



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Atık Aktif Çamuru Anaerobik Çürüten Mikrobiyal
Toplulukların Metabolik Modellemesi

Yüksek Lisans Tezi

Ebru Sarsılmaz

Ekim, 2024



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Atık Aktif Çamuru Anaerobik Çürüten Mikrobiyal
Toplulukların Metabolik Modellemesi

Yüksek Lisans Tezi

Ebru Sarsılmaz

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez

Ekim, 2024

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Ebru Sarsılmaz tarafından hazırlanan "Atık Aktif Çamuru Anaerobik Çürüten Mikrobiyal Toplulukların Metabolik Modellemesi" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Çevre ve Enerji Sistemleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Şeref Gül
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Senem Teksoy Başaran
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 08/ 10/ 2024

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun APA kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez

Etik İlkelere Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Ebru Sarsılmaz

ÖZET

Atık Aktif Çamuru Anaerobik Çürüten Mikrobiyal Toplulukların Metabolik Modellemesi

Sarsılmaz, Ebru

Yüksek Lisans Tezi, Çevre ve Enerji Sistemleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Muhammed Erkan Karabekmez

Ekim 2024

Sanayileşme ve kentleşmenin hızla artması, kaynakların bilinçsizce kullanılmasına ve ciddi atık sorunlarına yol açmaktadır. Atıkların yönetimi ve geri dönüşümü, günümüz dünyasında çevresel sürdürülebilirlik açısından kritik bir öneme sahiptir. Özellikle atık su arıtma tesislerinde oluşan atık aktif çamur (AAÇ), çevre mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarında ele alınması gereken zorlu bir sorundur. Anaerobik çürütme (AÇ) yöntemi, bu atıkların biyogaza dönüştürülerek enerji geri kazanımı sağlayan etkili bir çözüm sunmaktadır. AÇ sürecinin başarısı, bu süreçte rol oynayan mikrobiyal toplulukların kompozisyonu ve metabolik aktivitelerine bağlıdır. Firmicutes ve Methanosarcina gibi mikroorganizmalar, organik maddelerin biyogaza dönüşümünde kritik bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, dinamik akı denge analizi (dFBA) yöntemi kullanılarak mikrobiyal toplulukların metabolik aktiviteleri MATLAB ve COBRA araç kutusu aracılığıyla modellenmiştir. dFBA, mikrobiyal toplulukların zaman içindeki metabolik değişimlerini incelemek için güçlü bir araçtır ve bu süreçteki çevresel değişimlere nasıl tepki verdiklerini simüle eder. Özellikle Firmicutes ve Methanosarcina'nın hücre dışı Sulfate, LAlanine, LArginine, LMethionine, Spermidine, meoh_e, so3_e, h2_e, so4_e, ac_e gibi metabolit konsantrasyonları ve bu iki organizmanın biyokütle değişimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Firmicutes ve Methanosarcina'nın biyokütle büyümelerinin 10 adım boyunca arttığını ve metabolit konsantrasyonlarındaki değişimlerin anaerobik çürütme sürecinin verimliliğine önemli katkı sağladığını göstermiştir.

Bu çalışma, sürdürülebilir atık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamakta ve biyogaz üretim sistemlerinin optimizasyonu için önemli bir adım sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Anaerobik çürütme, dinamik akı denge analizi (dFBA), mikrobiyal topluluklar, Firmicutes, Methanosarcina, biyogaz üretimi, MATLAB, COBRA araç kutusu, genome ölçekli metabolik modeller (GEM), atık yönetimi*

ABSTRACT

Metabolic Modeling of Microbial Communities Anaerobically Digesting Waste Activated Sludge

Sarsılmaz, Ebru

Master's Thesis, Department of Environmental and Energy Systems Engineering

Supervisor: Dr. Muhammed Erkan Karabekmez

Ekim 2024

The rapid increase in industrialization and urbanization has led to the unconscious use of resources and serious waste problems. Waste management and recycling are critically important for environmental sustainability in today's world. Waste activated sludge (WAS), which is generated in wastewater treatment plants, is a challenging issue that needs to be addressed in the fields of environmental engineering and biotechnology. Anaerobic digestion (AD) provides an effective solution by converting this waste into biogas, enabling energy recovery. The success of the AD process depends on the composition and metabolic activities of the microbial communities involved. Microorganisms such as Firmicutes and Methanosarcina play a crucial role in the conversion of organic matter into biogas.

In this study, the metabolic activities of microbial communities were modeled using the dynamic flux balance analysis (dFBA) method via MATLAB and the COBRA toolbox. dFBA is a powerful tool to examine the metabolic changes of microbial communities over time and simulate how they respond to environmental changes during this process. The extracellular concentrations of metabolites such as sulfate, L-alanine, L-arginine, L-methionine, spermidine, meoh_e, so3_e, h2_e, so4_e, and ac_e, along with the biomass changes of Firmicutes and Methanosarcina, were analyzed. The results revealed that the biomass growth of Firmicutes and Methanosarcina increased at different time points, and changes in metabolite concentrations significantly contributed to the efficiency of the anaerobic digestion process.

This study contributes to the development of sustainable waste management strategies and represents an important step towards optimizing biogas production systems.

Keywords: *Anaerobic digestion, dynamic flux balance analysis (dFBA), microbial communities, Firmicutes, Methanosarcina, biogas production, MATLAB, COBRA Toolbox, genome-scale metabolic models (GEM), waste management*

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, lisansüstü eğitimim süresince öğrendiğim bilgi ve deneyimlerin bir ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, sabırla desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Muhammed Erkan Karabekmez'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu süreçte bana destek ve yardımcı olan Bezmiâlem Vakıf Üniversitesindeki ekip arkadaşım Arş. Gör. Esra Büşra Işık'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirirken karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmemde bana her zaman destek olan çok değerli aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım. Onların varlığı, bu süreçte bana güç vermiştir.

Son olarak, bu tez çalışmasını bilime katkıda bulunma arzusu ile hazırladığımı belirtmek isterim. Umuyorum ki bu çalışma, gelecekte yapılacak çalışmalara ilham kaynağı olur.

Teşekkür eder, saygılarımla sunarım.

Ebru Sarsılmaz.

İÇİNDEKİLER

KISILTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Mikrobiyal Toplulukların Özellikleri ve Uygulama Alanları	2
1.2. Mikrobiyal Toplulukların Anaerobik Çürütme Süreçlerindeki Rollerini	3
1.3. Dinamik Metabolik Modelleme ve Önceki Çalışmalarda Bu Yöntemlerin Kullanımı	3
1.4. dFBA'nın Önemi	6
1.5. MATLAB ve COBRA Araç Kutusu	7
2. YÖNTEM	10
2.1. Yazılım Kurulumu ve Araçların Yapılandırılması	10
2.1.1. MATLAB	10
2.1.2. COBRA Araç Kutusu	10
2.2. Gurobi Optimizasyon Kurulumu ve Konfigürasyonu	11
2.3. Model Oluşturma ve Veri Kaynakları	12
2.3.1. BiGG Veri Tabanı:	12
2.3.2. Microbiome Atlas:	12
2.4. Dinamik FBA (dFBA):	12
2.5. dFBA Uygulaması	13
2.5.1. Model Kurulumu:	13
2.5.2. Zaman Adımları:	13
2.5.3. Çevresel ve Biyolojik Değişiklikler:	13
2.5.4. Sonuçların Analizi:	13
2.6. Kullanılan Dinamik Akı Denge Analizi (dFBA) Parametreleri	13

2.6.1. Girdiler	13
2.6.2. Çıktılar	14
2.7. Başlangıç Değerlerinin Belirlenmesi	14
2.7.1. Başlangıç Biyokütle Değerleri	14
2.7.2. Başlangıç Metabolit Konsantrasyonları	14
2.8. Substrat Reaksiyonlarının Seçimi	14
2.8.1.Firmicutes için belirlenen substrat reaksiyonları	15
2.8.2.Methanosarcina için belirlenen substrat reaksiyonları	16
2.9. Çalışmada Kullanılan dFBA Kodları	17
2.10. Sonuçların Analizi ve Yorumlanması	18
3. SONUÇ	19
3.1.Methanosarcina ve Firmicutes'in Biyokütle Artışları	19
3.2.Firmicutes Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi	21
3.3.Firmicutes Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi	23
3.4.Methanosarcina EX_h2_e (Hidrojen), EX_ac_e (Asetat) ve EX_so3_e (sülfat) Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi	25
3.5.Methanosarcina EX_meoh_e (Methanol) ve EX_so4_e (Sülfat) Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi	27
4.TARTIŞMA	29
5. KAYNAKÇA	32

KISILTMALAR

AAÇ: Atık Aktif Çamur

AÇ: Anaerobik Çürütme

BiGG: Biyokimyasal, Genetik ve Genomik olarak yapılandırılmış

CAG: Co-Abundance Grup

cd: Dizini Değiştir

COBRA Araç Kutusu: Kısıt Tabanlı Yeniden Yapılandırma ve Analiz Araç Kutusu

dFBA: Dinamik Akı Denge Analizi

DMM: Dinamik Metabolik Modelleme

EC: Enzim Komisyonu

EX: Ekstraselüler

FBA: Akı Denge Analizi

gDW: Gram Kuru Ağırlık

GEM: Genom Ölçekli Metabolik Model

IC: Başlangıç Konsantrasyonu

MATLAB: Matris Laboratuvarı

mM: Milimolar

rRNA: Ribozomal RNA

Str.: Strain (Suş)

ŞEKİLLER

Şekil 1. Firmicutes bakterisinin metabolizmasını ve amino asit biyosentezini temsil etmektedir (Shi ve ark., 2021).....	15
Şekil 2. Fermantatif bir bakteri olan Syntrophomonas (sol) ile metanojenik bir arke olan Methanosarcina (sağ) arasındaki madde geçişlerini temsil ediyor. (Shi ve ark., 2021).....	16
Şekil 3. Methanosarcina ve Firmicutes organizmalarının biyokütle artışının 10 adımda değişim grafiği.....	19
Şekil 4. Firmicutes organizmasının Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.	21
Şekil 5. Firmicutes organizmasının Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.....	23
Şekil 6. Methanosarcina organizmasının EX_h2_e, EX_ac_e ve EX_so3_e metabolitlerinin 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.....	25
Şekil 7. Methanosarcina organizmasının EX_meoh_e ve EX_so4_e 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.....	27

TABLÖLAR

Tablo 1. Methanosarcina ve Firmicutes organizmalarının 10 adım boyunca biyokütle değerlerindeki değişim.....	19
Tablo 2. Firmicutes organizmasının Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimleri.	21
Tablo 3. Firmicutes organizmasının Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimleri.....	23
Tablo 4. Methanosarcina organizmasının EX_h2_e, EX_ac_e ve EX_so3_e metabolitlerinin 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimleri.....	25
Tablo 5. Methanosarcina organizmasının EX_meoh_e ve EX_so4_e 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimleri.....	27

1.GİRİŞ

Küreselleşen dünyada sanayileşmenin ve kentleşmenin artmasıyla kaynaklar bilinçsizce kullanılmakta ve bunun sonucunda atıklar oluşmaktadır. Gittikçe artarak ortaya çıkan bu atık sorunu; toplumu ve her bir bireyi etkilemektedir. Bu oluşan atıkların yeniden işlenmesi, üretimi ve kullanımı yani geri dönüşümü günümüz dünyasında önemli yer tutar (Gündüzalp ve ark. 2016).

