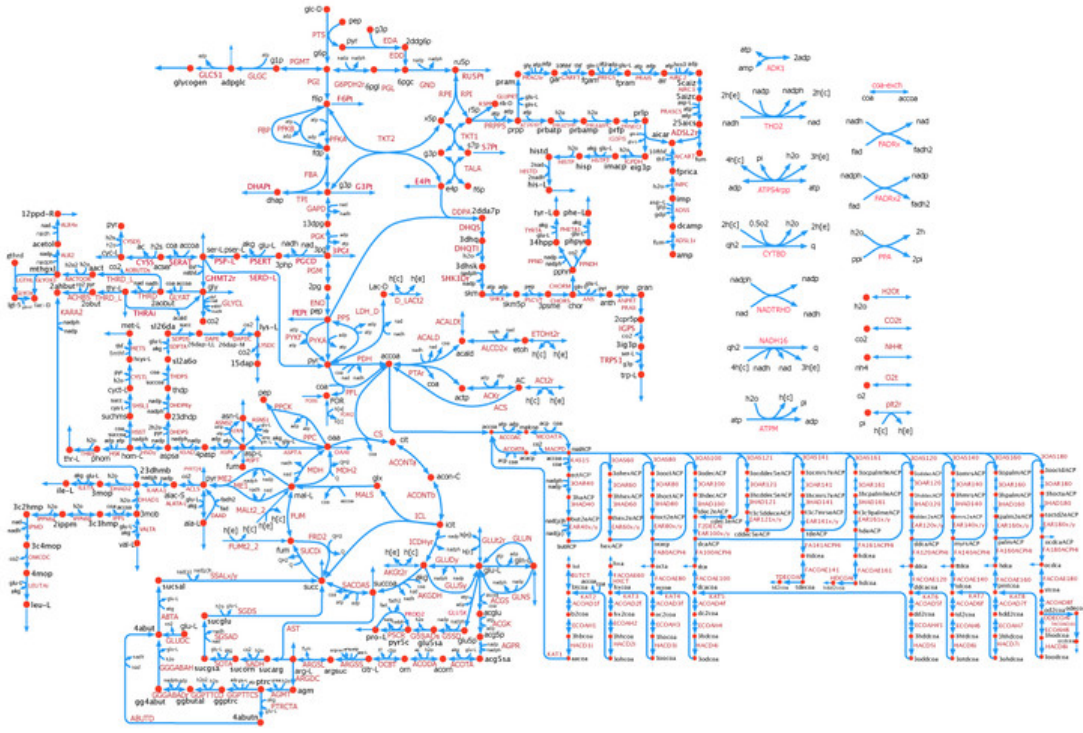
Farklı bakteri türlerinin 16S rRNA sekans ıraksaklığından, çeşitliliğin bir göstergesi olarak faydalanılmaktadır. Kontamine olmuş ekosistemlerin mikrobiyal çeşitliliğinin analizi, bu tür sistemlerin bilinmeyen ve kültürlenmemiş önemli çeşitlilik içerdiğini düşündürmektedir. 16S rRNA karakterizasyonu taksonomik çeşitliliği açıklamak için başarıyla kullanılmaktadır.

Çalışmadaki türlerden *Geobacter sulfurreducens* 16S rRNA sekansının filogenetik analizi, proteobakterilerin delta alt grubunda olduğunu belirlemiştir. Bilinen en yakın akrabası *Geobacter metalireducens* dir (Caccavo et al., 1994) *Methanosarcina barkeri* mezofilik metanojenik bir arkeadır (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990). *Shewanella* cinsinin bir üyesi *S. oneidensis* Proteobacteria sınıfının γ alt sınıfına aittir, tip suşu MR-1 (= ATCC 700550) dir (Venkateswaran vd., 1999). *P. aeruginosa* da proteobakterilerin γ alt sınıfındadır (Anzai, Kim, Park, Wakabayashi, & Oyaizu, 2000).

2.2. SİSTEM BİYOLOJİSİ VE MATEMATİKSEL MODELLEME

Biyoloji, indirgemeciden bütünsel sistem temelli yaklaşımlara yönelmektedir (Kauffman, Prakash, & Edwards, 2003). Milenyum öncesi biyolojik paradigma canlıların yapı taşlarının ve canlılarda meydana gelen olayların, parçaların aydınlatılmasıyla açıklanabileceği varsayımına dayanmaktaydı. Ancak insan genomu projesinin tamamlanması ve buna paralel olarak keşfedilen bir çok gelişme biyolojik olayların kompleks sistemler halinde cereyan ettiğini göstermeye başlamıştır. Nihayetinde genlerin, proteinlerin veya metabolitlerin tek tek değil bir bütün halinde incelenmesi gerekliliği ile birlikte sistem biyolojisi alt disiplini doğmuştur. Sistem biyolojisi canlıların genlerin, proteinlerin ve biyokimyasal tepkimelerin, etkileşen ve bütünleşmiş kompleks bir yapı olarak algılanarak incelenmesini amaçlayan yeni ve çok disiplinli bir bilim dalıdır (Kitano, 2002).

Metabolik ağlar, organizmanın karbon ve enerji kaynaklarının, elektron vericilerin ve alıcılarının biyokütle, enerji ve yan ürünlere dönüşümünü içeren sistemdir. Genomik dizileme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte metagenomik denilen ve birden fazla türün genetik materyalinin topluca dizilenmesi ve tanımlanmasını sağlayan çalışmalar mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmeler neticesinde mikroorganizmalar hakkında detaylı bilgilerin sağlanmasıyla birlikte kimyasal, biyolojik ve moleküler etkileşimler, bütüncül şekilde ele alınmaya başlanmış ve yapıları hakkında fikir edinmek amacıyla matematiksel modellere aktarılmıştır.

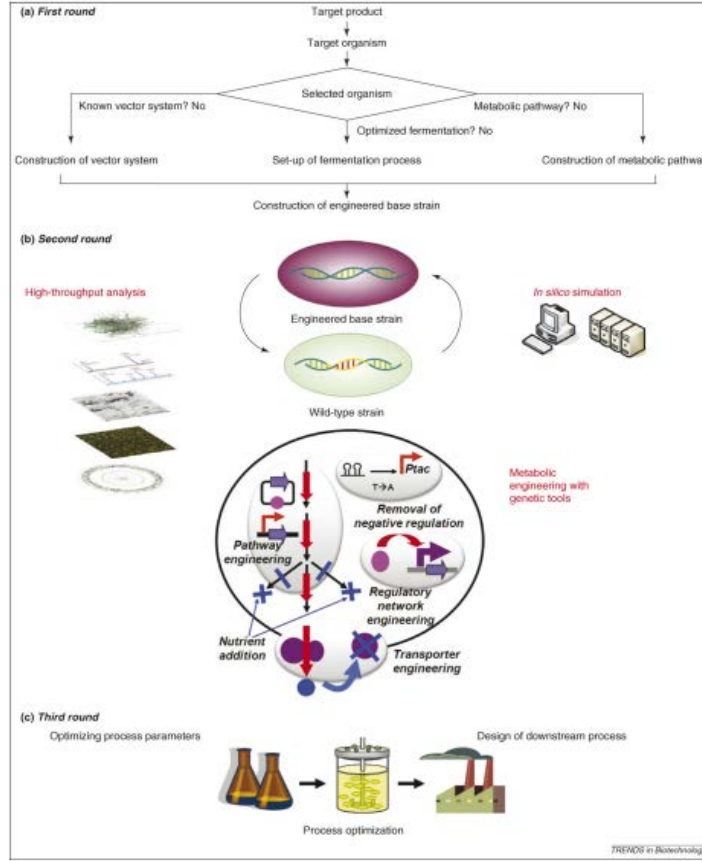


Şekil 1. *E.coli*'nin Metabolik Ağı (Khodayari & Maranas, 2016)

Bir genom tam olarak dizilendiğinde hücre içinde yer alan reaksiyonları temsil eden harita oluşturulabilir. Şekil 1 de *e.coli* nin metabolik haritası bulunmaktadır. Bu bilgi ile belirli bir organizmanın metabolik sisteminin içeriğine ulaşılır (Schilling vd., 2000). Metabolik modeller genomikteki bu gelişmeler ışığında hücre metabolizmasını karakterize etmek ve tahmin etmek için oluşturulurlar. Günümüzde de matematiksel modellerin sistem modellerine dönüştürülmesi ve bu modeller yardımıyla sağlık, genetik, çevre, biyoteknoloji, tarım ve daha birçok alanda büyük ilerlemeler kaydedilmesi amaçlanmaktadır (Kasap vd., 2010).

Sistem biyolojisi perspektifinin neticesinde geliştirilen metabolik modeller özellikle biyoteknolojik tesislerde biyoreaktörlerin performansını optimize etmek için hücre içindeki metabolik yolların optimizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Metabolik mühendislik mikroorganizmaların metabolik yollarının manipülasyonudur. Bunu rekombinant DNA teknolojileri kullanarak, spesifik biyokimyasal reaksiyonların modifiye edilmesi veya hücreye eklenmesi yoluyla gerçekleştirir. Böylece istenen özelliklerin kazandırılması ile hücresel

özelliklerin ve ürün oluşumunun geliştirilmesi sağlanır (Stephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998). Şekil 2 de metabolik mühendislik safhaları görülmektedir.

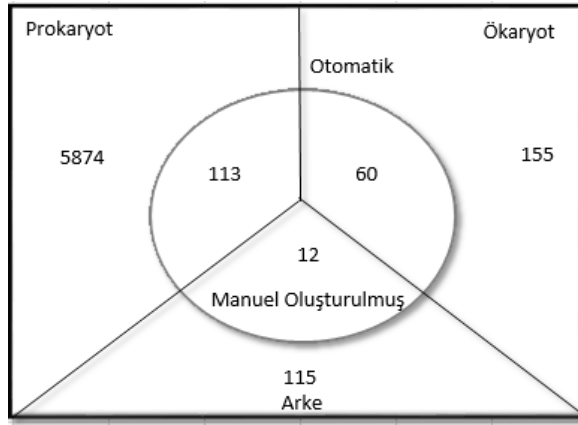


Şekil 2. Biyoproses geliştirme için sistem biyolojisinin uygulanması (Park, Lee & Kim, 2008)

İlk metabolik modeller daha basit sistemlere sahip prokaryotların merkezi karbon metabolizmalarını oluşturan birkaç yolağın modellenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sistem biyolojisi yaklaşımı ile zaman içerisinde bu yollara amino asit biyosentezi, lipid metabolizması vb. diğer metabolik olayların yollarının da eklenmesi ile hücre içinde gerçekleşen bütün biyokimyasal tepkime silsilelerini içeren genom ölçekli metabolik modeller ortaya çıkmaya başlamıştır. Genom ölçekli metabolik modeller (GEMs), bir organizmanın metabolik yeteneklerinin sistematik değerlendirmesine izin verir. Bu modeller, farklı çevresel koşullar altında ve genetik değişikliklere yanıt olarak mikroorganizmaların metabolik davranışlarını analiz etmek ve tahmin etmek için, daha gelişmiş organizmalardaki süreçleri

anlamak için taslak olarak kullanılır. Yetiştirme koşulları kolay bir şekilde düzenlenebilen, değiştirilebilen, maliyeti yüksek olmayan, yeterince küçük, yaşam döngüsü kısa, uygun taksonomik basamakta yer alan, literatürde hakkında yeterince bilgi birikmiş organizmalardan seçilirler. Model organizmalarla yapılan çalışmaların sonuçları ile başta insan olmak üzere daha kompleks organizmaların daha iyi anlaşılması amaçlanır.

GEM'lerin manuel olarak kurulması, genom dizilenmesi, hedef organizmaya özgü bir dizi gen protein reaksiyon (GPR) ilişkisinin oluşturulması, termodinamik temelinde reaksiyon geri dönüşümünün tahmini ve enzim lokalizasyonu ve diğer birçok veri ve bilgi kaynağının dikkate alınması gereken zaman alıcı bir prosedürdür (Gu, Kim, Kim, Kim, & Lee, 2019). Bu sorunu çözmek için, otomatik GEM rekonstrüksiyonu için çeşitli yazılım programları geliştirilmiştir. Şekil.3 de manuel olarak küresasyonu yapılan ve otomatik oluşturulmuş modellerin sayısı organizmaların sınıflandırılmasına göre verilmiştir.



Şekil 3. Organizmalara ve Küresasyon Durumlarına göre Model Sayıları

GEM'lerin yüksek verimli üretimini içeren üç çalışma, Path2Models (Büchel vd., 2013), AGORA (Magnúsdóttir vd., 2017) ve CarveMe (Machado, Andrejev, Tramontano, & Patil, 2018), 6000'den fazla GEM'nin yeniden inşasına imkan tanımıştır. CarveMe, yeniden yapılandırılan bakteriyel GEM'lerin % 92 sine karşılık gelen 5587 bakteriyel GEM'i yeniden yapılandırmak için kullanılmıştır. Path2-Modeller, ilk büyük ölçekli GEM imar projesi, BioModels veri tabanından erişilebilen 2606 organizma için GEM'leri yeniden yapılandırmıştır. Path2Models yoluyla geliştirilen GEM'ler, bakteri, arkea ve ökaryotlar için yeniden

yapılandırılan tüm GEM'lerin sırasıyla yaklaşık %20, %98 ve %89 unu kapsamaktadır. AGORA modelleri, metabolik modellerin yeniden yapılandırılması, araştırılması, karşılaştırılması ve analizi için kaynak olan çevrimiçi GEM rekonstrüksiyon platformları ModelSEED (Devoid vd., 2013) ve KBase (Arkin vd., 2016) kullanılarak yarı otomatik bir şekilde hazırlanan insan bağırsak mikrobiyotasının 773 üyesinin GEM'lerini içermektedir. 2019'dan itibaren 818 AGORA modeline VMH (Virtual Metabolic Human) veri tabanından erişilebilmektedir.