Çevre mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarında, atık yönetimi ve çevresel sürdürülebilirlik, özellikle kentsel ve endüstriyel faaliyetlerin yoğun olduğu bölgelerde önemli bir rol oynamaktadır. Bu faaliyetlerin bir sonucu olarak ortaya çıkan atık su arıtma tesislerindeki atık aktif çamur (AAÇ), yönetilmesi gereken zorlu bir çevresel sorundur (Alhraishawi ve ark. 2022). Hem çevresel hem de ekonomik açıdan sürdürülebilir çözümler gerektiren bu sorun, anaerobik çürütme (AÇ) yöntemi ile ele alınabilir (Rani R.U ve ark., 2012).

Anaerobik çürütme (AÇ), enerji tüketimini azaltabilir veya çevre için büyük önem taşıyan enerjiyi üretebilir. Son yıllarda anaerobik çürütme teknolojileri, hayvan atıkları, kaynaktan ayrılmış evsel atıklar, organik endüstriyel atıklar ve endüstriyel atık sular dahil olmak üzere birçok başka atık türünden arıtım ve enerji geri kazanımını vurgulamak için genişletilmiştir. Anaerobik çürütmenin uygulanmasına olan ilginin artmasıyla, bu sürecin optimizasyonu giderek daha önemli hale gelmektedir (Pakmaya, 2008).

Anaerobik çürütme sürecinin etkinliği, içerisinde yer alan mikrobiyal toplulukların kompozisyonu ve metabolik aktiviteleri ile doğrudan ilişkilidir (Castellano-Hinojosa ve ark., 2018). Bu bağlamda, sürecin daha iyi anlaşılması ve optimize edilmesi, sürdürülebilir atık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesinde hayati rol oynar. Atık aktif çamurun anaerobik çürütülmesi üzerine yapılan önceki çalışmalar, bu sürecin temel biyokimyasal mekanizmalarını ve mikrobiyal toplulukların rolünü detaylı bir şekilde incelenmesine odaklanmıştır (Narihiro ve ark. 2007).

Mikrobiyal topluluklar, çeşitli mikroorganizmaların bir arada yaşadığı, etkileşim içinde bulunduğu ekosistemlerdir. Bu topluluklar, bakteriler, arkeler, mantarlar, algler ve virüsler gibi farklı türden mikroorganizmaları içerebilir. Mikrobiyal topluluklar, doğal ortamlarda toprak, su, insan ve hayvan bağırsaklarında bulunabilirler (Konopka, 2009).

1.1. Mikrobiyal Toplulukların Özellikleri ve Uygulama Alanları

1. **Çeşitlilik:** Mikrobiyal topluluklar, geniş bir tür çeşitliliği gösterir. Bu çeşitlilik, ekosistemlerin sağlığı ve işlevselliği için kritik öneme sahiptir.
2. **Etkileşim:** Mikrobiyal topluluklardaki organizmalar arasında karmaşık etkileşimler vardır. Bu etkileşimler simbiyotik, yarışmalı veya antagonistik olabilir.
3. **Ekolojik Rol:** Mikrobiyal topluluklar, besin döngüsü, organik madde parçalanması, toprak sağlığı ve verimliliği, su kalitesi ve hatta insan sağlığı gibi birçok ekolojik ve biyolojik süreçte merkezi role sahiptir.
4. **Dinamizm:** Mikrobiyal topluluklar, çevresel koşullara bağlı olarak sürekli olarak değişir. Bu dinamizm, ekosistemlerin çevresel streslere adaptasyon kapasitesini belirler.

Uygulama Alanları:

1. **Çevre Bilimi:** Mikrobiyal toplulukların analizi, su arıtma, atık yönetimi ve kirlilik kontrolü gibi çevresel süreçlerin optimizasyonunda kullanılır.
2. **Sağlık Bilimleri:** İnsan mikrobiyotasının anlaşılması, hastalıkların tanı ve tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olur.
3. **Tarım:** Toprak mikrobiyal topluluklarının sağlığı, bitki büyümesini ve hastalıklara direncini etkileyebilir, dolayısıyla sürdürülebilir tarım uygulamalarında önemli bir faktördür.
4. **Biyoteknoloji:** Mikrobiyal topluluklardan elde edilen enzimler ve metabolitler, biyoyakıt üretimi, ilaç geliştirme ve endüstriyel biyoproseslerde kullanılabilir.

1.2. Mikrobiyal Toplulukların Anaerobik Çürütme Süreçlerindeki Roller

Anaerobik çürütme sürecinde mikrobiyal topluluklar, organik maddenin biyogaza dönüşümünde merkezi roller oynar. Bu süreç dört ana aşamada gerçekleşir: hidroliz, asitogenezi, asetojenez ve metanojenez. Her bir aşama, farklı mikroorganizma grupları tarafından yönetilir ve bu gruplar birbirleriyle metabolik olarak etkileşirler (Nguyen ve ark., 2018).

Hidrolizde, kompleks organik bileşikler daha küçük moleküllere parçalanır. Bu aşamada çeşitli bakteriler tarafından enzimatik aktivite gösterilir (Nguyen ve ark., 2018).

Asitogenezi, hidroliz sonucu oluşan basit moleküllerin uçucu yağ asitleri ve alkol gibi ara ürünlerine dönüştürülmesini içerir. Bu süreçte çeşitli asit üretici bakteriler rol alır (Nguyen ve ark., 2018).

Asetojenezde, oluşan ara ürünler daha basit bileşenlere indirgenir, ki bu da metanojenez için gerekli ortamı hazırlar (Nguyen ve ark., 2018).

Metanojenez, metan üreten arkeler tarafından gerçekleştirilir ve anaerobik çürütmenin son aşamasıdır. Bu aşamada metan ve karbondioksit gibi gazlar üretilir (Nguyen ve ark., 2018).

Mikrobiyal topluluklar, çevresel faktörlere ve işletme koşullarına duyarlıdır. Bunlar arasında sıcaklık, pH, organik yük ve besin maddesi konsantrasyonu gibi parametreler bulunur. Bu parametrelerin optimizasyonu, mikrobiyal aktiviteyi maksimize eder ve biyogaz üretiminin verimliliğini artırır (Demirel ve ark., 2008).

1.3. Dinamik Metabolik Modelleme ve Önceki Çalışmalarda Bu Yöntemlerin Kullanımı

Dinamik metabolik modelleme (DMM), mikrobiyal toplulukların zaman içindeki metabolik aktivitelerini ve bunların çevresel değişimlere nasıl tepki verdiklerini anlamak için kullanılır (Zomorodi ve ark., 2014). Bu yöntemler, özellikle anaerobik çürütme süreçlerini optimize etmek için değerlidir çünkü biyogaz üretimini etkileyen anahtar metabolik yolları ve mikroorganizma etkileşimlerini detaylı olarak inceler (Vasilakou ve ark., 2016).

Önceki çalışmalar, 16S rRNA gen sekanslama gibi yöntemler kullanarak mikrobiyal toplulukların yapısal ve işlevsel dinamiklerini çözümlemiştir. Bu çalışmalar, mikrobiyal toplulukların çeşitliliği ve bolluğunu belirlemek için çeşitli moleküler teknikler kullanmış ve bu bilgileri anaerobik çürütme performansı ile ilişkilendirmiştir. Örneğin, bir çalışma, farklı mikrobiyal toplulukların fonksiyonel profillerini tahmin etmek için Tax4Fun gibi araçları kullanarak, bu toplulukların biyogaz üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmiştir (De Vrieze ve ark., 2018).

Bu yöntemlerin uygulanması, anaerobik çürütme sürecinin daha iyi anlaşılmasına ve daha verimli biyogaz üretim sistemlerinin tasarlanmasına olanak tanır. Dinamik modelleme, süreç kontrolü ve sistem tasarımında önemli bir araç olarak ön plana çıkmaktadır. Bu araçlar, çeşitli operasyonel parametrelerin sürece etkisini değerlendirir ve bu süreçlerde yapılabilecek iyileştirmeler için bilimsel temelli öneriler sunar.

Anaerobik çürütme süreçlerinde mikrobiyal toplulukların işlevlerini anlamak, sürecin verimliliğini artırmada kritik öneme sahiptir. Shi ve arkadaşlarının çalışması, atık aktif çamurun anaerobik sindirimi sırasında hidrokömürün mikrobiyal topluluklar üzerindeki etkisini vurgulayarak, mikrobiyal metabolizmanın bu süreçteki dinamiklerini açıklamaktadır (Shi ve arkadaşları, 2021).

Bu çalışmada, anaerobik çürütme sürecindeki mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri ve işlevleri detaylı bir şekilde analiz edilmiş olmasına rağmen, mikrobiyal toplulukların dinamik yapısı ve metabolik etkileşimleri tam olarak anlaşılamamıştır. Literatürde, bu toplulukların kompozisyonunun ve çürütme performansına etkilerinin belirlenmesi üzerine yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, mikrobiyal toplulukların metabolik aktivitelerinin matematiksel olarak modellenmesi ve bu modellerin dinamik analizlerle birleştirilmesi konusunda yapılan araştırmalar sınırlıdır. Firmicutes ve Methanosarcina gibi türler, anaerobik çürütme sürecinde özellikle dikkat çekicidir.