Otomatik model geliştirme platformlarındaki gelişmelere rağmen GEM'lerde boşluklar olabilmektedir ve manuel validasyonu hala gereklidir. Var olan modelleri geliştirme, farklı suşlar için model geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Günümüzde bilimsel araştırmalarda en sık kullanılan model organizmalar şunlardır:

E.coli ; Bir bakteri (prokaryot) olan *E. coli* en eski ve en yaygın model organizmadır. *E.coli*'nin (iML1515) modeli 2251 reaksiyon, 1136 metabolit, 1053 gen/protein/enzim içerir.

S.Cerevisiae; En yaygın kullanılan tek hücreli ökaryotik organizmadır. *S.cerevisiae*'nin (iMM904) modeli 1577 reaksiyon, 1226 metabolit, 905 gen/protein/enzim içerir.

C.elegans (nematod), *D.Melanogoster* (sirke sineği), *D. Rerio*(zebra balığı), *M.Musculus* (fare) yaygın çalışılan çok hücreli model organizmalardır.

H.sapiens'in Recon 3D modeli 5835 reaksiyon, 10600 metabolit, 2248 gen/protein/enzim içermektedir. İnsanlarda metabolik fonksiyonların entegre analizlerini sağlamak, hastalıkla ilişkili mutasyonları işlevsel olarak karakterize etmek ve belirli ilaçlara maruz kalmanın neden olduğu metabolik yanıt imzalarını tanımlamak için kullanılmaktadır.

Bazı organizmalar ise model organizma olarak kullanılmalarından ziyade kendilerinin bazı spesifik özelliklerinin araştırılmaya değer olmasından ötürü genom ölçekli metabolik model rekonstrüksiyonlarına konu olmuşlardır. Ekstrem koşullarda yaşayabilen organizmalar, ticari öneme sahip organizmalar ya da biyoarıtımda rol alan (bu çalışmanın konusu olan) organizmalar bu şekildedir.

2.2.1 Metabolik Ağ Analizleri

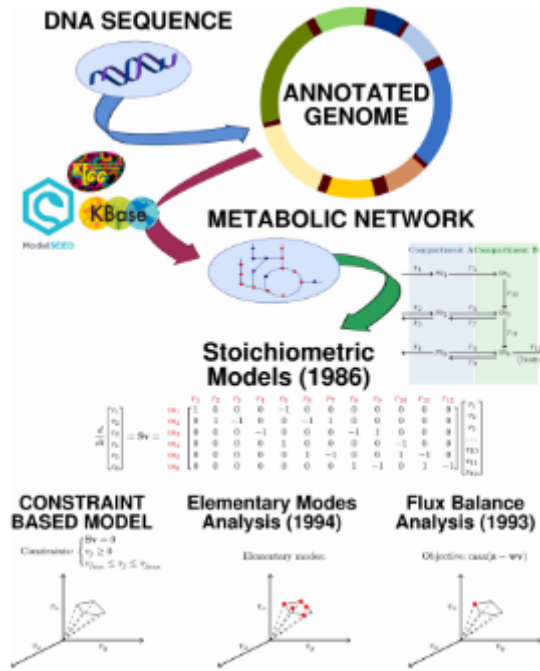
Metabolik ağların analizi birbirine bağlı reaksiyonlardan oluşan karmaşık metabolik ağı organize edilmiş yollara ayırır. Analiz araçları temel olarak;

Metabolik Akı Analizi (Stephanopoulos vd.1998; Wiechert 2001),

Akı Denge Analizi (Kauffman vd.,2003; Price vd.,2004; Edwards vd., 1999),

Metabolik Yol Analizi (Klamt vd., 2003; Schuster vd,1994; Schilling vd.,2000)

Problem formülasyonunda farklılıklar olsa da, bu araçlar aynı şekilde geliştirilir. Tüm akı analiz yöntemlerinin temeli, her bir tepkimenin stokiyometrik katsayılarının sayısal bir matris şeklinde gösterilmesidir. Bu çalışmada daha çok Akı Denge Analizi üzerinde çalışılmıştır.



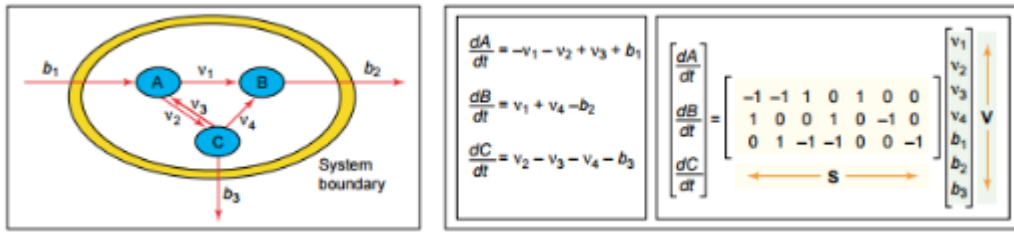
Şekil 4. Metabolik Ağ Analizi Aşamaları (Succurro & Ebenhöh, 2018)

2.2.1.1. Akı Denge Analizi (FBA)

Akı Denge Analizinin temel varsayımı hücrenin durağan halde dengede olduğudur; dolayısıyla hiçbir metabolitin miktarının zaman içerisinde artmadığı veya azalmadığı varsayılmaktadır. Akı birim zamanda reaksiyondan geçen metabolit miktarıdır. Akı denge analizi (FBA, Flux Balance Analysis), büyüme hızı gibi objektif fonksiyonun (amaç fonksiyonu) optimizasyonu ile kısıtlamalarla metabolitlerin metabolik bir ağ üzerinden akışını analiz etmeye yönelik olarak matematikte yaygın olarak kullanılan lineer programlama tekniğinden uyarlanmış bir

yaklaşımdır. Genom ölçekli metabolik modellerin analizinde en çok kullanılan matematiksel yaklaşımların başında gelir. Bu ağ rekonstrüksiyonları, bir organizmada bilinen tüm metabolik reaksiyonları ve enzimleri kodlayan genleri içerir.

Ağ içerisinde faaliyet gösteren reaksiyonların etrafına bir sistem sınırı çizilebilir. Akılar sisteme giriş ve çıkışları temsil eder. FBA, bu metabolik ağda metabolitlerin akışını hesaplar, böylece bir organizmanın büyüme hızını veya biyoteknolojik açıdan önemli bir metabolit üretim hızını tahmin etmeyi mümkün kılar (Varma & Palsson, 1994). Akı dengesi modelleri kullanılarak çeşitli organizmalar için çevresel koşullar simüle edilerek veya belirli yollardan akıları kapatarak belirli organizmalar için teorik olarak mümkün olan fenotipler tanımlanmıştır (Stolyar vd., 2007).



Şekil 5. Metabolik sistem sınırları içerisinde sitokiyometrik matris oluşturma (Kaufman,2003)

Akı dengesi analizi, mikroorganizmalardaki metabolik akışları farklı büyüme koşullarında kısıtlamalarla, her bir metabolik reaksiyon için kinetik parametreler hakkında bilgi olmadan tahmin eder (Feist & Palsson, 2008). Akışlar tipik olarak saat başına gram biyokütle başına (kuru ağırlık) milimol ile ölçeklendirilir ve biyokütle genellikle saat başına gram (kuru ağırlık) halinde verilir. Metabolit değişim hızı bu matris ile akıların çarpımına eşittir.

$$\frac{dX}{dt} = S.v \quad (\text{Eş. 1})$$

S : Sitokiyometrik bir $m \times n$ matrisi

m : metabolit sayısı

n : ağda yer alan reaksiyonların sayısı

v : reaksiyonlardan geçen akıların matrisi

X : metabolit konsantrasyonu

1. Biyolojik sistemlerde reaksiyon sayısı karakteristik olarak metabolit sayısından fazla olduğundan bu homojen lineer denklem sisteminin sonsuz çözümü bulunur. Bir hücresel sistem üzerindeki kısıtlamalar hiçbir zaman tam olarak bilinmediğinden, kararlı durum çözümleri mümkündür (Varma&Palsson, 1994). Kararlı hal koşulları altında metabolitlerin zamanla konsantrasyonlarının değişmediği kabul edilerek zamanın türevi sıfır yapılır ve sonuçta akıyı hesaplamanın mümkün olduğu bir lineer homojen denklem seti oluşturulur, sonsuz çözüm uzayı kapalı bir muhtemel çözüm konisine dönüştürülür:

$$S * v = 0$$

2. Her reaksiyona, reaksiyonların izin verilen maksimum (v_{lb}) ve minimum (v_{ub}) akılarını tanımlayan üst ve alt sınırlar da verilebilir. Bu sınırlar bir sistemin izin verilen akı dağılımlarının alanını, yani her metabolitin her reaksiyon tarafından tüketilme veya üretilme hızlarını tanımlar. Farklı kısıtlamalar da eklenebilir.

$$\text{Öyle ki } v_{ub} < v < v_{lb}$$

3. Bir sonraki adım, üzerinde çalışılan problemle ilgili olan biyolojik amaç biçiminde bir fenotipi objektif fonksiyon olarak tanımlamaktır. Tipik objektif fonksiyonlar büyüme hızının (μ) maksimuma çıkarılması, ATP üretiminin maksimize edilmesi veya minimize edilmesi, genel akışların minimize edilmesi gibidir, ortaya çıkan akı dağılımı, modelleyicinin nesnel fonksiyonu öznel seçimine bağlıdır.

Genellikle, yeni bir hücre veya organizma oluşturmak için gerekli olduğu bilinen tüm biyokimyasal öncülleri özetleyen bir biyokütle reaksiyonu gibi belirli bir doğrusal metabolik amaç tanımlanır. Büyüme hızı metabolik bileşiklerin nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi biyokütle bileşenlerine dönüştürülme hızıdır. Biyokütle reaksiyonu deneysel ölçümlere dayanmaktadır. Biyokütle üretimi, yapay bir “biyokütle reaksiyonu” eklenmesiyle matematiksel olarak temsil edilir.

Örneğin *M.barkeri* ‘nin büyüme tepkimesi (Feist vd., 2006) şu şekildedir:

0.5621 ala-L + 0.3237 arg-L + 0.2638 asn-L + 0.2638 asp-L + 0.1002 cys-L + 0.288 gln-L + 0.288 glu-L + 0.6704 gly + 0.1037 his-L + 0.3179 ile-L + 0.493 leu-L + 0.3755 lys-L + 0.1682 met-L + 0.2027 phe-L + 0.2419 pro-L + 0.2361 ser-L + 0.2776 thr-L + 0.0622 trp-L + 0.1509 tyr-L + 0.4631 val-L + 0.0262 ptrc + 0.0047 hspmd + 0.0154 glycogen + 0.0001 accoa + 0.000006 coa + 0.0022 nad + 0.0001 nadh + 0.0001 nadp + 0.0004 nadph + 0.000003 succoa + 0.0331 datp + 0.0215 dctp + 0.0215 dgtp + 0.0331 dttp + 0.001 amp + 0.1379 ctp + 0.2222 gtp + 0.1489 utp + 0.0007 dpgpg + 0.0101 3hdpgpg + 0.0027 dpgpi + 0.0135 3hdpgpi + 0.0007 dpgpe + 0.0027 3hdpgpe + 0.0013 dpgps + 0.0115 3hdpgps + 0.0162 gdpapi + 0.0206 com + 0.00004 f420-2 + 0.00003 f420-3 + 0.0004 f420-4 + 0.0003 f420-5 + 0.00001 f420-6 + 0.000001 f420-7 + 0.0236 h4spt + 0.0047 adocblhbi + 0.002 f430 + 0.0005 cob + 0.0001 thf + 0.000005 f390a + 0.000005 f390g + (x + .1846 atp) + x h2o ----> (x - .002) adp + (x - .0025) h + x pi + .7990 ppi

Belirtilen optimizasyon problemine çözüm bulma sürecine akı dengesi analizi (FBA) denir ve doğrusal programlamaya dayanmaktadır.

2.2.1.2. Dinamik Akı Dengesi Analizi (dFBA)

Van Riel ve arkadaşları, akı dengesi analiz probleminin belirli zaman instantlarındaki metabolit seviyelerinin değişim oranı üzerindeki kısıtlamalarla birlikte çözüldüğü değiştirilmiş bir FBA yaklaşımı olan Dinamik Akı Dengesi Analizi'ni önermişlerdir (Van Riel, Giuseppin & Verrips, 2000).

Dinamik akı denge analizi (dFBA) kullanılarak zamana göre başlangıç koşullarındaki değişiklikleri, metabolitlerin tüketimi ve üretimini, biyokütle değişikliklerini simüle etmek ve çevresel değişikliklere tepki olarak metabolizmayı değiştirmek mümkündür. Kinetik parametreler ve özellikle sınırlayıcı metabolitlerin (glikoz ve oksijen gibi) alım oranları gibi bilgilere ihtiyaç vardır. Türlerin bolluğu ve metabolik durumları, ortama tepki olarak değişmektedir.

Klasik FBA, dFBA ile mümkün olan metabolit konsantrasyonlarını tahmin edemez. FBA yalnızca metabolik akı dağılımını tanımlar ve akıların dinamik özellikleri hakkında bilgi sunmaz. (Varma & Palsson, 1994b). Bu nedenle, akıların değişim oranı üzerindeki kısıtlamalar açıkça probleme dahil edilmelidir. dFBA, akı kısıtlamalarının değişim oranını içerir. dFBA için iki farklı formülasyon sunulmuştur (Mahadevan, Edwards, & Doyle, 2002).

Statik Optimizasyon Yaklaşımı (SOA): Bu yaklaşım, simülasyon süresinin birkaç zaman aralığına bölünmesini ve her bir zaman aralığının başlangıcında anlık optimizasyon probleminin klasik FBA ile çözülmesini ve ardından aralık boyunca entegrasyonu içerir. Optimizasyon problemi, belirli bir zamanda akı dağılımını elde etmek için simülasyon sırasında tekrar tekrar LP problemi kullanılarak çözülür.