Firmicutes, bakterilerin geniş bir filumunu oluşturur ve çeşitli ortamlarda bulunabilirler, özellikle insan ve hayvan bağırsaklarında yaygındırlar. Bu grubun üyeleri, genellikle gram-pozitif hücre duvar yapısına sahiptir ve çoğu yuvarlak veya çubuk şeklindedir. Firmicutes, çeşitli metabolik süreçlerde rol oynar ve bazı türleri, sindirimde yardımcı olan fermantasyon yoluyla enerji üretirken, diğerleri patojen olabilir. Bu filum aynı zamanda çevresel biyoteknoloji ve endüstriyel mikrobiyoloji uygulamalarında önemli bir yere sahiptir, çünkü üyeleri biyoyakıt üretimi ve atık su arıtımı gibi süreçlerde kullanılabilir. Firmicutes'in insan sağlığı üzerindeki etkileri, özellikle bağırsak mikrobiyotasının dengesi ve obezite gibi metabolik hastalıklarla ilişkileri üzerine yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Afzaal ve ark., 2022)

Bu çalışmadaki kullanılan genom ölçekli metabolik model (GEM), genellikle metagenomik projelerde karşılaşılan ve henüz tam olarak tanımlanmamış, kültüre alınamayan bir Firmicutes türüdür. Bu türün bir topluluk içinde keşfedildiğini ve henüz izole bir kültür olarak elde edilmediğini gösterir.

Genom ölçekli metabolik modeller (GEM'ler), bir organizmanın tüm metabolik ağını temsil eden ve hücre içinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları kapsayan hesaplama modelleridir. Bu modeller, genom anotasyon verileri kullanılarak oluşturulur ve metabolik süreçlerde görev alan enzimleri kodlayan genleri tanımlar. GEM'ler, organizmaların besinleri nasıl işlediğini, enerjiyi nasıl ürettiğini ve çeşitli koşullarda metabolik akışların nasıl dağıldığını incelemeye olanak tanır (Wu ve ark., 2024).

Methanosarcina, metan üreten (metanojen) arkelerin bir grubudur ve Euryarchaeota şubesine aittir. Bu cins, çeşitli organik substratları metan gazına dönüştürebilen tek hücreli mikroorganizmaları içerir. Methanosarcina türleri, çoğu metanojenin aksine, asetat, metanol ve metilaminler dahil olmak üzere çeşitli C1 bileşiklerini substrat olarak kullanabilirler. Bu özellik, onları ekolojik olarak çok yönlü ve metan döngüsünde önemli aktörler yapar. Methanosarcina, oksijensiz ortamlarda, özellikle çamur, gölet sedimanları ve hayvanların sindirim sistemleri gibi anaerobik ortamlarda bulunur (Wagner, 2020).

Bu çalışmada kullanılan, *Methanosarcina barkeri str. fusaro* ise Methanosarcina'nın en iyi bilinen bir türüdür ve laboratuvar ortamında en çok incelenen metanojenlerden biridir. Metanojenler, benzersiz enzimler ve kofaktörler içeren benzersiz bir metabolik yolla metan üreten organizmalardır. Metanojenlerin tamamı litotroftur ve kendi enerjilerini yalnızca metanojenez yoluyla üretebilirler. Çoğu metanojen karbondioksit ve hidrojen gazından metan üretebilir. Bazı metanojenler karbon monoksit veya formik asit gibi diğer 1 karbonlu bileşikleri kullanabilir ve birkaçı da asetat ve metilaminleri kullanabilir. Metabolik yoldaki enzimler oksijene çok duyarlıdır. Methanosarcina ailesindeki bakteriler yavaş gelişirler ve fiziksel ve kimyasal koşullardaki ani değişikliklere karşı hassastırlar, ancak çeşitli substratlarda büyüme yeteneğine sahiptirler. Bu metabolik çeşitlilik onları genetik analiz için özellikle cazip bir hedef haline getirmektedir (Wagner, 2020).

Mikroorganizma seçimleri, "Genome-Centric Metatranscriptomics Analysis Reveals the Role of Hydrochar in Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge" başlıklı çalışmadan esinlenerek yapılmış ve bu seçimler, BiGG ve Microbiome Atlas veri tabanlarından elde edilen kapsamlı bilgiler ile metodolojik olarak desteklenmiştir. Bu yaklaşım, seçilen mikroorganizmaların metabolik potansiyellerinin daha derinlemesine anlaşılmasını ve modelleme süreçlerinde yüksek doğruluk sağlanmasını amaçlamaktadır.

BiGG, geniş kapsamlı bir metabolik modelleme veri tabanıdır (Norsigian ve ark, 2019). BiGG Model, genom ölçeğinde metabolik ağ yeniden yapılandırmalarının bir bilgi tabanıdır.

Bu veri tabanı, 70'ten fazla yayınlanmış genom ölçeğinde metabolik ağı, BiGG ID'leri adı verilen bir dizi yıldızlaştırılmış tanımlayıcıyla tek bir veri tabanına entegre eder (Norsigian ve ark, 2019). BiGG modellerindeki genler, NCBI genom açıklamalarına eşlenir ve metabolitler birçok harici veri tabanına (KEGG, PubChem ve daha fazlası) bağlanır.

Microbiome Atlas, mikrobiyal toplulukların genetik çeşitliliğini ve ekolojik dağılımını kapsayan bir veri tabanıdır (Microbiome Atlas).

Metabolik modelleme çalışmalarında, MATLAB ortamında COBRA araç kutusu (Navid A, 2022) kullanılarak dinamik akı denge analiz (dFBA) yöntemlerine başvurulmuştur. Bu yöntem, mikrobiyal toplulukların metabolik aktivitelerini ve zaman içindeki değişimlerini matematiksel olarak modellemeyi mümkün kılar, böylece anaerobik çürütme sürecindeki metabolik değişimler ve etkileşimler daha detaylı olarak incelenebilir. Bu entegrasyon, anaerobik çürütme sürecinin daha derinlemesine anlaşılmasını ve sürecin optimizasyonunu sağlar, potansiyel iyileştirme noktalarını belirler (Esvap ve ark., 2021).

Dinamik FBA (dFBA), mikrobiyal toplulukların metabolik aktivitelerini ve zamanla nasıl değiştiklerini anlamak için kullanılan güçlü bir matematiksel modelleme yaklaşımıdır (Gomez ve ark., 2014). Mikrobiyal topluluklar, çeşitli mikroorganizmaların karmaşık etkileşimlerini içerir ve bu toplulukların metabolik davranışlarını anlamak, ekosistem sağlığı ve biyoteknoloji uygulamaları için kritik öneme sahiptir (Orth ve ark., 2010).

1.4. dFBA'nın Önemi

1. **Zaman Bağımlı Analiz:** dFBA, metabolik faaliyetlerin zaman içinde simüle edilmesine olanak tanıyarak mikrobiyal topluluk dinamiklerinin kademeli veya ani olarak değişen koşullar altında modellenmesini mümkün kılar. Zamana duyarlı bu yaklaşım, sabit koşulları varsayan geleneksel FBA'ya kıyasla değerleri daha iyi yansıtır (Karlsen ve ark., 2023). Bir çalışmada, dFBA kullanılarak *E. coli*'nin zaman içinde büyümesi ve besin maddelerini (glukoz ve ksiloz) tüketmesi izlenmiştir. (Gomez ve ark., 2014)

2. **Çevresel ve Biyolojik Değişkenlik:** Mikrobiyal topluluklar, besin kaynaklarının tükenmesi, atık birikimi ve diğer çevresel değişikliklere sürekli tabidir.

Organizmaların bu değişimlere nasıl tepki verdiğini simüle ederek bu değişkenleri yakalar ve metabolik uyumluluğu hakkında bilgi sağlar (Karlsen ve ark., 2023). Bir çalışmada dFBA kullanılarak E. coli'nin tek kültür ortamında nasıl büyüdüğü simüle edilmiştir. Örnekte glikoz ve ksiloz gibi besin maddelerinin tüketimi izlenmiştir. Bu model, farklı simülasyon yöntemlerinin hızını ve doğruluğunu karşılaştırarak dFBA'nın avantajlarını ortaya koymaktadır (Gomez ve ark., 2014).

3. **Ekosistem Etkileşimleri:** dFBA, farklı mikrobiyal türler arasındaki etkileşimleri ve rekabeti de hesaba katabilir. Bu, mikrobiyal toplulukların yapısal ve işlevsel organizasyonunu daha iyi anlamamıza yardımcı olur (Karlsen ve ark., 2023).

Yapılan bir çalışmada, mikro alg ve maya'nın birlikte yaşadığı bir ortamda, sürekli karıştırılmalı tank reaktöründe (CSTR) simüle edilmiştir. Genom ölçekli metabolik ağlar kullanılarak her iki türün metabolik faaliyetleri modellenmiş ve dFBA'nın farklı organizmaların birlikte var olma dinamiklerini nasıl ele aldığı gösterilmiştir (Gomez ve ark., 2014).

1.5. MATLAB ve COBRA Araç Kutusu

MATLAB ve COBRA araç kutusu kullanılarak yapılan dFBA simülasyonları, mikrobiyal toplulukların zaman içindeki metabolik değişimlerini anlamada ve bu bilgileri çevresel yönetim, sağlık ve biyoteknoloji gibi alanlarda uygulamada kritik rol oynar. Bu araçlar, mikrobiyal ekosistemlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, mikrobiyal biyoteknoloji ve çevre bilimindeki yeniliklere katkıda bulunur. MATLAB, Gelişmiş Matematiksel İşlevler, Araç kutusu Desteği, Modelleme ve Simülasyon, Grafik ve Görselleştirme, Entegrasyon ve Otomasyon gibi birçok özelliğe sahip bir programlama dilidir (Gomez ve ark., 2014).