Dinamik Optimizasyon Yaklaşımı (DOA): Akıların ve metabolit seviyelerinin zaman profillerini elde etmek için tüm ilgi süresi boyunca optimizasyonu içerir. Dinamik optimizasyon problemi doğrusal olmayan programlama (NLP) problemine dönüştürülür ve NLP problemi bir kez çözülür.

$$\frac{dz}{dt} = Av \cdot X \quad (\text{Eş. 2})$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{Eş. 3})$$

$$\mu = w_i \cdot v_i \quad (\text{Eş. 4})$$

Burada z metabolit konsantrasyonlarının vektörüdür, X biyokütle konsantrasyonudur, v biyokütlenin gram (kuru ağırlık, DW) başına metabolik akıların vektörüdür. A , metabolik ağırlık stokiyometrik matrisidir, μ büyüme öncülerini sentezleyen reaksiyonların ağırlıklı toplamı olarak elde edilen büyüme hızıdır ve w_i biyokütlenin gram başına gereken büyüme öncülerinin miktarlarıdır.

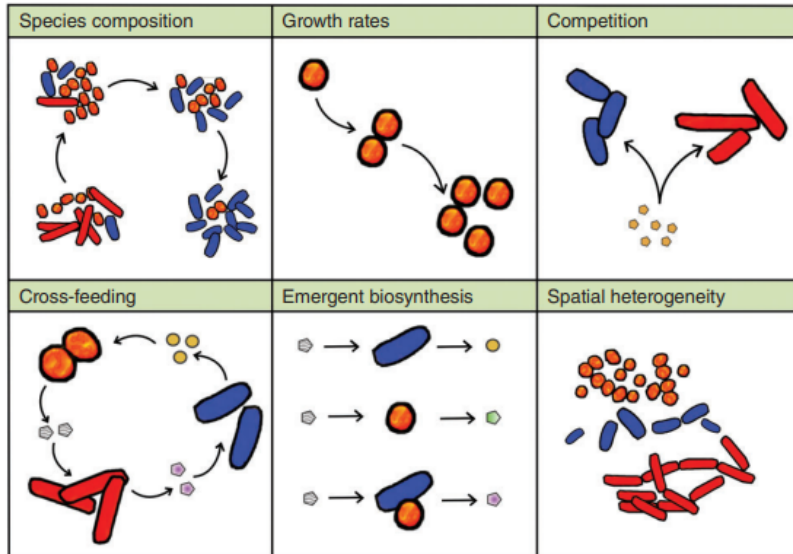
2.3. MİKROBİYAL KOMÜNİTE MODELLEME

Makroskobik olaylar mikroskobik etkileşimlerin ortaya çıkan gözlemlenebilir sonuçlarıdır. Mikrobiyal ekosistemleri anlamak yaşamın temel mekanizmaları hakkında daha derin bilgiye giden yolu açmak anlamına gelir (Succurro & Ebenhöh, 2018). Mikrobiyal komüniteler, toprak, okyanus ve atmosferin döngülerini desteklerler, bitkileri, hayvanları ve insanları etkileyen ekosistem fonksiyonlarını gerçekleştirirler, bu nedenle ekosistem dinamiklerinin mekanik olarak anlaşılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Endüstriyel biyoteknolojide de önemli rol oynayan mikrobiyal toplulukların anlaşılması, öngörülmesi ve kontrol edilmesi, akıllı atık arıtımı ile

çevre alanından, bağırsakla alakalı çalışmalarla tıpa kadar potansiyel uygulamalara imkan tanımaktadır.

Yüksek verimli sıralama, proteomik ve metabolomik seviyelerde mikrobiyal komünitelerin çeşitliliğini ayrıntı düzeyinde kataloglanmasına izin verse de bu karmaşık, dinamik olarak değişen toplulukların işlevlerini öngörme ve yönetme yeteneği sınırlıdır. Sistemlerin matematiksel modelleri, altta yatan fenomenleri yakalamak ve bu sistemlerin hareket ettiği farklı ölçeklere ulaşmak için önemlidir. Deneysel verileri ve modelleme yaklaşımlarını entegre ederek faydalı amaçlar geliştirmek için kullanılabilecek temel kavrayışlar sunan, test edilebilir prediktif komünite modelleri oluşturmak, mikrobiyal topluluk kompozisyonları ile fonksiyonları ilişkisinin aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır.

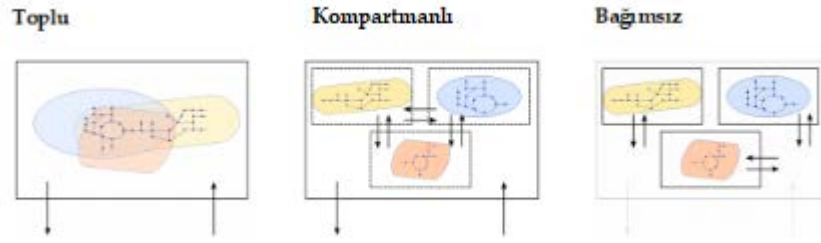
İki mikrobiyal popülasyon arasındaki etkileşim, bir popülasyonun büyümesinin veya hayatta kalmasının diğer popülasyonun bolluğuna bağımlılığı olarak tanımlanabilir. Bu etkileşimler, negatif veya pozitif olabilir, büyümenin inhibisyonu veya hızlanmasını gösterir. Negatif etkileşimler, elektron verici ve alıcılar, besinler, ışık veya fiziksel alan gibi kaynaklar için rekabetten veya doğrudan mikrop-mikrop etkileşimleri veya toksinlerin veya diğer inhibitör bileşiklerin salgılanması ile ortaya çıkabilir (Hibbing, Fuqua, Parsek, & Peterson, 2010).



Şekil 6. Mikrobiyal Topluluk Modelleme ile Yakalanabilecek Etkileşimler

(Biggs & Papin, 2015)

Mikrobiyal popülasyonlar arasında pozitif etkileşimler, çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir. Bir popülasyonun diğerinin metabolitlerinden faydalandığı metabolik yan ürünlerin çapraz beslenmesi, pozitif etkileşimlerin önemli bir noktasıdır (Sieber vd., 2012). Bu aynı zamanda nüfusun kaynaklar için rekabet etme derecesini de azaltır (Kosaka vd, 2008). Mutlak bolluk ölçümlerini topluluk seviyesine yükseltmek önemli bir hedeftir. Laboratuvar da kültürülenemeyen suşlar da dahil olmak üzere mikrobiyal toplulukları sıralamak yeni gelişmelerin yolunu açacaktır (Zhang, Wang, Ang, & Zhao, 2016).



Şekil 7. Mikrobiyal Komünite Modelleme Yaklaşımları (Succurro & Ebenhö, 2018)

Literatürde komünitelerin matematiksel modelleme çalışmaları farklı yaklaşımlarla yapılmıştır.

Bölümlendirme yaklaşımı basit ve kararlı durumda toplulukların incelenmesi, tasarımı ve tahmini için etkili bir yoldur. Modeller kompartmanlara bölünür ve her bölüme özgü reaksiyonlar, taşıma reaksiyonları ile ayrılır, hücre dışı bir bölme ile tür bölmeleri arasında metabolit akısını sağlamak için bir metastokiometrik matris eklenir. Amaç fonksiyonu topluluk düzeyinde büyümedir, türlerin ayrı ayrı bireysel bollukları ölçeklendirilir.

Bağımsız modellemede, amaç fonksiyonu bireysel veya çok düzeyli büyümedir, bireysel bolluklar ölçeklendirilmiştir. Dinamik toplulukların incelenmesi, tasarımı ve tahmini ve çevre ile metabolik etkileşimleri için idealdir.

Toplu modellemede üst organizma hedefi amaç fonksiyonudur, ayrışmamış topluluk bolluğu ölçeklendirilir, amaç bireysel çözüme ihtiyaç duymadan topluluk metabolik potansiyelinin araştırılmasıdır.

Organizmaların kısa vadede kendi aleyhlerine olan ancak ekosistemin lehine olan (dolayısıyla uzun vadede kendisinin de çıkarına olacak) şekilde komünitenin çıkarlarını mı kollayacağı yoksa her halükarda kendi bireysel çıkarını mı kollayacağı oldukça derin bir tartışmanın yansımasıdır. Farklı modelleme yaklaşımları işte bu farklı varsayımlara dayanmaktadır.

İlk topluluk modellemesi, bölümlendirme yaklaşımı kullanarak *Desulfovibrio vulgaris* ve *Methanococcus maripaludis* arasındaki karşılıklı etkileşimi temsil eder (Stolyar vd., 2007). Metan üretim hızının, sülfat indirgen bakteriler ve metanojenler arasındaki karşılıklı etkileşimlere bağlılığını araştırmak üzere sadece merkezi metabolizma ile türler arasındaki mutualizm gösterilmiştir. *D.vulgaris* tarafından laktat kullanımıyla üretilen asetat *M.Maripaludis*'in metan üretimi için substrat olmuştur.

Komünite Objektifi (OptCom), topluluk düzeyinde bir objektif fonksiyona izin veren bölümlendirme yaklaşımının uzantısıdır, karşılıklı etkileşim, her tür için iç optimizasyon koşulları gözetilerek, birbiriyle etkileşen türlerin de biyokütlesini en üst düzeye çıkarmak için dış optimizasyon probleminin ayarlanmasıyla temsil edilebilir (Ref?). OptCom'un iki düzeyli yapısı vardır. OptCom, bireysel metabolik durumlar ile topluluk düzeyinde optimumluk arasındaki alışverişleri keşfetmek ve açıklamak için iyi bir araçtır, topluluk hedefini ve türler arası akışlar üzerindeki kısıtlamaları dış sorunun temelini değiştirerek, etkileşimlerin nedenlerini araştırmak için kullanılabilir. Stolyar'ın çalışması genişletilerek *Methanosarchina barkeri* dahil edilmiştir ve bu üç organizmadan oluşan modelle biyogaz üretimi komünite objektifi yöntemi ile incelenmiştir ve alternatif substratlar (asetat ve hidrojen) varlığında anaerobik çürütücüde literatürdeki metan verimi değerlerini yakalayarak komünite düzeyinde metabolik modellemenin prediktif başarısı gösterilmiştir (Koch, Benndorf, Fronk, Reichl, & Klamt, 2016).

Bir diğer çalışmada üç tür için (*Bacteroides thetaiotamicron*, *Eubacterium rectale* ve *Methanobrevibacter smithii*) bağırsak mikrobiyomunun konak metabolizması üzerindeki etkisini araştırmak üzere komünite modelleme kullanılmıştır. Çalışmada α ve β problemi olarak adlandırılan iki optimizasyon problemi tanımlanmıştır ve diyet ve tür bolluğu bilindiğinde kalın bağırsakta metabolitlerin alınmasının ve salgılanmasının tahmin edilebildiği gösterilmiştir (Shoaie vd., 2013).

Türler arası dinamik-metabolik modelleme, ilk olarak Fe(III) indirgeyen *Geobacter* ve *Rhodoferax* türleri arasında amonyum varlığında, karbon kaynağı rekabeti ile anoksik alt yüzey ortamlarında uranyum biyoremediasyonu üzerine gerçekleştirilmiştir (Zhuang vd., 2011).

Zhuang ve arkadaşlarının DMMM (Dynamic Multispecies Metabolic Modelling) yaklaşımında türlerin substrat alım oranları Michaelis Menten kinetiği denklemiyle bulunur, türlerin spesifik büyüme oranları belirlenir, her bir substratın her tür tarafından tüketilme hızı hesaplanır. Büyüme oranları ve hücrel konsantrasyonlardan tür bollukları elde edilir.

COMETS (Mikrobiyal Ekosistemlerin Dinamiğinin Uzamsal Hesaplanması) de çoklu mikrobiyal türlerin zamansal dinamiklerini takip etmek için dinamik bir FBA algoritmasıdır, daha önce çalışılmış bir *E.coli* ve çapraz beslenme ortağı *S.enterica* topluluğuna üçüncü bir tür olarak *Methylobacterium extorquens* eklenerek uygulanmıştır, bu rakip tür orijinal koloninin büyümesine fayda mı yoksa zarar mı verir sorusuna cevap aranmıştır (Harcombe,2014).

İki temel adımı içerir, ilk adım hücrel gelişimdir, kinetik-dFBA algoritması kullanılarak farklı mekansal konumlardaki biyokütlenin artışı olarak modelleme yapılır. İkinci adım, ortamdaki hücre dışı besinler ve yan ürünlerin difüzyonuna ve biokütlenin genişlemesine ilişkin hesaplamalardan oluşur.

Ortamin kutulara bölündüğü varsayılır ve her kutuda, her bir tür için dFBA çözülür ve alımı Michaelis-Menten denklemleriyle belirlenir. Her kutudaki metabolit seviyeleri, aynı kutuda bulunan mikrobiyal biokütle tarafından salgılanma veya alım nedeniyle veya komşu kutulardan difüzyon nedeniyle değişebilir. Bu hesaplamalar, zamana göre değişir.. Difüzyon denklemi, her bir kutuda biyokütle ve besin maddelerinin güncellenmesini sağlar. Takip eden algoritma, tek tek türlerin hücre içi metabolizmasının bir fonksiyonu olarak ekosistem dinamiklerini hesaplar.

Her kutudaki her tür için bir FBA problemi çözülür, her bir kutuda tüm türler için biyokütle ve çevresel metabolitlerin bolluğu aşağıdaki kurallara göre güncellenir. Tek bir kutuda birden fazla tür mevcutsa, ortam ve mekan için rekabet ederler.

3. YÖNTEM

Bu komünite metabolik modelleme çalışması için ağır metal indirgeyen *Geobacter sulfurreducens*, fakültatif anaerobik metal indirgeyici *Shewanella oneidensis*, metanojen *Methanosarcina barkeri*, hetetrofik olarak denitrifikasyonda önemli rol oynayan *Pseudomonas aeruginosa* türleri seçilmiştir. Modeller BiGG Models (King vd., 2016) ve BioModels (Le Novère vd., 2006) dan indirilmiştir. Türleri ilgilendiren asetat, laktat, amonyak, Fe(III), etanol, glikoz, metanol temel metabolitler olarak belirlenmiştir. MATLAB R2017b, COBRA aracı (Becker vd., 2007) ve Gurobi 3.0.1 versiyon çözücü ile kullanılarak türlerin metabolik modellemesi yapılmıştır.

Tablo 1. Model Organizmalar ve Genom Ölçekli Metabolik Modellerin Temel Özellikleri

Organizma	Model ID	Metabolit Sayısı	Reaksiyon Sayısı	Yayın
<i>M. barkeri</i>	iAF692	628	690	Feist vd., 2006
<i>G. sulfurreducens</i>	iRM588	541	608	Mahadevan vd., 2006
<i>S.oneidensis</i>	iSO783	713	870	Pinchuk vd., 2010
<i>P. aeruginosa</i>	iMO1056	819	1110	Oberhardt vd., 2008

Modellerde yer alan reaksiyonların hangilerinin modeller için hayati önem taşıdığını anlamak üzere modellere analiz (Synthetic Lethality Analysis) yapılmıştır. Tablo 2’de hayati olan ve biyokütleyi düşüren reaksiyon sayıları verilmiştir. Analiz kodları Ek.2 de mevcuttur. Bunun sonucunda hangi reaksiyonların model için olmazsa olmaz olduğunu ve hangilerinin biyokütleyi düşürdüğü hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Tablo 2. Reaksiyonların Hayatilik Analizi

Model	Reaksiyon sayısı	Hayati Reaksiyon Sayısı	Biokütleyi Düşüren Reaksiyon Sayısı
M.barkeri	690	305	37
G.sulfurreducens	608	168	8
P.aeruginosa	1110	227	84
S.oneidensis	870	198	60

Modeller reaksiyonların yanısıra genleri ve organizmaların yapıtaşı olan, biyokütleyi oluşturan metabolitleri içermektedir. Biyokütle bileşenleri aminoasitler, karbonhidratlar, lipitler, DNA ve RNA yapısına katılan moleküller, iyonlar, koenzim ve kofaktörler ile diğer küçük moleküllerdir. *G.sulfurreducens* (Mahadevan ,2006), *M.barkeri* (Feist, 2006), *P.aeruginosa* (Oberhardt, 2008), *S.oneidensis* (Pinchuk,2010) model makalelerinde bulunan biyokütle bileşenleri Tablo 3'te sınıflandırılmıştır.

Tablo 3. Model Organizmalar ve Temel Biyokütle Bileşenleri

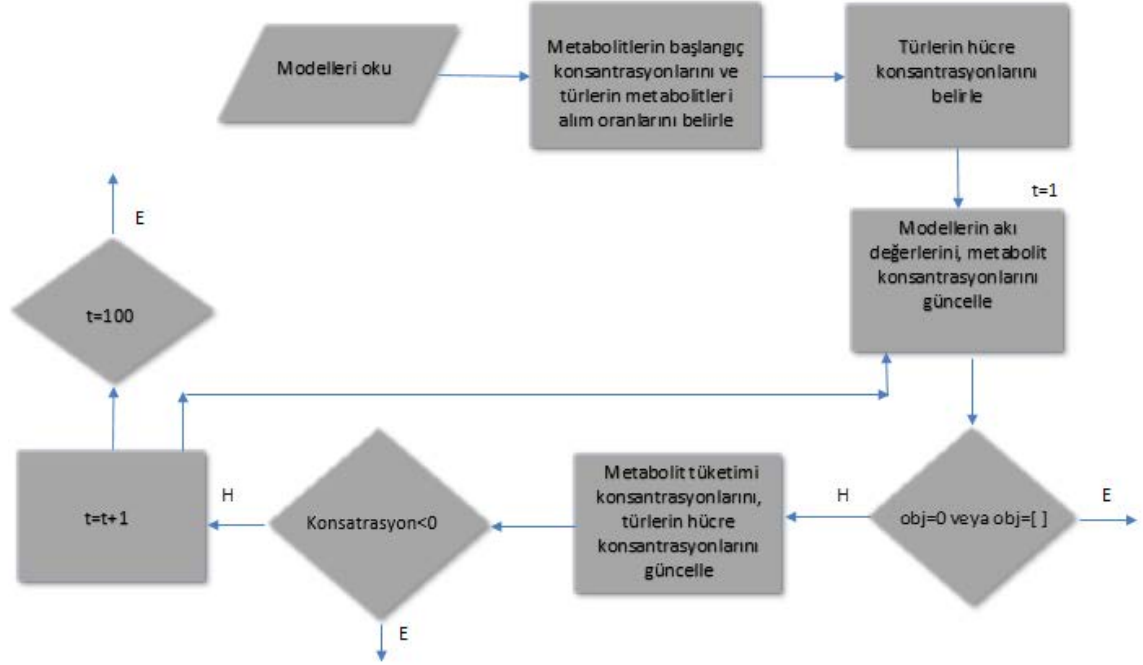
Türler	AMİNOASİTLER	KARBONHİDRA T	LİPİT	KOENZİM /KOFAKTÖR	İYONLAR/ORGANİK ASİTLER	DNA /RNA	Diğer Küçük Moleküller
<i>P.aeruginosa</i>	L-Ornitin	D-Fruktoz D-Glikoz D-Mannoz Trehaloz D-Sellübiyoz		NAD NADH NADP NADPH	Asetat Sitrat Glukonat D,L-Laktat Oksoglutarat Süksinat Malonat		4-Aminobütrat D-Mannitol Giserol 2,3-Bütandiol D,L-Kamitin
<i>S. cerevisiae</i>	L-Alanin L-Aspartat L-Histidin L-Lösin L-Fenilalanin L-Prolin L-Asparajin L-Glutamik Asit	Glikojen	Fosfatidiletanolamin Fosfatidilgliserol 1,2 Diasilgliserol	NAD NADH NADP NADPH Süksinil CoA FAD Asetil CoA AMP Koenzim A			Putresin Spermidin UDPglikoz 5 Metiltetrahidrolat
<i>M. luteus</i>	L-Treonin L-Arjinin L-Sistein L-Glutamin Glisin L-Histidin L-Izölsin L-Uzin L-Metiyonin L-Triptofan L-Tirozin L-Valin	Glikojen Alfa-D-Riboz 5-P D-Glikoz 6-P	dpqq 3hdpqq dpqi 3hdpqi dpqe 3hdpqe dpqs 3hdpqs qdpqi	Asetil CoA Koenzim A NAD NADH NADP NADPH Süksinil CoA AMP	2-Oksoglutarat Helzadekanoat Helzadekanoat (n-C16:1) Gliseraldehit 3-P Oktadekanoat (n-C18:0) Oktadekanoat (n-C18:1) Fosfoenolpirivat UDP-N-asetilmuramat 1,2 Diasil an gliserol 3 P	dATP dCTP dGTP dTTP CTP GTP UTP	UDP-N-Asetil-D-glukozamin UDPglikoz Putresin Spermidin
<i>G. sulfurreducens</i>	D-Alanin D-Glutamat	Glikojen		NAD NADPH ADP H NADH NADP	Ca ²⁺ K Mg2+ Pi NH ₄ pH Yağ Asitleri(Fa)(Iso-C14:0) Fa(Iso-C15:0) Fa(Antelzo-C15:0) Fa(Iso-C17:1) Mistat(Fa)	dATP dCTP dGTP GTP CTP	

3.1. GELİŞTİRİLEN YAZILIMLAR

Kararlı hal koşulları (metabolitlerin zamanla konsantrasyonlarının değişmediği varsayımı) ve organizmaların konsantrasyonla doğrusal ilişki kurdukları kabul edilerek MATLAB da türlerin matematiksel modellemesi için kodlar oluşturulmuştur. Kodların içeriği Ek Doküman 1’de mevcuttur.

Oluşturulan bu yazılımda çalışmak istediğimiz türleri, türlerin ilişkili olduğu ve olabileceği bazı metabolitleri içeren bir ortam temsil edilmeye çalışılmıştır. Gerekliğinde literatürdeki değerlerden faydalanılmıştır.

Simülasyonlar yapılırken her zaman adımında klasik FBA (Akı Denge Analizi) uygulanır, her döngü sonunda yeni ortam ve hücre konsantrasyonlarına ulaşılmıştır ve bu değerler güncellenerek bir sonraki zaman adımında tekrar FBA yapılarak toplamda türlerin dinamik akı analizleri gerçekleştirilmiş olur.



Şekil 8. Çalışmadaki Türlerin Modellemesi için Genel Algoritma Şeması

Büyüme hızının mümkün olmadığı, substrat konsantrasyonlarının '0' ın altında değerlere düştüğü vb. gibi simülasyonu durduran, gerçekçi olmayan durumlarda, koşullar gözden geçirilerek gerekli biyolojik olarak mümkün ayarlamalar yapılır. Şekil 8 de temel adımları görülen Dinamik Mikrobiyal Metabolik Modelleme Zhuang (2011) tarafından belirlenen çerçeve etrafında geliştirilmiştir.

3.2. VARSAYILAN BAŞLANGIÇ SUBSTRAT VE HÜCRE KONSANTRASYONLARI

Zhuang (2011) çalışmasında ortamdaki asetat injeksiyon oranını önceki bir çalışmayı baz alarak 3 mM olarak ayarlamıştır (Anderson vd., 2003; Vrionis vd., 2005).

Önceki bir çalışmada (Mouser ve diğerleri, 2009) amonyum konsantrasyonları 5 ile 400 µM arasında olduğundan 150 mM olarak kabul edilmiştir.

Fe(III) önceki bir çalışma (Petrie vd., 2003) baz alınarak 10 mM olarak ayarlanmıştır. Laktat konsantrasyonunun 5 ila 30 mM arasında değiştiği bildirildiğinden (Yabusaki vd.,2010), laktat 20 mM, etanol, glikoz ve metanol değerleri de simülasyon kolaylığı için 100 mM olarak varsayılmıştır. Türlerin hücre konsantrasyonları 1 gDW/L olarak kabul edilmiştir.

Bu metabolitlerin optimizasyon boyunca üretim-tükenme hızları Eşitlik 5 ile hesaplanmaktadır.

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=1}^N V_i^j X_j \quad (\text{Eş. 5})$$

dS_i/dt ; i substratının değişme oranı

X_j ; j türünün büyüme miktarı

V_i^j : j türünün i substratı alım/üretim miktarı

N : Tür sayısı

Metabolitlerin son değerleri de başlangıç miktarı ile değişim hızı toplanarak elde edilir.

$$S_i^{\text{yeni}} = S_i^{\text{başlangıç}} + \Delta S_i$$

3.3. TÜRLER İÇİN SUBSTRAT ALIM ORANLARININ HESAPLANMASI

Türlerin belirlenmiş substratlar için başlangıç akı değerleri Michaelis Menten kinetiği denklemiyle manuel olarak belirlenir.

$$v_i^{\text{constraint}} \leq \frac{V_{i,\text{max}} \cdot S_i}{S_i + K_s^i} \quad (\text{Eş. 6})$$

$v_i^{\text{constraint}}$: i metabolitinin akısı

$V_{i,\text{max}}$: türün maksimum alım miktarı

K_s^i : türün i metaboliti için doygunluk konsantrasyonu

S_i : substrat miktarı

Büyüme kinetiği bilinmeyen organizmalar için aç-kapa mantığı ile akılar belirlenmiştir.

Akıların sınırları Cobra aracındaki ‘changeRxnBounds’ komutu ile değiştirilir. Örneğin burada hücre zarından oksijen taşınım reaksiyon akısı için alt ve üst sınır kısıtlar “0” olarak verilerek ortamda oksijenin olmadığı anaerobik koşullar simüle edilmiştir.

3.4. TÜRLERİN BÜYÜME HIZLARININ HESAPLANMASI

Türlerin simülasyonlar sonucu elde edilen biyokütle değişim oranları aşağıdaki denklemler ile hesaplanır;

$$\frac{dX_j}{dt} = \mu_j X_j \quad (\text{Eş. 3})$$

μ_j : j türünün spesifik büyüme oranı

X_j : j türünün büyüme oranı

dX_j / dt : j türünün büyüme hızı, FBA ile belirlenen objektif fonksiyon değeridir.

$$X_j^{\text{yeni}} = X_j^{\text{başlangıç}} + \Delta X_j$$

Koşturmalar sonucu, biyokütle değerleri bu eşitlikle güncellenmektedir. Biyokütle oluşma hızı Cobra aracındaki 'optimizeCbModel' komutu ile hesaplanmaktadır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. TÜRLERİN SUBSTRAT TÜKETİM VE ÜRETİM MİKTARLARI

Başlangıç akı değerleri Michealis Menten Kinetik Denklemini (Eş. 6) ile hesaplanmıştır.

Asetat alımı: *G. sulfurreducens* te asetat alımının üç mekanizma ile ifade edilmesi nedeniyle üç farklı K_s ve V_{max} değeri vardır (Richter vd.; Esteve-Nunez vd., 2005);

$K_{s1} = 0.77$ mM, $K_{s2} = 0.167$ mM, $K_{s3} = 0.012$ mM,

$V_{max,1} = 2.7$ mmol/gDW/hr, $V_{max,2} = 2$ mmol/gDW/hr, $V_{max,3} = 13$ mmol/gDW/hr

$$V_{Ac}^{Gs} \leq \frac{13.3[Asetat]}{[Asetat] + 0.77} + \frac{2[Asetat]}{[Asetat] + 0.167} + \frac{2.67[Asetat]}{[Asetat] + 0.012}$$
$$V_{Ac}^{Gs} \leq \frac{13.3[3]}{[3] + 0.77} + \frac{2[3]}{[3] + 0.167} + \frac{2.67[3]}{[3] + 0.012} = 15.814 \text{ mmol/hr}$$

Tüketim oranları (–) ile ifade edildiğinden *G.sulfurreducens* asetat kullandığı için asetat akısı - 15.814 mM/hr dir.