1. **Gelişmiş Matematiksel İşlevler:** MATLAB, lineer cebir, diferansiyel denklemler, istatistik ve diğer matematiksel işlemler için kapsamlı bir araç seti sunar. Bu özellikler, metabolik ağların analizi ve simülasyonu için gerekli karmaşık hesaplamaları kolaylaştırır.
2. **Araç kutusu Desteği:** MATLAB, biyoinformatik ve sistem biyolojisi gibi alanlarda özelleşmiş işlevler sunan çeşitli araç kutularına sahiptir. Örneğin, COBRA araç kutusu, metabolik modelleme ve analiz için özelleşmiş bir araç setidir ve MATLAB ortamında çalışır.

3. **Modelleme ve Simülasyon:** MATLAB, modelleme ve simülasyon için güçlü araçlar sunar. Bu, metabolik ağ modellerinin kurulması, simülasyonu ve analizi için idealdir.
4. **Grafik ve Görselleştirme:** MATLAB, veri görselleştirme ve grafik çizim konusunda oldukça yeteneklidir. Metabolik modelleme sırasında elde edilen verilerin görselleştirilmesi, modelin anlaşılmasını ve sonuçların sunulmasını kolaylaştırır.
5. **Entegrasyon ve Otomasyon:** MATLAB, diğer programlama dilleri ve yazılımlar ile kolayca entegre edilebilir. Ayrıca, tekrar eden işlemleri otomatikleştirmek için betikler ve fonksiyonlar yazma imkânı tanır.

COBRA araç kutusu ise, hücresel metabolizmanın matematiksel modellenmesi ve analizi için kullanılan bir yazılım aracıdır. MATLAB ortamında çalışan bu araç kutusu, genom ölçekli metabolik ağların yapılandırılmasını, simülasyonunu ve analizini kolaylaştırır. COBRA (Constraint-Based Reconstruction and Analysis) metodolojisine dayanan bu araç, özellikle dinamik FBA (dFBA), ve metabolik ağların optimizasyonu gibi tekniklerle mikrobiyal toplulukların ve hücresel metabolizmanın davranışlarını modellemeye olanak tanır. COBRA araç kutusu biyoteknoloji, biyoinformatik ve sistem biyolojisi alanlarında geniş kullanım alanına sahiptir ve metabolik süreçlerin anlaşılmasını, analizini ve optimizasyonunu sağlamada önemli bir rol oynar (Heirendt ve ark., 2019).

Sonuç olarak, küreselleşen dünyada artan sanayileşme ve kentleşmenin bir yan ürünü olarak ortaya çıkan atık yönetimi sorunu, çevresel sürdürülebilirlik ve ekonomik açıdan büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Bu bağlamda, atık aktif çamur gibi zorlu atıkların yönetimi hem çevresel yüklerin azaltılması hem de enerji üretimi açısından büyük önem taşımaktadır. Anaerobik çürütme, organik atıkların biyogaza dönüştürülmesi yoluyla enerji geri kazanımına olanak sağlayan sürdürülebilir bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır. Bu sürecin etkinliği, mikrobiyal toplulukların kompozisyonu ve işlevselliği ile doğrudan ilişkilidir.

Mikrobiyal toplulukların metabolik faaliyetlerinin daha iyi anlaşılması ve optimize edilmesi, anaerobik çürütme süreçlerinin verimliliğini artırmak için kritik öneme sahiptir. Dinamik metabolik modelleme (dFBA) yöntemleri, bu süreçleri detaylı bir şekilde inceleyerek mikrobiyal etkileşimleri ve biyogaz üretimini etkileyen anahtar metabolik yolları anlamamıza yardımcı olur.

Yapılan alışmalar, anaerobik ürütme sırasında mikroorganizmaların zamana bağlı olarak nasıl davrandığını ve çevresel koşullara nasıl tepki verdiğini matematiksel olarak modelleyerek süreç kontrolü ve optimizasyonu için önemli bir araç sunmaktadır.

Bu alışmada, Firmicutes ve Methanosarcina gibi anaerobik ürütme süreçlerinde rol oynayan mikrobiyal türlerin dinamikleri ve metabolik aktiviteleri, literatürde yer alan önceki araştırmalar ışığında analiz edilmiştir. Özellikle, bu organizmaların biyogaz üretimine katkıları ve çevresel faktörlere olan duyarlılıkları üzerine yapılan değerlendirmeler, atık yönetimde daha verimli sistemlerin tasarlanmasına katkı sağlamaktadır. Metabolik modelleme çalışmalarında kullanılan COBRA araç kutusu ve MATLAB gibi araçlar, mikrobiyal toplulukların davranışlarını daha iyi anlayarak sürdürülebilir atık yönetimi ve enerji üretimi alanlarında yenilikçi çözümler sunmaktadır.

2. YÖNTEM

2.1. Yazılım Kurulumu ve Araçların Yapılandırılması

2.1.1. MATLAB

MATLAB bir programlama dili olup sayısal hesaplamalara yönelik yüksek seviyeli bir geliştirme ortamıdır (Matlab, S., 2012). Bu çalışmada temel analiz platformu olarak MATLAB R2021b kullanılmıştır.

2.1.2. COBRA Araç Kutusu

Bu çalışmada, metabolik ağların yeniden yapılandırılması ve analizi için COBRA araç kutusu kullanılmıştır (Navid A, 2022).

Genom ölçeğindeki biyokimyasal ağları kullanarak çeşitli metabolik fenotipleri modellemek, analiz etmek ve tahmin etmek için yaygın olarak kullanılır. Araştırmada COBRA araç kutusu, özellikle Firmicutes ve Methanosarcina'nın metabolik yollarının ve reaksiyon ağlarının modellenmesi ve analizi için tercih edilmiştir (Heirendt ve ark., 2019).

COBRA Araç Kutusunun kurulumu: COBRA araç kutusuna, GitHub (<https://opencobra.github.io/cobratoolbox/stable/installation.html>) üzerinden erişilebilir. Kurulum işlemi sırasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- GitHub'dan toolbox'ı indirmek için terminalde aşağıdaki komut çalıştırılmıştır:

```
bash
>> git clone https://github.com/opencobra/cobratoolbox.git cobratoolbox
>> cd cobratoolbox
```

- İndirme tamamlandıktan sonra, toolbox dizinine geçilmiştir.

COBRA araç kutusunun çalışabilmesi için gerekli bağımlılıklar MATLAB ortamında yüklenmiştir. Bunun için aşağıdaki MATLAB komutu çalıştırılmıştır:

```
matlab
>> initCobraToolbox ()
```

- Bu komut, toolbox'ın gerekli tüm paketlerini ve eklentilerini indirerek kurulum işlemini tamamlar.

Bu çalışmada kullanılan dFBA modellerini çözümlmek için Gurobi optimizier seçilmiştir. Gurobi solver'ı MATLAB ile entegre edilmiştir. Solver'ın kurulumu ve MATLAB'a eklenmesi adımları ise şöyledir:

- Gurobi'nin resmî sayfasından Gurobi Optimizier indirilip kurulmuştur.
- MATLAB ortamında ise indirdiğimiz solver'ın kullanılabilmesi için gurobi_setup.m dosyası çalıştırılmıştır.

Test Edilmesi: Kurulumun başarılı olduğunu doğrulamak için COBRA araç kutusu içindeki örnek bir model üzerinde test yapılmıştır:

```
matlab
> changeCobraSolver('gurobi', 'all');
```

Bu adımların tamamlanmasıyla birlikte COBRA araç kutusu ve Gurobi optimizier (11.0.0) başarıyla kurulmuş ve dFBA analizlerinde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

2.2. Gurobi Optimizasyon Kurulumu ve Konfigürasyonu

Bu tezde, metabolik ağların optimizasyonu ve analizi için Gurobi optimizier kullanılmıştır. Gurobi, gelişmiş matematiksel programlama çözümleri sağlayan güçlü bir optimizasyon motorudur. MATLAB ve COBRA araç kutusu ile tam bütünleşmiş şekilde çalıştığı, analiz ve simülasyon süreçlerinde büyük veri setlerinin etkili bir şekilde işlenmesini ve karmaşık hesaplamaların hızla yapılmasını mümkün kıldığı için kullanılmıştır.

2.3. Model Oluşturma ve Veri Kaynakları

Metabolik modelleme çalışmalarında iki farklı mikroorganizma modeli kullanılmıştır: Firmicutes ve Methanosarcina_bacteri. Bu organizmalar için genomik modellemeler, sırasıyla Microbiome Atlas ve BiGG veri tabanlarından alınmıştır.

2.3.1. BiGG Veri Tabanı:

BiGG, geniş kapsamlı bir metabolik modelleme veri tabanıdır. BiGG Models, genom ölçeğinde metabolik ağ yeniden yapılandırmalarının bir bilgi tabanıdır (Norsigian ve ark, 2019).

Bu veri tabanından, Methanosarcina barkeri str. Fusaro (iAF692) türüne ait metabolik yollar, reaksiyonlar ve ilişkili genetik bilgiler toplanmıştır.

2.3.2. Microbiome Atlas: Microbiome Atlas, mikrobiyal toplulukların genetik çeşitliliğini ve ekolojik dağılımını kapsayan bir veri tabanıdır (Microbiome atlas, 2024). Firmicutes türünün firmicutes_bacterium_CAG:83 (Msp_0477) suşunun genetik yapısı ve metabolik özellikleri bu veri tabanından elde edilmiştir.

Her iki model de ilgili veri tabanlarından indirilen genom ölçekli modeller kullanılarak MATLAB ortamında uygun formatlara dönüştürülmüş ve analizler için hazır hale getirilmiştir.

2.4. Dinamik FBA (dFBA): dFBA, mikroorganizmaların büyüme ve metabolizma hızlarını, besin maddelerinin tükenmesini ve atık ürünlerin birikimini zamanla modellemesi için kullanılmıştır. Bu yöntem, özellikle büyüme ve metabolizma üzerine çevresel faktörlerin ve genetik değişikliklerin etkilerini anlamak için değerlidir. Ayrıca dFBA, COBRA araç kutusu içerisinde yer alan bir fonksiyondur.

2.5. dFBA Uygulaması

2.5.1. Model Kurulumu: dFBA uygulaması, metabolik modelin belirlenen başlangıç koşullarına dayanarak başlamıştır. Model, organizmanın reaksiyonları ve bu reaksiyonlarda yer alan metabolitlerle tanımlanmıştır.