Amonyak alımı: $K_s = 0.025$ mM, $V_{max} = 0.468$ mmol/gDW/hr,

$$V_{NH4}^{Gs} \leq \frac{0.468[Amonyak]}{[Amonyak] + 0.025}$$
$$V_{NH4}^{Gs} \leq \frac{0.468[150]}{[150] + 0.025} = 0.468 \text{ mmol/gDW/hr}$$

Fe(III) alımı: $K_s=1 \text{ mM}$, $V_{\max} = 568 \text{ mmol/gDw/hr}$

$$V_{\text{Fe(III)}}^{\text{Gs}} \leq \frac{568 [\text{Fe(III)}]}{[\text{Fe(III)}] + 1}$$

$$V_{\text{Fe(III)}}^{\text{Gs}} \leq \frac{568 [10]}{[10] + 1} = 9.98 \text{ mmol/gDw/hr}$$

Diğer türler için asetat, amonyak ve Fe(III) alımları aynı kabul edilmiştir. Diğer substratlar için aralık belirlenmiştir. Her zaman noktasında, organizmalar için akı kısıtlamaları, substrat konsantrasyonuna göre değişir ve büyüme hızında değişikliklere yol açar. Çalışma 1 saniyelik 16 adımda gerçekleşmiştir, substratların simülasyon süresince değişimleri Tablo 4’ de gösterilmiştir.

Tablo 4. Ortamda Asetat 3 Mm İken Zamanla Substratların Türlerle Göre Değişimi

Ortam	Asetat Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	NH4 Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Etanol Akı(mM/gDWhr)				
Asetat(mM)	GS	MB	PA	SO	NH4(mM)	GS	MB	PA	SO	Etanol(mM)	PA	SO			
15,352	0,312	-0,014	6,386	5,882	149,036	0,000	-0,468	-0,468	0,629	99,404	-0,008	-0,588			
27,787	0,306	-0,069	5,710	5,882	148,757	0,000	-0,465	-0,465	0,629	98,769	-0,007	-0,585			
40,458	0,338	-0,125	5,071	5,882	148,508	0,000	-0,464	-0,464	0,629	98,093	-0,007	-0,581			
53,388	0,316	-0,181	4,469	5,882	148,296	0,000	-0,463	-0,463	0,629	97,357	-0,008	-0,577			
66,663	0,289	-0,239	3,904	5,882	148,204	0,000	-0,398	-0,463	0,629	96,556	-0,008	-0,573			
80,371	0,257	-0,299	3,385	5,882	148,241	0,000	-0,339	-0,462	0,629	95,686	-0,008	-0,568			
94,603	0,219	-0,361	2,916	5,882	148,416	0,000	-0,285	-0,463	0,629	94,742	-0,007	-0,563			
109,423	0,172	-0,425	2,484	5,882	148,737	0,000	-0,236	-0,463	0,629	93,719	-0,007	-0,557			
124,923	0,117	-0,491	2,091	5,882	149,216	0,000	-0,192	-0,464	0,629	92,612	-0,006	-0,551			
141,159	0,031	-0,561	1,737	5,882	149,866	0,000	-0,153	-0,466	0,629	91,413	-0,005	-0,545			
158,465	0,000	-0,635	1,422	5,882	150,698	0,000	-0,119	-0,468	0,629	91,323	-0,004	-0,035			
177,015	0,000	-0,713	1,144	5,882	151,728	0,000	-0,089	-0,470	0,629	91,225	-0,004	-0,035			
196,937	0,000	-0,797	0,899	5,882	152,972	0,000	-0,063	-0,473	0,629	91,119	-0,003	-0,035			
218,450	0,000	-0,886	0,685	5,882	154,447	0,000	-0,040	-0,477	0,629	91,004	-0,003	-0,035			
241,790	0,000	-0,983	0,498	5,882	156,173	0,000	-0,021	-0,482	0,629	90,879	-0,002	-0,035			
267,214	0,000	-1,088	0,334	5,882	158,173	0,000	-0,004	-0,487	0,629	90,743	-0,002	-0,035			
Ortam	Fe(III)Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Laktat Akı (mM/gDWhr)				Ortam	Metanol Akı		Ortam	Glukoz Akı	
Fe(III)(mM)	GS	MB	PA	SO	Laktat(mM)	GS	PA	SO	Metanol(mM)	MB	Glukoz(mM)	PA			
9,296	-0,704	0,000	0,000	0,000	19,943	-1,179	2,146	0,000	90,000	-10,000	90,000	-10,000			
8,478	-0,655	0,000	0,000	0,000	22,289	-1,390	2,146	0,000	80,563	-9,000	80,654	-9,000			
7,545	-0,597	0,000	0,000	0,000	24,894	-1,360	2,146	0,000	71,727	-8,056	71,984	-8,065			
6,509	-0,531	0,000	0,000	0,000	27,771	-1,325	2,146	0,000	63,518	-7,173	63,875	-7,198			
5,392	-0,458	0,000	0,000	0,000	30,950	-1,282	2,146	0,000	55,948	-6,352	56,332	-6,387			
4,236	-0,380	0,000	0,000	0,000	34,463	-1,231	2,146	0,000	49,043	-5,595	49,357	-5,633			
3,102	-0,298	0,000	0,000	0,000	38,346	-1,171	2,146	0,000	42,808	-4,904	42,945	-4,936			
2,066	-0,218	0,000	0,000	0,000	42,670	-1,102	2,146	0,000	37,227	-4,281	37,100	-4,295			
1,204	-0,145	0,000	0,000	0,000	47,454	-1,021	2,146	0,000	32,272	-3,723	31,841	-3,710			
0,578	-0,085	0,000	0,000	0,000	52,749	-0,929	2,146	0,000	27,902	-3,227	27,164	-3,184			
0,203	-0,041	0,000	0,000	0,000	58,605	-0,827	2,146	0,000	24,072	-2,790	23,049	-2,716			
0,039	-0,014	0,000	0,000	0,000	65,084	-0,716	2,146	0,000	20,733	-2,407	19,464	-2,305			
0,000	-0,003	0,000	0,000	0,000	72,249	-0,598	2,146	0,000	17,834	-2,073	16,367	-1,946			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	80,171	-0,478	2,146	0,000	15,327	-1,783	13,712	-1,637			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	88,928	-0,363	2,146	0,000	13,164	-1,533	11,451	-1,371			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	98,572	-0,363	2,146	0,000	11,303	-1,316	9,536	-1,145			

Tablo 4 de görüldüğü üzere ortamda asetat konsantrasyonu 3 mM olduğu durumda *G.sulfurreducens*, nispeten daha büyük akılarla *P.aeruginosa* ve *S.oneidensis* ortama asetat

vermişlerdir, *M.barkeri* ise ortamda asetatin artması ile artan akılarla almıştır. *G.sulfurreducens* in amonyum akısı 0 iken *P.aeruginosa* ve *M.barkeri* amonyum tüketmişlerdir, *S.oneidensis* de asetat ortama vermiştir. Demir(III) i sadece *G.sulfurreducens* tüketmiştir, diğerlerinin akıları 0 dır. Etanolü *P.aeruginosa* ve *S.oneidensis* tüketmektedir. *G.sulfurreducens* laktat tüketirken *P.aeruginosa* ortama vermektedir. Glikoz sadece *P.aeruginosa* ve metanol sadece *M.barkeri* nin modellerinde tanımlıdır ve bu türler tarafından tüketilmişlerdir.

Tablo 5. Ortamda Laktat Yokken Zamanla Substratların Türler'e Göre Değişimi

Ortam	Asetat Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	NH4 Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Etanol Akı(mM/gDWhr)				
Asetat(mM)	GS	MB	PA	SO	NH4(mM)	GS	MB	PA	SO	Etanol(mM)	PA	SO			
15,255	0,000	-0,014	6,386	5,882	149,036	0,000	-0,468	-0,468	-0,028	99,844	-0,007	-0,148			
27,679	0,000	-0,069	5,721	5,882	148,031	0,000	-0,465	-0,465	-0,027	99,672	-0,007	-0,148			
40,322	0,000	-0,125	5,094	5,882	146,985	0,000	-0,462	-0,462	-0,027	99,483	-0,007	-0,148			
53,239	0,000	-0,181	4,507	5,882	145,896	0,000	-0,459	-0,459	-0,027	99,274	-0,007	-0,148			
66,499	0,000	-0,240	3,959	5,882	144,813	0,000	-0,415	-0,455	-0,027	99,044	-0,007	-0,148			
80,184	0,000	-0,299	3,452	5,882	143,755	0,000	-0,360	-0,452	-0,027	98,791	-0,007	-0,148			
94,388	0,000	-0,361	2,985	5,882	142,720	0,000	-0,310	-0,449	-0,026	98,511	-0,007	-0,148			
109,235	0,000	-0,425	2,570	5,882	141,705	0,000	-0,266	-0,445	-0,026	98,203	-0,006	-0,148			
124,839	0,000	-0,492	2,196	5,882	140,709	0,000	-0,227	-0,442	-0,026	97,865	-0,006	-0,148			
141,329	0,000	-0,562	1,861	5,882	139,729	0,000	-0,193	-0,439	-0,026	97,493	-0,005	-0,148			
158,860	0,000	-0,636	1,563	5,882	138,764	0,000	-0,164	-0,436	-0,026	97,083	-0,004	-0,148			
177,609	0,000	-0,715	1,303	5,882	137,811	0,000	-0,139	-0,433	-0,025	96,631	-0,003	-0,148			
197,774	0,000	-0,799	1,076	5,882	136,867	0,000	-0,118	-0,430	-0,025	96,133	-0,003	-0,148			
219,574	0,000	-0,890	0,881	5,882	135,929	0,000	-0,102	-0,427	-0,025	95,584	-0,003	-0,148			
243,246	0,000	-0,988	0,714	5,882	134,993	0,000	-0,089	-0,424	-0,025	94,979	-0,002	-0,148			
269,050	0,000	-1,095	0,572	5,882	134,055	0,000	-0,079	-0,421	-0,025	94,310	-0,002	-0,148			
Ortam	Fe(III)Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Laktat Akı (mM/gDWhr)				Ortam	Metanol Akı		Ortam	Glikoz Akı	
Fe(III)(mM)	GS	MB	PA	SO	Laktat(mM)	GS	PA	SO	Metanol(mM)	MB	Glikoz(mM)	PA			
9,296	-0,704	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	90,000	-10,000	90,000	-10,000			
8,478	-0,655	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	80,562	-9,000	80,570	-9,000			
7,545	-0,597	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	71,725	-8,056	71,727	-8,057			
6,509	-0,531	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	63,513	-7,173	63,484	-7,173			
5,392	-0,458	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	55,940	-6,351	55,846	-6,348			
4,236	-0,380	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	49,023	-5,594	48,815	-5,585			
3,102	-0,298	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	42,767	-4,902	42,385	-4,881			
2,066	-0,218	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	37,157	-4,277	36,547	-4,239			
1,204	-0,145	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	32,168	-3,716	31,306	-3,655			
0,578	-0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	27,761	-3,217	26,658	-3,131			
0,203	-0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	23,893	-2,776	22,579	-2,666			
0,039	-0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	20,515	-2,389	19,033	-2,258			
0,000	-0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	17,579	-2,052	15,978	-1,903			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	15,036	-1,758	13,364	-1,598			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	12,841	-1,504	11,143	-1,336			
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	10,952	-1,284	9,266	-1,114			

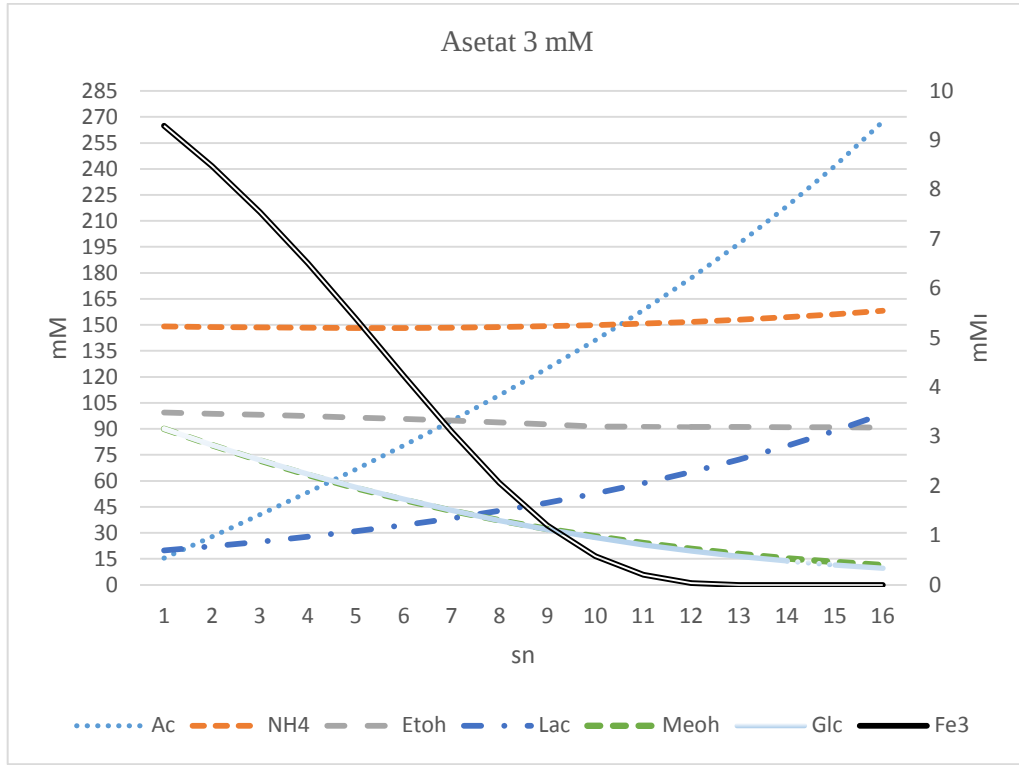
Tablo 5 de ortamda laktatin mevcut olmadığı durumda akılar ve konsantrasyonlar vardır. Laktat yokken *G.sulfurreducens* asetate üretmedi, akısı 0 dır. *M.barkeri* artan akılarla asetate aldı,

P.aeruginosa ve *S.oneidensis* verdi. *G.sulfurreducens* amonyum akısı 0 iken diğer türler tüketti. Etanol, glikoz ve metanol yine ilgili türler tarafından tüketildiler. Demir(III) yine sadece *G.sulfurreducens* tarafından tüketildi.