2.5.2. Zaman Adımları: Bu çalışma kapsamında, her bir zaman adımında model simülasyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla MATLAB yazılımında bir döngü kullanılmıştır. 50 kez tekrarlan ve 10 zaman adımını boyunca devam eden bu simülasyon sonucunda her stepte verilen değerler alınır.

2.5.3. Çevresel ve Biyolojik Değişiklikler: Her bir zaman diliminde, besin maddelerinin tükenmesi, metabolit birikimi veya genetik değişiklikler gibi faktörler sebebiyle hücre dışı Sulfate, LAlanine, LArginine, LMethionine, Spermidine, meoh_e, so3_e, h2_e, so4_e, ac_e metabolit konsantrasyonları, substratlar ve biyokütle sonuçlarında değişimler gözlemlenmiştir. Bu değişimler ise modelin sonraki adımlarının başlangıç koşullarını etkilemiştir.

2.5.4. Sonuçların Analizi: Elde edilen zaman serisi verileri, mikroorganizmanın metabolik tepkilerinin ve adaptasyonlarının detaylı bir görünümünü sağlamıştır. Bu veriler, mikrobiyal büyüme dinamikleri, metabolit üretim hızları ve çevresel değişikliklere biyolojik yanıtlar hakkında bilgi verir.

2.6. Kullanılan Dinamik Akı Denge Analizi (dFBA) Parametreleri

COBRA araç kutusunda dFBA fonksiyonları için aşağıdaki parametreler tanımlanmıştır (*The COBRA toolbox*, 2024):

[concentrationMatrix, excRxnNames, timeVec, biomassVec] = dynamicFBA (model, substrateRxns, initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps)

2.6.1. Girdiler

Modeller, BiGG ve Microbiome atlas veri tabanlarından elde edilmiştir. **SubstrateRxns**, ortamda bulunan substratların tüketilmesini veya salınmasını sağlayan değişim reaksiyonlarını içerir. Her bir substrat için başlangıç konsantrasyonları **InitConcentrations** olarak belirlenir ve modelin başında organizmanın biyokütlesini temsil eden **InitBiomass** değeri tanımlanır. **TimeStep**, simülasyonun ne kadar hassas bir zaman aralığında hesaplandığını gösterirken, **nSteps** simülasyonun ne kadar süreceğini belirler.

2.6.2. Çıktılar

Simülasyonun sonunda elde edilen sonuçlar, belirli bir zaman dilimi boyunca hücre dışı metabolitlerin konsantrasyonlarını gösteren **concentrationMatrix** olarak kaydedilmiştir. Bu matriste, ortamda bulunan ve değişim reaksiyonlarına giren metabolitler yer almıştır. **excRxnNames**, Enzim Komisyonu (EC) metabolitleri için tanımlanmış değişim tepkimelerini içerir. Simülasyonun hangi zaman noktalarında gerçekleştirildiğini gösteren **timeVec**, simülasyon süresini izlemek için kullanılmıştır. Son olarak, organizmanın zaman içindeki biyokütle artışını gösteren **biomassVec** ile biyokütle büyümesi gözlemlenmiştir.

2.7. Başlangıç Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan dFBA simülasyonlarında her iki organizma için de başlangıç biyokütle değerleri 0,1 gDW ve dış metabolit konsantrasyonları 10 mM belirlenmiştir.

2.7.1. Başlangıç Biyokütle Değerleri

Her iki organizma içinde başlangıç biyokütle değeri **0,1 gDW** olarak belirlenmiştir. Başlangıç biyokütle değerinin 0,1 olarak belirlenmesi, çalışmamdaki biyokütle değerlerini daha net bir şekilde gözlemlemeyi amaçlamıştır. Daha önceki yapılan çalışmalarda düşük bir başlangıç değeri olan 0,01 kullanılmıştır bu da biyokütlerdeki artışların daha yavaş ve az belirgin olduğunu göstermiştir. Çalışmamda, 0,1 gibi bir başlangıç değeri tercih etmek, elde edilen sonuçların daha anlaşılır ve ölçülebilir olmasını sağlamıştır.

2.7.2. Başlangıç Metabolit Konsantrasyonları

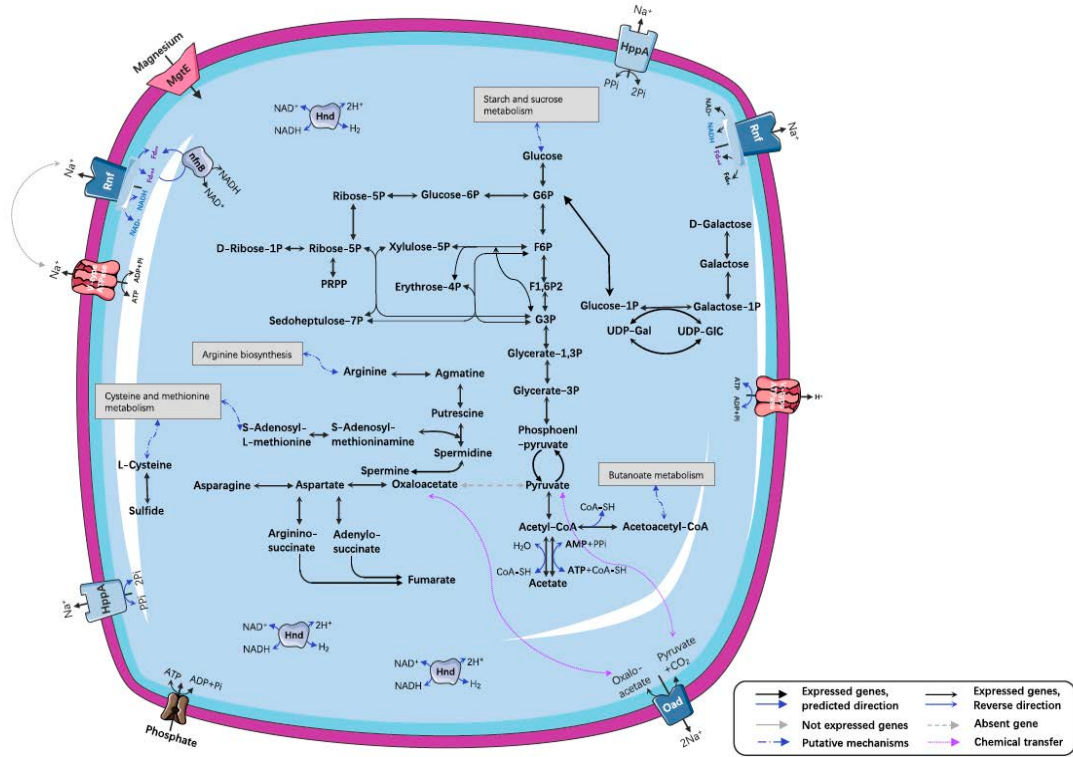
Her bir metabolit için modelde kullanılan başlangıç konsantrasyonları, bu çalışmada önceki çalışmalardan E. coli modeli için yapılan simülasyonlarda başlangıç konsantrasyonu literatürle uyumlu bir şekilde 10 mM olarak kabul edilmiştir (Hinton, 2015)

2.8. Substrat Reaksiyonlarının Seçimi

Bu tezde kullanılan substrat reaksiyonlar (substrateRxns), Shi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sunulan metabolik yolların görsel analizlerinden yola çıkılarak belirlenmiştir. İki farklı organizma için substrat girişleri, makalede yer alan metabolik yolu şemalarındaki ortam giriş noktalarının detaylı incelenmesi sonucunda seçilmiştir.

2.8.1.Firmicutes için belirlenen substrat reaksiyonları

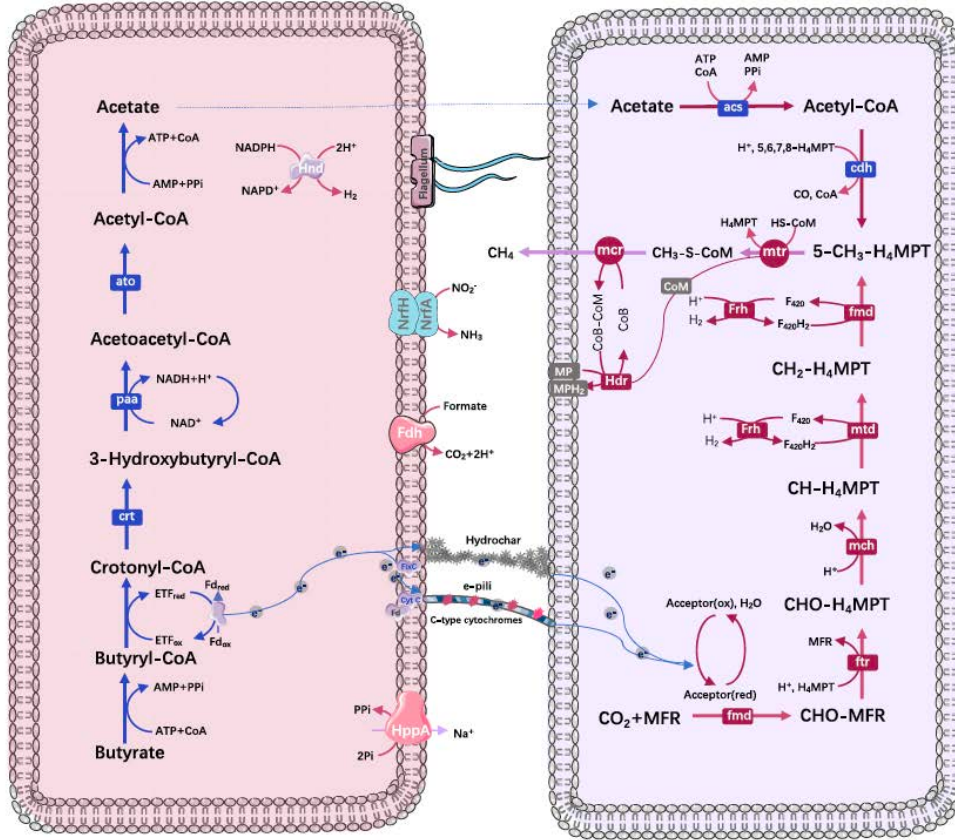
Firmicutes metabolik yolundan yola çıkarak, amino asitler ve diğer önemli bileşiklerin alımını temsil eden ‘Alanine’, Arginine’, ‘Methionine’, ‘Spermidine’, ve ‘Sulfate’ metabolitleri belirlenmiştir (Şekil 1.).



Şekil 1. Firmicutes bakterisinin metabolizmasını ve amino asit biyosentezini temsil etmektedir (Shi ve ark., 2021)

2.8.2.Methanosarcina için belirlenen substrat reaksiyonları

Methanosarcina için, aynı makalede (Shi ve ark., 2021) yer alan Methanosarcina'nın enerji metabolizması ve karbon döngüsüne ilişkin şemalardan yola çıkarak, Methanol, Hidrojen, Acetate, sülfat ve sülfat metabolitleri belirlenmiştir (Şekil 2.).



Şekil 2. Fermantatif bir bakteri olan Syntrophomonas (sol) ile metanojenik bir arke olan Methanosarcina (sağ) arasındaki madde geçişlerini temsil ediyor. (Shi ve ark., 2021).

2.9. Çalışmada Kullanılan dFBA Kodları

İlk aşamada, her iki organizma için hücre dışı metabolitler adına başlangıç konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar, metabolik modelde kullanılan substratların başlangıç değerlerini temsil etmekte olup, aşağıda belirtilmiştir:

IC_Ex_Sulfate, IC_Ex_LAlanine, IC_Ex_LArginine, IC_Ex_LMethionine, IC_Ex_Spermidine, IC_EX_meoh_e, IC_EX_so3_e, IC_EX_h2_e, IC_EX_so4_e, IC_EX_ac_e: Her bir metabolit için başlangıç konsantrasyonu 10 mM olarak tanımlanmıştır.

İkinci aşamada, her iki organizma için başlangıç biyokütle değerleri belirlenmiştir. Biyokütle büyümesinin net bir şekilde gözlemlenebilmesi amacıyla başlangıç biyokütlesi 0,1 gDW olarak belirlenmiştir: Biomass_fl: 0.1, Biomass_ml: 0.1.

for t=1:50

Bu çalışmada, dinamik simülasyonların her bir zaman adımı boyunca modelin davranışını inceleyebilmek amacıyla, model 50 zaman adımlık döngü içinde analiz edilmiştir. Her bir döngüde değişken t, 1'den 50'ye kadar artan bir şekilde güncellenmiş ve her adımda modelin çıktıları kaydedilmiştir. Bu işlem 10 kez tekrarlanarak, simülasyon sonuçlarının tutarlılığı ve güvenilirliği test edilmiştir. Yöntem kısmında belirtilen dFBA parametleri kullanılarak her bir metabolit için güncel değerler alınır.

Firmicutes için dFBA Analizi:

Firmicutes türü için yapılan dFBA (dinamik metabolik akış analizi) simülasyonunda, zaman içerisindeki metabolit değişimleri ve biyokütle artışı hesaplanmıştır. Bu simülasyonda, Ex_Sulfate, Ex_LAlanine, Ex_LArginine, Ex_LMethionine, ve Ex_Spermidine metabolitleri başlangıç konsantrasyonları ile birlikte modele dahil edilmiştir. Simülasyon sırasında her bir metabolitin zaman içerisindeki tüketimi, belirlenen başlangıç konsantrasyonları ve hesaplanan değerler ile aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

Ex_Sulfate_fl: IC_Ex_Sulfate değerinden zaman içerisindeki değişim çıkarılarak hesaplanmıştır.

$$> \text{Ex_Sulfate_fl} = \max(0, \text{IC_Ex_Sulfate} - \text{concentrationMatrix_fl}(x,y));$$

Ex_LAlanine, Ex_LArginine, Ex_LMethionine, ve Ex_Spermidine metabolitlerinin her biri için de aynı yöntem kullanılarak tüketim hesaplanmıştır.

Her bir metabolit için bu hesaplamalar, dinamik metabolik modellemede simülasyon boyunca metabolitlerin nasıl tüketildiğini gösterir. Biyokütle artışı ve metabolit tüketimi arasındaki ilişki zamanla takip edilmiştir.

Methanosarcina için dFBA Anazili:

Methanosarcina türü için yapılan dFBA simülasyonunda ise Ex_meoh_e, EX_so3_e, EX_h2_e, EX_so4_e ve EX_ac_e metabolitleri modelde değerlendirilmiştir. Bu metabolitlerin zaman içerisindeki tüketimi de benzer şekilde hesaplanmıştır.

EX_meoh_e_m1: IC_EX_meoh_e değerinden zaman içindeki değişim çıkarılarak hesaplanmıştır.

$$> EX_meoh_e_m1 = \max(0, IC_EX_meoh_e - concentrationMatrix_m1(x,y));$$

Diğer her bir metabolit için bu denklem kullanılarak başlangıç konsantrasyonlarından hareketle zaman içindeki değişimler hesaplanmıştır.

2.10. Sonuçların Analizi ve Yorumlanması

Yapılan dFBA simülasyonlarının analiz ve yorumlama aşamaları, her iki organizmanın farklı metabolik davranışlarını belirlemek için kritik öneme sahiptir. Firmicutes ve Methanosarcina organizmaları için yapılan simülasyonlar ile, zaman içerisindeki metabolit tüketimlerini ve biyokütle artışlarını gözlemlenmiştir.

Simülasyonlar sırasında kullanılan hücre dışı metabolitlerin (Ex_Sulfate, Ex_LAlanine, Ex_LArginine, Ex_LMethionine, Ex_Spermidine vb.) başlangıç konsantrasyonları ile başlatılmış ve 10 zaman adımı boyunca bu metabolitlerin tüketimi hesaplanmıştır. Aynı şekilde, biyokütle değişimide her zaman adımında izlenmiştir.

Bu dBFA simülasyonu ile elde edilen veriler, iki organizmanın anaerobik sindirim süreçlerindeki rolünü daha iyi anlamamızı sağlamış ve simülasyonlar boyunca metabolik değişimlerin sürekli olarak izlenmesi, organizmaların çevresel koşullara uyum sağlama kapasitelerini göstermiştir.

Simülasyon sonuçları MATLAB ortamında düzenli aralıklarla kaydedilmiş ve her bir zaman adımında metabolit tüketim profilleri, biyokütle artışı ve model performansı detaylı olarak analiz edilmiştir.

3. SONUÇ

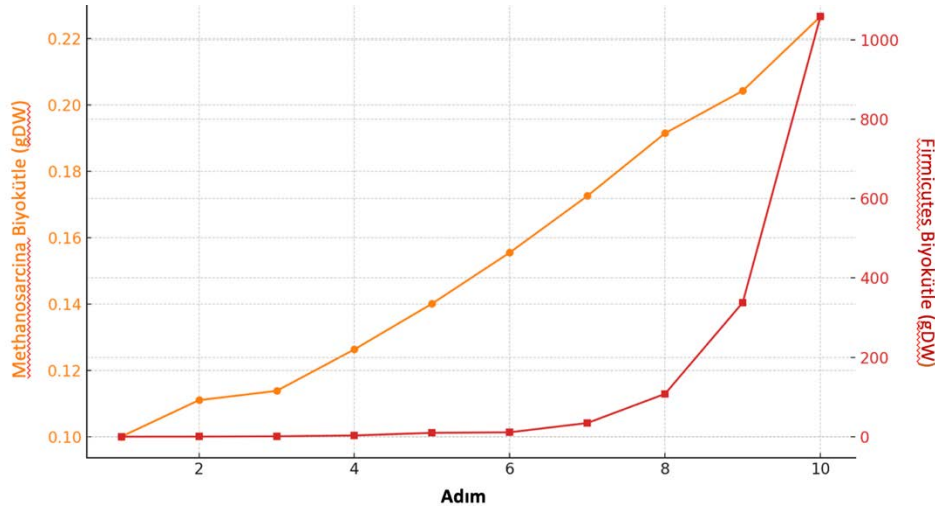
Bu çalışmada kullanılan dinamik akı denge analizi metabolik modelleme yaklaşımıyla, Methanosarcina ve Firmicutes mikroorganizmaların biyokütle artışları ve metabolit tüketimi analiz edilmiştir.

3.1.Methanosarcina ve Firmicutes'in Biyokütle Artışları

Methanosarcina ve Firmicutes organizmalarının dinamik metabolik modelleme (dFBA) yöntemi ile biyokütle artışları değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar tablo (Tablo1.) ve grafikte (Şekil 3.) gösterilmiştir.

Tablo 1. Methanosarcina ve Firmicutes organizmalarının 10 adım boyunca biyokütle değerlerindeki değişim

Adım	Methanosarcina	Firmicutes
1	0.1000	0.1000
2	0.1110	0.3133
3	0.1138	0.9817
4	0.1263	3.0759
5	0.1401	9.6376
6	0.1555	10.9878
7	0.1726	34.4276
8	0.1915	107.8706
9	0.2043	337.9866
10	0.2267	1059



Şekil 3. Methanosarcina ve Firmicutes organizmalarının biyokütle artışının 10 adımda değişim grafiği

Bu çalışmada, Methanosarcina bakteri ve Firmicutes mikroorganizmalarının biyokütlesindeki artışın nasıl değiştiği incelenmiştir (Tablo 1.).

Grafikte görüldüğü gibi (Şekil 3.), Methanosarcina'nın biyokütle artışı zamanla kademeli ve daha yavaş bir seyir izlemektedir. Başlangıçta 0,1000 olarak belirlenen biyokütle değeri, son zaman noktasında 0,2267'ye kadar çıkmıştır. Bu artış, metanojenik organizmaların enerji üretimi bakımından düşük verimliliğiyle ilişkilendirilebilir (Gilmore, 2017).