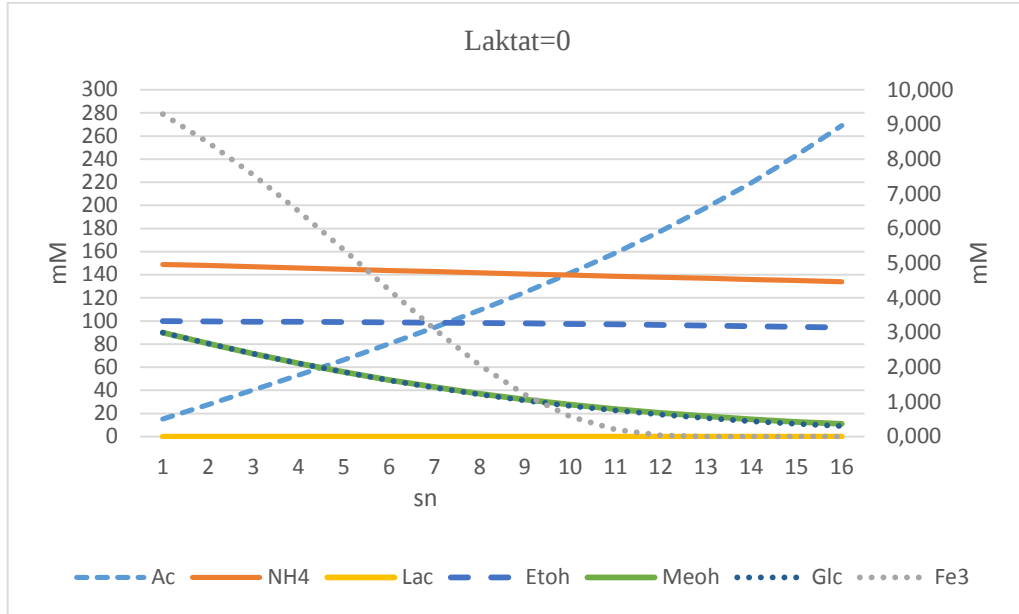
Tablo 6. Amonyum Yokken Zamanla Türlerle Göre Substratların Değişimi

Ortam	Asetat Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	NH4 Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Etanol Akı(mM/gDWhr)				
Asetat(mM)	GS	MB	PA	SO	NH4(mM)	GS	MB	PA	SO	Etanol(mM)	PA	SO			
15,536	0,000	-0,014	6,667	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,961	0,000	-0,039			
27,967	0,000	-0,070	6,000	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,919	0,000	-0,039			
40,423	0,000	-0,126	5,400	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,871	0,000	-0,039			
53,036	0,000	-0,182	4,860	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,819	0,000	-0,039			
65,937	0,000	-0,239	4,374	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,761	0,000	-0,039			
79,259	0,000	-0,297	3,937	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,697	0,000	-0,039			
93,141	0,000	-0,357	3,543	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,627	0,000	-0,039			
107,726	0,000	-0,419	3,189	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,549	0,000	-0,039			
123,166	0,000	-0,485	2,870	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,462	0,000	-0,039			
139,617	0,000	-0,554	2,583	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,367	0,000	-0,039			
157,249	0,000	-0,628	2,325	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,262	0,000	-0,039			
176,243	0,000	-0,708	2,092	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,145	0,000	-0,039			
196,791	0,000	-0,793	1,883	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	99,016	0,000	-0,039			
219,104	0,000	-0,886	1,695	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	98,874	0,000	-0,039			
243,407	0,000	-0,986	1,525	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	98,716	0,000	-0,039			
269,948	0,000	-1,095	1,373	5,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	98,542	0,000	-0,039			
Ortam	Fe(III)Akısı (mM/gDWhr)				Ortam	Laktat Akı (mM/gDWhr)				Ortam	Metanol Akı		Ortam	Glikoz Akı	
Fe(III)(mM)	GS	MB	PA	SO	Laktat(mM)	GS	PA	SO	Metanol(mM)	MB		Glikoz(mM)	PA		
9,296	-0,704	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	90,000	-10,000		90,000		-10,000	
8,478	-0,655	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	80,805	-9,000		81,000		-9,000	
7,545	-0,597	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	72,390	-8,080		72,900		-8,100	
6,509	-0,531	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	64,721	-7,239		65,610		-7,290	
5,392	-0,458	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	57,761	-6,472		59,049		-6,561	
4,236	-0,380	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	51,465	-5,776		53,144		-5,905	
3,102	-0,298	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	45,790	-5,147		47,830		-5,314	
2,066	-0,218	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	40,687	-4,579		43,047		-4,783	
1,204	-0,145	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	36,112	-4,069		38,742		-4,305	
0,578	-0,085	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	32,018	-3,611		34,868		-3,874	
0,203	-0,041	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	28,363	-3,202		31,381		-3,487	
0,039	-0,014	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	25,105	-2,836		28,243		-3,138	
0,000	-0,003	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	22,206	-2,511		25,419		-2,824	
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	19,629	-2,221		22,877		-2,542	
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	17,341	-1,963		20,589		-2,288	
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	15,311	-1,734		18,530		-2,059	

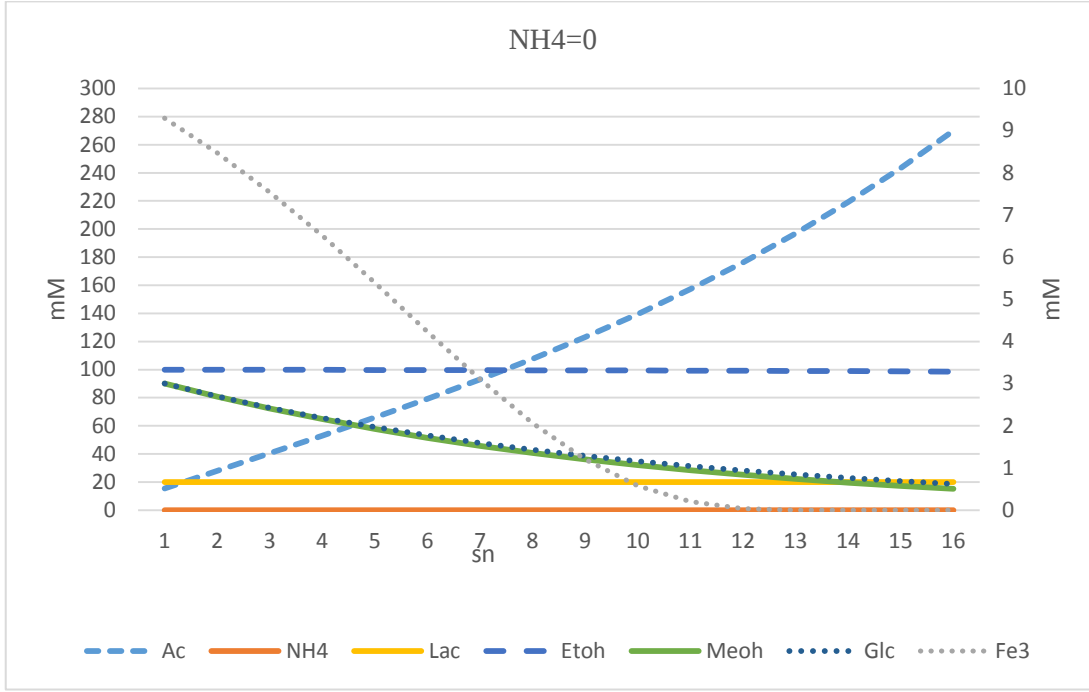
Tablo 6 da görüldüğü gibi amonyumun olmadığı durumda asetat, demir, metanol, glikoz yaklaşık olarak diğer durumlarla aynı eğilimdedirler. Hiçbir tür laktat almadı veya vermedi. *P.aeruginosa* etanol almayı bıraktı.



Şekil 9. Ortamdaki Asetat Miktarı 3 İken Diğer Substratların Değişimi (mM)



Şekil 10. Ortamdaki Laktat Miktarı 0 iken Diğer Substratların Değişimi (mM)



Şekil 11. Ortamdaki Amonyum Miktarı 0 iken Diğer Substratların Değişimi (mM)

Simülasyonlarda *P.aeruginosa* glikozun ve *M.barkeri* metanolün % 90 ını, *G.sulfurreducens* tüm durumlarda elektron alıcısı olan Fe(III) nin tamamını tüketmiştir. Ortamdaki asetat miktarı her üç senaryoda da artmıştır. Amonyum miktarının ise laktat içeren ortamda çok hafif bir şekilde arttığı, laktatsız ortamda küçük miktarlarda azaldığı gözlenmiştir. Ortamdaki etanol miktarında ise toplam simülasyon süresince önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu simülasyonların her üçünde de entegre modelin metanol ve glikoz tükettiği ve ortamda bunların konsantrasyonlarının düştüğü gözlenmektedir. Metanol'ün biyoremediyasyon uygulamalarında ortama eklenmesi sıklıkla karşılaşılan bir uygulamadır (Sahinkaya vd. 2011).

4.2. TÜRLERİN BÜYÜME HIZLARI

Başlangıçta varsayılan parametrelerle yapılan koşturmalarda büyüme oranları

G.sulfurreducens için 0.456 h^{-1}

M.barkeri için 0.0268 h^{-1}

P.aeruginosa için 0.14 h^{-1}

S.oneidensis için 1.05 h^{-1} olarak bulunmuştur.

Tablo 7 de görüldüğü gibi türlerin büyüme oranlarında gözlenen değişiklikler şu şekildedir; *M.barkeri* nin 0.0268 olan varsayılan biyokütle oranı yaklaşık 2 katına çıkmış, metanolün tükenmesiyle 0.007 h^{-1} gibi düşük bir değere inmiştir. Amonyum yokluğunda başlangıç biyokütlesinden düşük değerlere gerilemiştir.

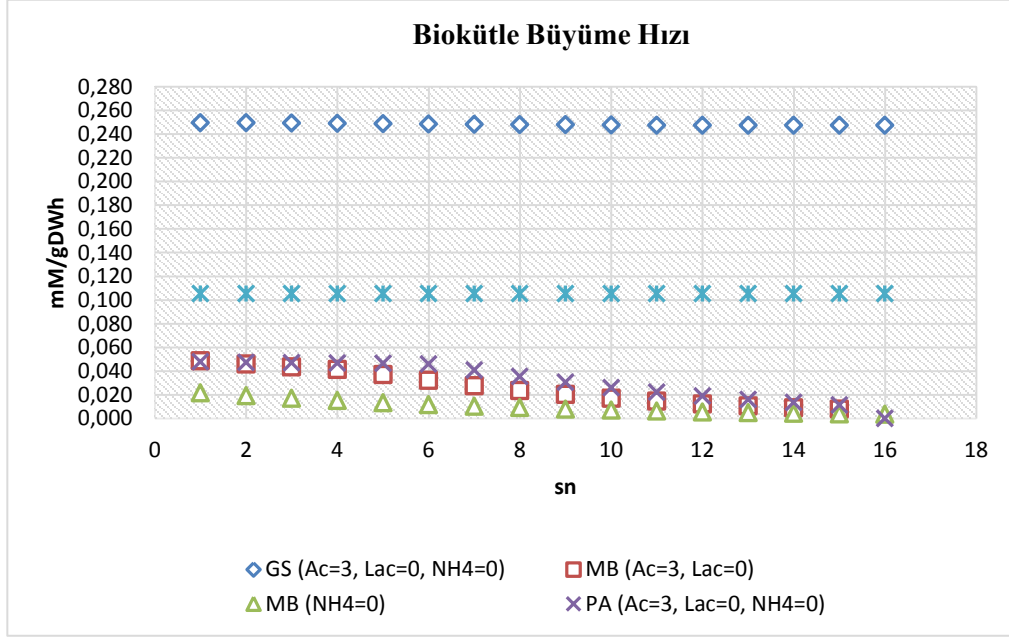
G.sulfurreducens ve *P.aeruginosa* nın biyokütleleri başlangıç değerlerinden düşüktür, koşturmalarda azalmıştır. Amonyum yokken *P.aeruginosa* nın biyokütlesi 0 olmuştur.

S.oneidensis in biyokütlesi başlangıca göre düşmüştür ve üç durumda da aynıdır, zamanla değişmemiştir.

Tablo 7. Türlerin zamanla h^{-1} cinsinden büyüme oranları değerleri

Ac=3 iken Büyüme Hızı				Lac=0 iken Büyüme Hızı				NH4=0 iken Büyüme Hızı			
GS	MB	PA	SO	GS	MB	PA	SO	GS	MB	PA	SO
0,250	0,049	0,048	0,105	0,250	0,049	0,048	0,105	0,250	0,022	0,000	0,105
0,250	0,046	0,047	0,105	0,250	0,046	0,047	0,105	0,250	0,019	0,000	0,105
0,249	0,044	0,047	0,105	0,249	0,044	0,047	0,105	0,249	0,017	0,000	0,105
0,249	0,041	0,047	0,105	0,249	0,041	0,047	0,105	0,249	0,015	0,000	0,105
0,249	0,037	0,046	0,105	0,249	0,037	0,046	0,105	0,249	0,013	0,000	0,105
0,249	0,032	0,046	0,105	0,249	0,032	0,046	0,105	0,249	0,012	0,000	0,105
0,248	0,028	0,046	0,105	0,248	0,028	0,046	0,105	0,248	0,010	0,000	0,105
0,248	0,024	0,041	0,105	0,248	0,024	0,041	0,105	0,248	0,009	0,000	0,105
0,248	0,020	0,036	0,105	0,248	0,020	0,036	0,105	0,248	0,008	0,000	0,105
0,248	0,017	0,031	0,105	0,248	0,017	0,031	0,105	0,248	0,007	0,000	0,105
0,248	0,015	0,026	0,105	0,248	0,015	0,026	0,105	0,248	0,006	0,000	0,105
0,247	0,012	0,022	0,105	0,247	0,012	0,022	0,105	0,247	0,005	0,000	0,105
0,247	0,011	0,019	0,105	0,247	0,011	0,019	0,105	0,247	0,005	0,000	0,105
0,247	0,009	0,016	0,105	0,247	0,009	0,016	0,105	0,247	0,004	0,000	0,105
0,247	0,008	0,014	0,105	0,247	0,008	0,014	0,105	0,247	0,004	0,000	0,105
0,247	0,007	0,011	0,105	0,247	0,007	0,011	0,105	0,247	0,004	0,000	0,105

P.aeruginosa NH₄ yokken büyüme hızı 0 olmuştur, hücre konsantrasyonu değişmemiştir, diğer durumlarda glikoz ve asetat azalmasına bağlı olarak biyokütle oranında düşüş gösteren grafiğe sahip olmuştur. Biyokütlenin türler için değişim grafiği Şekil 12 de gösterilmiştir.



Şekil 12. Büyüme Oranları Değişimi

4.3. TÜRLERİN HÜCRE KONSANTRASYONLARI

Substratların simülasyon süresince değişimleri Tablo 8. de gösterilmiştir. Sonuçta her bir tür için 1 g/L olan hücre konsantrasyonları artmıştır.

Tüm türlerin hücre konsantrasyonları artış göstermiştir. *G.sulfurreducens* büyüme oranının diğer türlerden büyük olması nedeniyle diğer türlere göre daha yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşmıştır. *S.oneidensis* in de yüksek hücre konsantrasyonları yüksektir. *M.barkeri* ve *P.aeruginosa* düşük biyokütlelerinden dolayı hücre konsantrasyonlarını çok artıramamışlardır.

Tablo 8. Türlerin hücre konsantrasyonlarının zamanla değişimi (gDW/L h-1)

Ac=3 iken Hücre Konsantrasyonu				Lac=0 iken Hücre Konsantrasyonları				NH4=0 iken Büyüme Hızı			
GS	MB	PA	SO	GS	MB	PA	SO	GS	MB	PA	SO
1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1,250	1,049	1,048	1,105	1,250	1,049	1,048	1,105	1,250	1,022	1,000	1,105
1,561	1,097	1,098	1,222	1,561	1,097	1,098	1,105	1,561	1,041	1,000	1,222
1,951	1,145	1,149	1,351	1,951	1,145	1,149	1,105	1,951	1,059	1,000	1,351
2,437	1,192	1,203	1,493	2,437	1,192	1,203	1,105	2,437	1,075	1,000	1,493
3,043	1,237	1,259	1,651	3,043	1,237	1,259	1,105	3,043	1,090	1,000	1,651
3,800	1,276	1,317	1,825	3,800	1,276	1,317	1,105	3,800	1,103	1,000	1,825
4,744	1,312	1,377	2,017	4,744	1,312	1,377	1,105	4,744	1,114	1,000	2,017
5,921	1,343	1,434	2,229	5,921	1,343	1,434	1,105	5,921	1,125	1,000	2,229
7,388	1,370	1,485	2,464	7,388	1,370	1,485	1,105	7,388	1,134	1,000	2,464
9,218	1,393	1,530	2,724	9,218	1,393	1,530	1,105	9,218	1,142	1,000	2,724
11,500	1,414	1,570	3,011	11,500	1,414	1,570	1,105	11,500	1,149	1,000	3,011
14,346	1,431	1,605	3,329	14,346	1,431	1,605	1,105	14,346	1,155	1,000	3,329
17,895	1,446	1,636	3,680	17,895	1,446	1,636	1,105	17,895	1,161	1,000	3,680
22,323	1,460	1,662	4,068	22,323	1,460	1,662	1,105	22,323	1,166	1,000	4,068
27,846	1,471	1,685	4,496	27,846	1,471	1,685	1,105	27,846	1,170	1,000	4,496
34,736	1,482	1,704	4,970	34,736	1,482	1,704	1,105	34,736	1,175	1,000	4,970

4.4. TÜR BOLLUKLARI

Türler için komünitedeki bulunma oranları hesaplamaları (Zhuang, 2011) şu şekildedir;

$$G.sulfurreducens; \frac{G.sulfurreducens \text{ sayısı}}{\text{Tüm türlerin sayısı}}$$

Asetatın ortama verildiği durumda komünitenin;

$$\frac{34,736}{34,736+1,482 +1.704+4,970} = 0.813 \text{ \% } 81.3 \text{ ü } G.sulfurreducens \text{ tir, ortamı domine eder.}$$

$$M.barkeri ; \frac{M.barkeri \text{ sayısı}}{\text{Tüm türlerin sayısı}}$$

$$\frac{1,482}{34,736+1,482 +1.704+4,970} = 0.034 \text{ komünitenin \% 3.4 ü } M.barkeri \text{ dir.}$$

$$P.aeruginosa; \frac{P.aeruginosa \text{ sayısı}}{\text{Tüm türlerin sayısı}}$$

$$\frac{1.704}{34.736+1.482 +1.704+4.970} = 0.04 \text{ komünitenin \% 4 ü } P.aeruginosa \text{ dır.}$$

$$S.oneidensis; \frac{S.oneidensis \text{ sayısı}}{\text{Tüm türlerin sayısı}}$$

$$\frac{4.790}{34.736+1.482 +1.704+4.970} = 0.112 \text{ komünitenin \%11.2 si } S.oneidensis \text{ tir.}$$

Laktatın 0 ve amonyumun 0 olduğu durumlarda bollukları sırasıyla şöyledir;

G.sulfurreducens % 89.2 ve % 83; *M.barkeri* % 3.7 ve % 2.8; *P.aeruginosa* % 4.3 ve % 2.4;

S.oneidensis %2.8 ve % 11.4.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikroorganizmaların aralarında anaerobik ortamda belirlediğimiz karbon ve enerji kaynağı substratların varlığında bir sentrofi olup olmayacağını anlamak için metabolik modelleri ile simülasyonlar yapılmıştır. Koşturmaların sonunda modellerin belirlenen akı değerlerini ulaşamadıkları görülmüştür. *G. sulfurreducens* ve *M.barkeri* nin, *S.oneidensis* in laktat olarak ürettiği asetati tüketeceği, Demir(III) için yarışacakları düşünülmüştür fakat *G. sulfurreducens* asetati almamıştır. Amonyum konsantrasyonu '0' iken laktat akısı '0' olmuş ve laktat akısı '0' iken de asetati üretmediğinden ortamın laktat ve amonyum konsantrasyonu '0' iken asetati akısı da '0' olmuştur. İlgilendiğimiz substratlardan laktati azalan akılarla almasının, biyokütlesinin azalan miktarlarla artış göstermesinin nedeni Fe(III) nin tükenmesi olabilir.

Modellerin verdikleri ile beraber asetati birikmesi nedeniyle *M.barkeri* artan akılarla asetati almıştır. Biyokütlesinin artmamasının nedeni birincil karbon kaynağı metanolün azalmasıdır. Tanımlanmasına rağmen Fe(III) kullanmamasının nedeni elektron alıcısı olarak H₂ veya format kullanması olabilir.

Pseudomonas aeruginosa nın birincil karbon kaynağı glikoz olduğundan *P.aeruginosa* artan büyüme oranlarına sahipken sonraki adımlarda biyokütlenin düşüş göstermesi glikoz ve asetati azalmasına bağlı olarak gelişmiştir. Amonyum tüketmiştir, 3mM ve daha fazla ortam asetati konsantrasyonlarında da asetati ve laktat salmıştır, küçük akılarla da olsa etanol tüketmiştir. Laktat yokken NH₄ almış, NH₄ yokken laktat ve etanol akısı 0, büyüme hızı 0 olmuştur, hücre konsantrasyonu değişmemiştir, diğer durumlarda glikoz ve asetati azalmasına bağlı olarak biokütle oranında düşüş gösteren grafiğe sahip olmuştur.

S.oneidensis etanol almasına rağmen biyokütlesinin ve dolayısıyla hücre konsantrasyonunun değişmemesi durumu söz konusu olmuştur. Bu durum da modelde hatalar mevcut olduğunun düşündürmektedir.

Genel çerçevede tekil modellerin gerçekte uyumlu olduğu görülmüştür. *M.barkeri* metanolü, *S.oneidensis* etanolü *P.aeruginosa* glikozu birincil karbon kaynağı olarak tüketerek, *G.Sulfurreducens* demir kullanarak gerçekçi eğilimler göstermişlerdir. Fakat aralarında net bir alışveriş çıkarılamamıştır.

G.sulfurreducens in alanında öncü çalışmada kullanılması ve çevresel önemi nedeni ile modeldeki sorunlara rağmen modelin yeteneklerini görmek üzere kullanılmıştır. Bu model deneysel çalışmalar ile revize edilebilir ve modeli kullanacak araştırmacılar modelin yeteneklerini daha iyi keşfedebilmek için organizmanın metabolizması üzerine çalışabilirler. *G. sulfurreducens* biyoremediasyon yeteneğinin yanısıra mikrobiyal yakıt hücresi olması üzerine çalışmalar yapılması nedeniyle metabolik modelleme için dikkate değer bir organizmadır

M.barkeri önemli bir metanojendir, sülfat indirgeyen bakterilerle etkileşimlerde bulunmaktadır. *M.barkeri* nin modeli iyi tanımlanmış sorunsuz çalışan bir modeldir, atık arıtımından metan üretiminin önemi bu modelin alandaki pek çok çalışmada kullanılmasına neden olmuştur.

Pek çok ortamda bulunabilen *P.aeruginosa* aynı zamanda aromatik hidrokarbonları parçalayabilen H_2O_2 yi detoksifiye edebilen önemli bir toprak bakterisidir. Metabolik modelleme çalışmaları için önemli bir organizma olacaktır.

S.oneidensis pek çok substrat için alım ve üretim yeteneğe sahip bir organizmadır. Anaerobik koşullar altında, Mn (III), Mn (IV), Fe (III), Cr (VI) ve U (VI) gibi birçok oksitlenmiş metal kullanabilir, kontamine olmuş ortamlardaki davranışları üzerine pek çok çalışma vardır ve elektrik üretimi yeteneği üzerine çalışmalar yaygınlaşmaktadır. Kısıt tabanlı analiz yöntemleri için geniş ve önemli sonuçlar verecek bir çalışma sahası sunmaktadır.

Metabolik ağların analizi sadece bilinenleri değil, suşa özgü gözden kaçmış sorunları da ortaya çıkarır, yeni hedeflerin ve yolların tanımlanmasına izin verir. Daha az çalışılmış mikroorganizmalar söz konusu olduğunda, herhangi bir genom-ölçekli metabolik modelin deneysel validasyonu özellikle kritiktir.

Mikroorganizmaların metabolik modellemesi ve kısıt tabanlı analizlerinde dinamik zamana ve konuma bağlı metabolik akıları tahmin edebilecek kinetik modellerin daha fazla takip edilmesi gerekmektedir.

Öngörücü düzeye ulaşmak için matematiksel modellerin deneysel veri toplama ve yöntem geliştirme ile bütünleşen gelişim göstermesi gerekmektedir. Biyoloji ve yazılım bilgileri yüksek araştırmacılara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mikrobiyal konsorsiyumlar tek bir türden daha verimli ve güçlü olduklarından, gelecekte biyo-temelli süreçlerin öneminin artacak olması nedeniyle bu yaklaşımları ilerletmek önemlidir.

KAYNAKÇA

- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Arkin, A., Stevens, R., Cottingham, R., Maslov, S., Henry, C., Dehal, P., ... Yoo, S. (2016). The DOE Systems Biology Knowledgebase (KBase). *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/096354>
- Biggs, M. B., Medlock, G. L., Kolling, G. L., & Papin, J. A. (2015). Metabolic network modeling of microbial communities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1308>
- Büchel, F., Rodriguez, N., Swainston, N., Wrzodek, C., Czauderna, T., Keller, R., ... Le Novère, N. (2013). Path2Models: Large-scale generation of computational models from biochemical pathway maps. *BMC Systems Biology*. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-116>
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3752-3759.1994>
- Devoid, S., Overbeek, R., DeJongh, M., Vonstein, V., Best, A. A., & Henry, C. (2013). Automated genome annotation and metabolic model reconstruction in the SEED and model SEED. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-299-5_2
- Feist, A. M., & Palsson, B. (2008). The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1401>
- Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>

- Kauffman, K. J., Prakash, P., & Edwards, J. S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.001>
- King, Z. A., Lu, J., Dräger, A., Miller, P., Federowicz, S., Lerman, J. A., ... Lewis, N. E. (2016). BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1049>
- Kitano, H. (2002). Computational systems biology. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01254>
- Koch, S., Benndorf, D., Fronk, K., Reichl, U., & Klamt, S. (2016). Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0429-x>
- Le Novère, N., Bornstein, B., Broicher, A., Courtot, M., Donizelli, M., Dharuri, H., ... Hucka, M. (2006). BioModels Database: a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj092>
- Lin, H., Peng, W., Zhang, M., Chen, J., Hong, H., & Zhang, Y. (2013). A review on anaerobic membrane bioreactors: Applications, membrane fouling and future perspectives. *Desalination*. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2013.01.019>
- Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00132.x>
- Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., & Patil, K. R. (2018). Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky537>
- Magnúsdóttir, S., Heinken, A., Kutt, L., Ravcheev, D. A., Bauer, E., Noronha, A., ... Thiele, I. (2017). Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3703>
- Mahadevan, R., Edwards, J. S., & Doyle, F. J. (2002). Dynamic Flux Balance Analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73903-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73903-9)