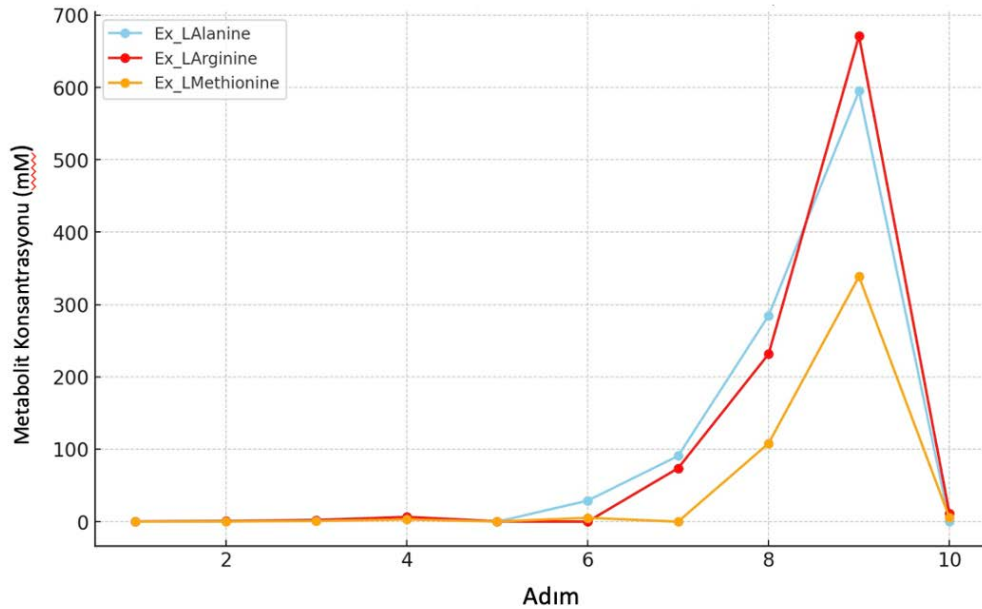
Diğer yandan, Firmicutes'in biyokütle artışı oldukça hızlı ve dikkat çekicidir. İlk adım noktalarında biyokütle artışı sınırlı olmakla birlikte, özellikle 6. ve 10. adımlar arasında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Başlangıçta 0,1000 olan biyokütle değeri, 10. adımda 1059,0'a ulaşmıştır. Bu hızlı artış, fermantatif metabolik yollar kullanarak enerji üretme kapasitesinin yüksekliğiyle açıklanabilir. (Jouhten, 2008).

3.2.Firmicutes Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi

Firmicutes organizmasının hücre dışı LAlanine, LArginine ve LMethionine metabolitlerinin konsantrasyon değişimi 10 adım boyunca gösterilmiştir (Tablo 2.).

Tablo 2. Firmicutes organizmasının Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimleri.

Adım	Ex_Lalanine	Ex_Larginine	Ex_Lmethionine
1	0.26	0.21	0.10
2	0.83	0.67	0.31
3	2.59	2.1	0.98
4	6.32	6.6	3.08
5	0	0.4	0.23
6	28.99	0	5.28
7	90.83	73.91	0
8	284.60	231.51	108.12
9	594.99	671.11	338.79
10	0	11	5.37



Şekil 4. Firmicutes organizmasının Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.

Firmicutes'in metabolik modelleme analizinde, hücre dışı metabolitlerin değişimlerine dair Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine konsantrasyon değişiklikleri on zaman noktası boyunca izlenmiştir (Şekil 4.).

İlk olarak, 1. adım noktasında Ex_LAlanine (0,26 mM), Ex_LArginine (0,21 mM) ve Ex_LMethionine (0,10 mM) oldukça düşük konsantrasyonlar göstermiştir. 2. adım noktasında, Ex_LAlanine (0,83 mM), Ex_LArginine (0,67 mM) ve Ex_LMethionine (0,31 mM) için orta seviyede bir artış gözlemlenmiştir. 3. ve 4. adımlar arasında, özellikle Ex_LAlanine (2,59 mM'den 6,32 mM'ye) ve Ex_LArginine (2,1 mM'den 6,6 mM'ye) için önemli bir konsantrasyon artışı meydana gelmiştir. Bu durum, başlangıçtaki metabolik aktivitenin hızlanmasına işaret etmektedir. Bu süreçte Ex_LMethionine konsantrasyonundaki artış ise daha yavaş olmuştur (0,98 mM'den 3,08 mM'ye) (Şekil 4.).

5.adımda, Ex_LAlanine konsantrasyonu sıfıra (0 mM) düşerken, Ex_LArginine (0,4 mM) ve Ex_LMethionine (0,23 mM) düşük seviyelerde kalmıştır. Bu, alanin tüketiminde bir değişiklik veya çevresel faktörlerin etkisi olabileceğini göstermektedir. 6. adımda ise Ex_LAlanine (28,99 mM) ve Ex_LMethionine (5,28 mM) için ani bir artış gözlemlenmiş, Ex_LArginine konsantrasyonu ise sıfıra düşmüştür (Şekil 4.).

En önemli zirveler, tüm metabolitler için 9. adımda gözlemlenmiştir: Ex_LAlanine (594,99 mM), Ex_LArginine (671,11 mM) ve Ex_LMethionine (338,79 mM). Bu, simülasyon sırasında elde edilen en yüksek konsantrasyon seviyeleridir ve büyük bir metabolik birikim aşamasını göstermektedir. Bununla birlikte, 10. adımda gelindiğinde, Ex_LAlanine tekrar sıfıra (0 mM) düşmüş, Ex_LArginine önemli ölçüde 11 mM'ye, Ex_LMethionine ise 5,37 mM'ye gerilemiştir. Bu düşüşler, muhtemelen metabolitlerin tüketimi veya bozulması ile ilgili olabilir (Şekil 4.).

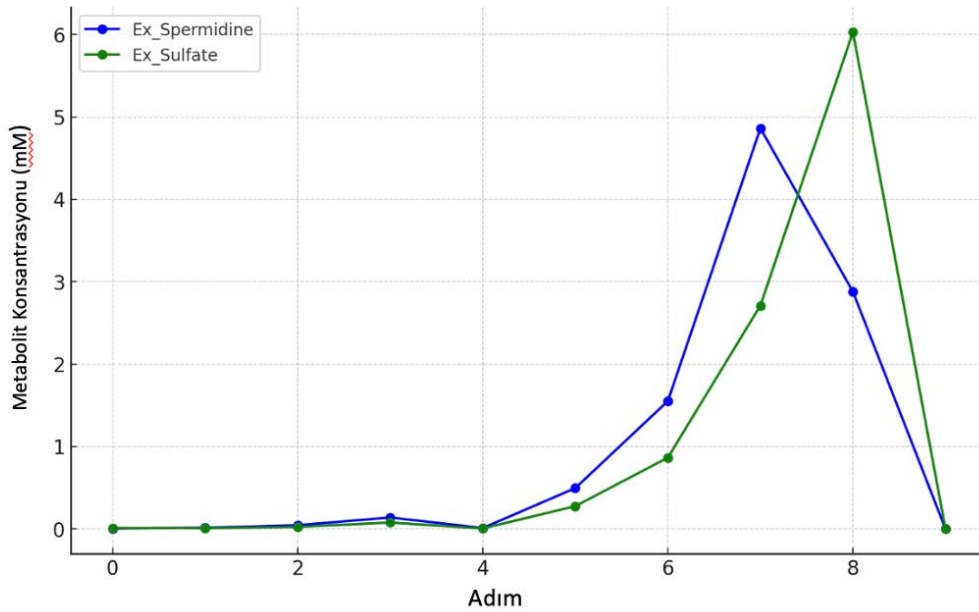
Ex_LAlanine ve Ex_LArginine'in senkronize bir şekilde hareket ettiği, her ikisinin de hızlı artışlar ve zirveler yaşadığı, ardından son zaman noktasına kadar keskin bir düşüş gösterdiği net bir şekilde görülmektedir. Ex_LMethionine ise benzer bir eğilim izlemekle birlikte, daha düşük konsantrasyonlarda seyretmiştir (Şekil 4.).

3.3.Firmicutes Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi

Firmicutes organizmasının hücre dışı Spermidine ve Sulfate metabolitlerinin 10 zaman adımı boyunca konsantrasyon değişimi gösterilmiştir (Tablo 3.).

Tablo 3. Firmicutes organizmasının Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimleri.

Adım	Ex_Spermidine	Ex_Sulfate
1	0.0045	0.010
2	0.0141	0.008
3	0.0443	0.025
4	0.1387	0.077
5	0.0104	0.006
6	0.4953	0.276
7	1.5519	0.865
8	4.8625	2.711
9	2.8783	6.030
10	0.0000	0



Şekil 5. Firmicutes organizmasının Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate metabolitlerinin 10 adım boyunca konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.

1. adımda Ex_Spermidine (0,0045 mM) ve Ex_Sulfate (0,010 mM) çok düşük seviyelerde ölçülmüştür. Bu metabolitlerin düşük başlangıç değerleri, organizmanın metabolik aktivitesinin ilk aşamalarında olduğunu işaret etmektedir (Şekil 5.)

2. adımda hafif bir artış gözlemlenmiş ve Ex_Spermidine 0,0141 mM, Ex_Sulfate ise 0,008 mM seviyesine yükselmiştir. İlk dört adım boyunca metabolitlerin artışı oldukça yavaş gerçekleşmiştir; Ex_Spermidine için 4. adımda 0,1387 mM, Ex_Sulfate için 0,077 mM'lik değerler kaydedilmiştir (Şekil 5).

5. adımda Ex_Spermidine'de önemli bir azalma gözlemlenmiş ve konsantrasyon 0,0104 mM'ye düşmüştür. Ex_Sulfate için ise çok küçük bir azalma (0,006 mM) kaydedilmiştir. Bu düşüşler, metabolitlerin muhtemelen hücre içinde hızlı bir şekilde tüketildiğine işaret edebilir. Ancak 6. adım noktasında her iki metabolit için de dramatik bir artış gözlenmiştir: Ex_Spermidine 0,4953 mM, Ex_Sulfate ise 0,276 mM seviyelerine ulaşmıştır (Şekil 5.).

7. ve 8. adımlarda Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate konsantrasyonları sırasıyla 1,5519 mM ve 4,8625 mM ile 0,865 mM ve 2,711 mM seviyelerine ulaşarak zirve yapmıştır. Bu artış, metabolit birikiminin hızlandığını ve hücresel metabolizmanın bu zaman diliminde daha aktif hale geldiğini göstermektedir. Ancak 9. adımda, Ex_Spermidine konsantrasyonu 2,8783 mM'ye düşerken Ex_Sulfate 6,030 mM'ye yükselmiştir. Son adım olan 10'da ise her iki metabolit konsantrasyonu tamamen tükenmiş ve 0 mM seviyesine düşmüştür (Şekil 5.).