- Park, J. H., Lee, S. Y., Kim, T. Y., & Kim, H. U. (2008). Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.001>
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., & Jain, R. K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.001>
- Sahinkaya, E., & Dilek, F. B. (2007). Biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by acclimated mixed cultures. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.08.009>
- Sahinkaya, E., Dursun, N., Kilic, A., Demirel, S., Uyanik, S., & Cinar, O. (2011). Simultaneous heterotrophic and sulfur-oxidizing autotrophic denitrification process for drinking water treatment: control of sulfate production. *Water research*, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.056>
- Schilling, C. H., Letscher, D., & Palsson, B. O. (2000). Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *Journal of Theoretical Biology*. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.1073>
- Shoaie, S., Karlsson, F., Mardinoglu, A., Nookaew, I., Bordel, S., & Nielsen, J. (2013). Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep02532>
- Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. a, & Nielsen, J. (1998). Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. In *Metabolic Engineering*.
- Stolyar, S., Van Dien, S., Hillesland, K. L., Pinel, N., Lie, T. J., Leigh, J. A., & Stahl, D. A. (2007). Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.1038/msb4100131>
- Succurro, A., & Ebenhöh, O. (2018). Review and perspective on mathematical modeling of microbial ecosystems. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST20170265>
- Van Riel, N. A. W., Giuseppin, M. L. F., & Verrips, C. T. (2000). Dynamic optimal control of homeostasis: An integrative system approach for modeling of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. <https://doi.org/10.1006/mben.1999.0137>

Varma, A., & Palsson, B. O. (1994). Metabolic flux balancing: Basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1094-994>

Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., ... Nealson, K. H. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-705>

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>

Zhang, M. M., Wang, Y., Ang, E. L., & Zhao, H. (2016). Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/c6np00017g>

EKLER

EK 1

% Modellerin MATLAB'e tanımlanması,akı aralığının daraltılması,temel metabolitler için alımların belirlenmesi

```
barkeri=readCbModel('barkeri.mat');amm
```

```
for x=1:690
```

```
if barkeri.ub(x)>100
```

```
barkeri.ub(x)=100;
```

```
end
```

```
if barkeri.lb(x)<-100
```

```
barkeri.lb(x)=-100;
```

```
end
```

```
end
```

```
barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_ac_e'},[-0.0135],'l');
```

```
barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_nh4_e'},[-0.468],'l');
```

```
barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_fe3_e'},[-9.98],'l');
```

```
geobacter=readCbModel('geobacter.xml');
```

```
for x=1:608
```

```
if geobacter.ub(x)>100
```

```
geobacter.ub(x)=100;
```

```
end
```

```
if geobacter.lb(x)<-100
```

```
geobacter.lb(x)=-100;
```

end

end

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{**'EX_lac__L(e)'**},[-10],**'I'**);

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{**'EX_nh4(e)'**},[-0.468],**'I'**);

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{**'EX_fe3(e)'**},[-9.98],**'I'**);

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{**'EX_ac(e)'**},[-0.0135],**'I'**);

aeruginosa=readCbModel('pseudomonas_aeruginosa.xml');

for x=1:870

if aeruginosa.ub(x)>100

aeruginosa.ub(x)=100;

end

if aeruginosa.lb(x)<-100

aeruginosa.lb(x)=-100;

end

end

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{**'EX_o2_e'**},[0],**'I'**);

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{**'EX_lac__L_e'**},[-10],**'I'**);

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{**'EX_fe3_e'**},[-9.98],**'I'**);

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{**'EX_nh4_e'**},[-0.468],**'I'**);

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{**'EX_ac_e'**},[-0.035],**'I'**);

oneidensis=readCbModel('Shewanella_oneidensis.xml');

for x=1:870

if oneidensis.ub(x)>100

```

oneidensis.ub(x)=100;

end

if oneidensis.lb(x)<-100

oneidensis.lb(x)=-100;

end

end

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_o2(e)'},[0],'I');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_lac__L(e)'},[-10],'I');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_fe3(e)'},[-9.98],'I');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_ac(e)'},[-0.0135],'I');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_nh4(e)'},[-0.468],'I');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_etoh(e)'},[-10],'I');

%Başlangıç ortam konsantrasyonlarının belirlenmesi

acetate(1,1)=3;

methanol(1,1)=100;

lactate(1,1)=20;

glucose(1,1)=100;

ethanol(1,1)=100;

ammonium(1,1)=150;

fe3(1,1)=10;

%Başlangıç hücre konsantrasyonlarının belirlenmesi

cellconcbarkeri(1,1)=1;

cellconcgeobacter(1,1)=1;

cellconcaeruginosa(1,1)=1;

cellconconeidensis(1,1)=1;

```

```

%Alt sınır akıların belirlenmesi

lbac=-0.0135;

lbmeoh=-10;

lblac=-10;

lbglc=-10;

lbetoh=-10;

lbnh4=-0.468;

lbfe3=-9.98;

% Modellerin alt sınırlarının belirlenen değerler olarak değiştirilmesi

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_meoh_e'},lbmeoh,'l');

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_ac_e'},lbac,'l');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_ac(e)'},lbac,'l');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_lac__L(e)'},lblac,'l');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_nh4(e)'},lbnh4,'l');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_fe3(e)'},lbfe3,'l');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_glc_e'},lbglc,'l');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_ac_e'},lbac,'l');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_etoh_e'},lbetoh,'l');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_etoh(e)'},lbetoh,'l');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_lac__D(e)'},lblac,'l');

oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_ac(e)'},lbac,'l');

changeCobraSolver('gurobi','all');

% yeni kısıtlarlaoptimizasyon

for t=1:100

slnbarkeri=optimizeCbModel(barkeri);

```

```

slngeobacter=optimizeCbModel(geobacter);
slnaeruginosa=optimizeCbModel(aeruginosa);
slnoneidensis=optimizeCbModel(oneidensis);
%çözüm 1 olursa döngünün kırılması
if isempty(slnbarkeri.obj)==1 break,end
if isempty(slngeobacter.obj)==1 break,end
if isempty(slneruginosa.obj)==1 break,end
if isempty(slnoneidensis.obj)==1 break,end
growth(t,1)=slnbarkeri.obj;
growth(t,2)=slngeobacter.obj/14.17;
growth(t,3)=slneruginosa.obj;
growth(t,4)=slnoneidensis.obj/17;
%metabolit konsantrasyonlarının güncellenmesi
methanol(t+1,1)=methanol(t,1)+cellconcbarkeri(t,1)*slnbarkeri.v(342);
methanol(t+1,2)=slnbarkeri.v(342);
if methanol(t+1,1)<0;
methanol(t+1,1)=0;
end
acetate(t+1,1)=acetate(t,1)+cellconcgeobacter(t,1)*slngeobacter.v(533)/14.17+cellconcbarkeri(t,
1)*slnbarkeri.v(251)...
+cellconcaeruginosa(t,1)*slneruginosa.v(95)+cellconconeidensis(t,1)*slnoneidensis.v(776)/17;
if acetate(t+1,1)<0 ;
acetate(t+1,1)=0;
end
acetate(t+1,2)=slngeobacter.v(533)/14.17;

```

```

acetate(t+1,3)=slnbarkeri.v(251);

acetate(t+1,4)=slnaeruginosa.v(95);

acetate(t+1,5)=slnoneidensis.v(776)/17;

lactate(t+1,1)=lactate(t,1)+cellconcgeobacter(t,1)*slngeobacter.v(551)/14.17+cellconconeidensis
(t,1)*slnoneidensis.v(829)...

/17+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.v(154);

if lactate(t+1,1)<0 ;

lactate(t+1,1)=0;

end

lactate(t+1,2)=slngeobacter.v(551)/14.17;

lactate(t+1,3)=slnoneidensis.v(829)/17;

lactate(t+1,4)=slnaeruginosa.v(154);

ethanol(t+1,1)=ethanol(t,1)+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.v(124)+cellconconeidensis(t,
1)*slnoneidensis.v(802)/17;

ethanol(t+1,2)=slnaeruginosa.v(124);

ethanol(t+1,3)=slnoneidensis.v(802)/17;

if ethanol(t+1,1)<0 ;

ethanol(t+1,1)=0;

end

glucose(t+1,1)=glucose(t,1)+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.v(135);

glucose(t+1,2)=slnaeruginosa.v(135);

if glucose(t+1,1)<0 ;

glucose(t+1,1)=0;

end

ammonium(t+1,1)=ammonium(t,1)+cellconcgeobacter(t,1)*slngeobacter.v(528)/14.17+cellconc
barkeri(t,1)*slnbarkeri.v(357)...

```

```

+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.v(173)+cellconconeidensis(t,1)*slnoneidensis.v(839)/17
;

if ammonium(t+1,1)<0 ;
ammonium(t+1,1)=0;
end

ammonium(t+1,2)=slngeobacter.v(528)/14.17;
ammonium(t+1,3)=slnbarkeri.v(357);
ammonium(t+1,4)=slnaeruginosa.v(173);
ammonium(t+1,5)=slnoneidensis.v(839)/17;

fe3(t+1,1)=fe3(t,1)+cellconceobacter(t,1)*slngeobacter.v(532)/14.17+cellconcbarkeri(t,1)*slnb
arkeri.v(303)...

+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.v(126)+cellconconeidensis(t,1)*slnoneidensis.v(804)/17
;

if fe3(t+1,1)<0;
    fe3(t+1,1)=0;
end

fe3(t+1,2)=slngeobacter.v(532)/14.17;
fe3(t+1,3)=slnbarkeri.v(303);
fe3(t+1,4)=slnaeruginosa.v(126);
fe3(t+1,5)=slnoneidensis.v(804)/17;

% hücre konsantrasyonlarının güncellenmesi

cellconcbarkeri(t+1,1)=cellconcbarkeri(t,1)+slnbarkeri.obj*cellconcbarkeri(t,1);
cellconceobacter(t+1,1)=cellconceobacter(t,1)+cellconceobacter(t,1)*slngeobacter.obj/14.17;
cellconcaeruginosa(t+1,1)=cellconcaeruginosa(t,1)+cellconcaeruginosa(t,1)*slnaeruginosa.obj;
cellconconeidensis(t+1,1)=cellconconeidensis(t,1)+cellconconeidensis(t,1)*slnoneidensis.obj/17
;

```

%metabolit konsantrasyonu '0' dan küçük çıkarsa döngünün kırılması

```
if fe3(t,1)==0;
```

```
    lbfe3=0;
```

```
else
```

```
    lbfe3=lbfe3*fe3(t+1,1)/fe3(t,1);
```

```
end
```

```
if methanol(t,1)==0;
```

```
    lbmeoh=0;
```

```
else
```

```
    lbmeoh=lbmeoh*methanol(t+1,1)/methanol(t,1);
```

```
end
```

```
if acetate(t,1)==0;
```

```
    lbac=0;
```

```
else
```

```
    lbac=lbac*acetate(t+1,1)/acetate(t,1);
```

```
end
```

```
if lactate(t,1)==0;
```

```
    lblac=0;
```

```
else
```

```
    lblac=lblac*lactate(t+1,1)/lactate(t,1);
```

```
end
```

```
if glucose(t,1)==0;
```

```
    lbglc=0;
```

```
else
```

```

lbglc=lbglc*glucose(t+1,1)/glucose(t,1);

end

if ethanol(t,1)==0;

lbetoh=0;

else

lbetoh=lbetoh*ethanol(t+1,1)/ethanol(t,1);

end

if ammonium(t,1)==0;

    lbnh4=0;

else

    lbnh4=lbnh4*ammonium(t+1,1)/ammonium(t,1);

end

% modellerin yeni alt sınır akı değerlerinin güncellenmesi

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_meoh_e'},lbmeoh,'I');

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_ac_e'},lbac,'I');

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_nh4_e'},lbnh4,'I');

barkeri=changeRxnBounds(barkeri,{'EX_fe3_e'},lbfe3,'I');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_ac(e)'},lbac,'I');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_lac__L(e)'},lblac,'I');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_nh4(e)'},lbnh4,'I');

geobacter=changeRxnBounds(geobacter,{'EX_fe3(e)'},lbfe3,'I');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_glc_e'},lbglc,'I');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_ac_e'},lbac,'I');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_etoh_e'},lbetoh,'I');

aeruginosa=changeRxnBounds(aeruginosa,{'EX_nh4_e'},lbnh4,'I');

```

```
oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_etoh(e)'},lbetoh,'I');  
oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_lac__D(e)'},lblac,'I');  
oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_ac(e)'},lblac,'I');  
oneidensis=changeRxnBounds(oneidensis,{'EX_nh4(e)'},lbnh4,'I');  
clear slnbarkeri  
clear slngeobacter  
clear slnaeruginosa  
clear slnoneidensis  
end
```

EK 2

```
barkeri=readCbModel('barkeri.mat');

for k=1:length(barkeri.lb)

    delbark=barkeri;

    delbark=changeRxnBounds(delbark,barkeri.rxns(k),[0],'l');

    delbark=changeRxnBounds(delbark,barkeri.rxns(k),[0],'u');

    sln1=optimizeCbModel(delbark);

    if isempty(sln1.obj)==1

        SL1(k,1)=0;

    else

        SL1(k,1)=sln1.obj;

    end

geobacter=readCbModel('sulfurreducens.xml');

for k=1:length(geobacter.lb)

    delgeo=geobacter;

    delgeo=changeRxnBounds(delgeo,geobacter.rxns(k),[0],'l');

    delgeo=changeRxnBounds(delgeo,geobacter.rxns(k),[0],'u');

    sln2=optimizeCbModel(delgeo);

    if isempty(sln2.obj)==1
```

```

        SL2(k,1)=0;

    else

        SL2(k,1)=sln2.obj;

    end

aeruginosa=readCbModel('Pa.xml');

for k=1:length(aeruginosa.lb)

    delaeru=aeruginosa;

    delaeru=changeRxnBounds(delaeru,aeruginosa.rxns(k),[0],'l');

    delaeru=changeRxnBounds(delaeru,aeruginosa.rxns(k),[0],'u');

    sln3=optimizeCbModel(delaeru);

    if isempty(sln3.obj)==1

        SL3(k,1)=0;

    else

        SL3(k,1)=sln3.obj;

    end

```

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ayşe Sıddıka KIZILIRMAK

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Şubat 1991, Konya

Elektronik Posta: aysekszlrmk@gmail.com



EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lise	Selçuklu Anadolu Lisesi	2010
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	2015
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Çevre ve Enerji Sistemleri Mühendisliği	

YABANCI DİLLER

İngilizce

Almanca (Orta düzey)

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Microsoft Ofis Programları

MATLAB