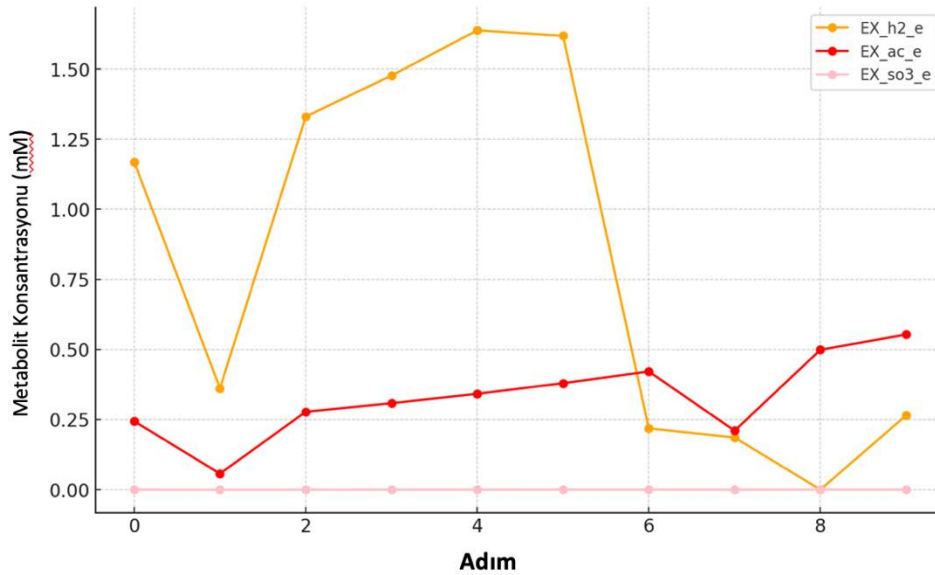
Her iki metabolitin de önce yavaş bir artış gösterdiği, ardından hızlı birikim ve sonunda hızlı tüketim yaşadığı açıkça görülmektedir (Şekil 5.).

3.4.Methanosarcina EX_h2_e (Hidrojen), EX_ac_e (Asetat) ve EX_so3_e (sülfit) Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi

Methanosarcina organizmasının hücre dışı h2_e (hidrojen), ac_e (asetat) ve so3_e (sülfit) metabolitlerinin konsantrasyon değişimi 10 adım boyunca gösterilmiştir (Tablo 4.).

Tablo 4. Methanosarcina organizmasının EX_h2_e, EX_ac_e ve EX_so3_e metabolitlerinin 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimleri.

Adım	EX_h2_e	EX_ac_e	EX_so3_e
1	1,1694	0,2441	0,00020518
2	0,3614	0,0570	0,000057678
3	1,3308	0,2778	0
4	1,4770	0,3083	0,00031598
5	1,6384	0,3420	0,00035050
6	1,6185	0,3796	0,00038903
7	0,2185	0,4213	0,00041381
8	0,1860	0,2103	0,00020836
9	0	0,4987	0,00051112
10	0,26511	0,5534	0,00056716



Şekil 6. Methanosarcina organizmasının EX_h2_e, EX_ac_e ve EX_so3_e metabolitlerinin 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.

1. adımda EX_h2_e, diğer iki metabolite göre en yüksek konsantrasyona sahipti (1,1694 mM), EX_ac_e (0,2441 mM) ve EX_so3_e (0,00020518 mM) ise oldukça düşük seviyelerdeydi. 2. adımda EX_h2_e (0,3614 mM) ve EX_ac_e (0,0570 mM) düşüş gösterirken EX_so3_e ise hafif bir artış gösterdi (0,000057678 mM). 3. adımda, EX_h2_e konsantrasyonu yeniden artarak 1,3308 mM seviyesine ulaşmıştır. EX_ac_e ve EX_so3_e ise küçük oranlarda artmaya devam etmiştir (Şekil 6.)

4.ve 5. adımlarda EX_h2_e konsantrasyonu zirve yaparak sırasıyla 1,4770 mM ve 1,6384 mM seviyelerine ulaşmıştır. Bu dönemde EX_ac_e (0,3420 mM) ve EX_so3_e (0,00035050 mM) yavaş ama istikrarlı bir artış göstermeye devam etmiştir. 6. zaman adımında, EX_h2_e ve EX_ac_e benzer konsantrasyon seviyelerinde kalırken (1,6185 mM ve 0,3796 mM), EX_so3_e hafif bir artışla 0,00038903 mM seviyesine yükselmiştir (Şekil 6.).

7. ve 8. adımlarda, EX_h2_e konsantrasyonu ani bir düşüş göstererek 0,2185 mM'ye kadar inmiş, ancak EX_ac_e ve EX_so3_e konsantrasyonları artış göstermeye devam etmiştir. EX_ac_e, 8. zaman adımında 0,4213 mM seviyesine ulaşmıştır. 9. adımda EX_h2_e tamamen tükenmiş ve EX_ac_e 0,4987 mM ile en yüksek seviyesine ulaşmıştır. EX_so3_e ise 0,00051112 mM ile küçük ama sabit bir artış göstermiştir (Şekil 6.).

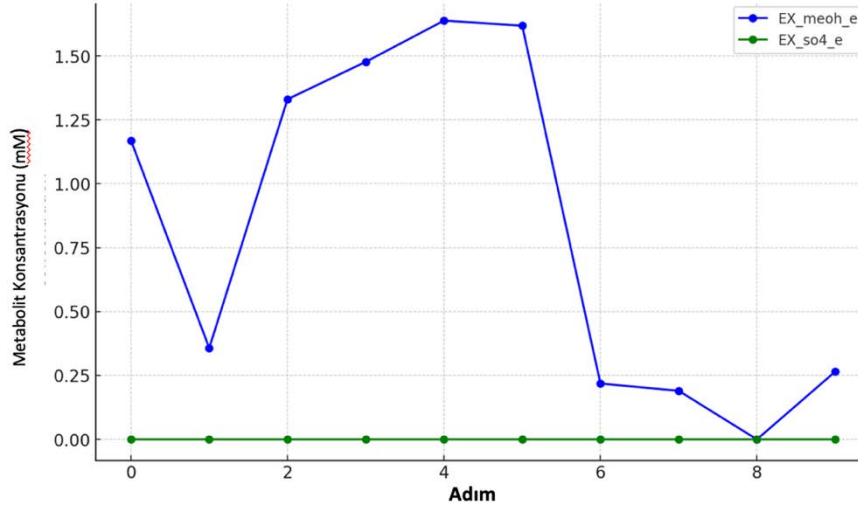
10. adımda ise EX_h2_e yeniden 0,26511 mM seviyesine çıkarken EX_ac_e (0,5534 mM) en yüksek seviyeye ulaşmış, EX_so3_e ise hafif bir artışla 0,00056716 mM seviyesine yükselmiştir. Grafik, EX_h2_e metabolitinin dalgalanma gösterdiğini, EX_ac_e'nin istikrarlı bir artış trendi sergilediğini ve EX_so3_e'nin çok düşük seviyelerde kaldığını göstermektedir (Şekil 6.).

3.5.Methanosarcina EX_meoh_e (Methanol) ve EX_so4_e (Sülfat) Metabolitleri Konsantrasyon Değişimi

Methanosarcina organizmasının hücre dışı meoh ve so4 metabolitlerinin 10 adım da meydana gelen konsantrasyon değişimi gösterilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Methanosarcina organizmasının EX_meoh_e ve EX_so4_e 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimleri.

Adım	EX_meoh_e	EX_so4_e
1	1,1694	0
2	0,3573	0
3	1,3308	0
4	1,4770	0
5	1,6384	0
6	1,6185	0
7	0,2185	0
8	0,1901	0
9	0	0
10	0,26511	0



Şekil 7. Methanosarcina organizmasının EX_meoh_e ve EX_so4_e 10 adım boyunca meydana gelen konsantrasyon değişimlerini gösteren grafik.

1.zaman noktasında, EX_meoh_e 1,1694 mM ile yüksek bir konsantrasyona sahiptir. Buna karşın EX_so4_e (sülfat) 0 mM seviyesinde ölçülmüş, yani başlangıçta sülfat varlığı saptanamamıştır. Zamanla EX_meoh_e konsantrasyonu dalgalı bir seyir izlemiştir (Şekil 7.)

2. zaman noktasında 0,3573 mM'ye düşmüş, ardından 3. ve 4. zaman noktalarında tekrar artarak sırasıyla 1,3308 mM ve 1,4770 mM seviyelerine ulaşmıştır. 5. zaman noktasında ise en yüksek değere ulaşmış (1,6384 mM) ve sonrasında 6. zaman noktasında 1,6185 mM seviyesinde kalmıştır (Şekil 7.).

7. ve 8. zaman noktalarına gelindiğinde, EX_meoh_e konsantrasyonu ciddi bir düşüş göstermiş ve sırasıyla 0,2185 mM ve 0,1901 mM seviyelerine inmiştir. 9. zaman noktasında EX_meoh_e tamamen tükenmiş ve 0 mM olarak kaydedilmiştir. Ancak 10. zaman noktasında yeniden bir miktar artış göstererek 0,26511 mM seviyesine çıkmıştır (Şekil 7.).

EX_so4_e metabolitinin tüm zaman noktalarında sabit bir şekilde 0 mM seviyesinde kalması, bu metabolitin Methanosarcina organizmasında kullanılmadığını veya tespit edilemeyecek kadar düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir (Şekil 7.).

4.TARTIşMA

Methanosarcina ve Firmicutes'in anaerobik sindirim süreçlerindeki rolleri ve metabolik modelleme sonuçları, bu iki organizmanın biyokütle artışları ve metabolik aktiviteleri arasında belirgin farklar olduğunu göstermektedir. Methanosarcina, yavaş bir biyokütle artışı sergileyen bir metanojen olarak dikkat çekmektedir (Carr, 2022). Metanojenler, düşük enerji verimliliğiyle metan üretimi yoluyla enerji kazanırlar. Bu durum, Methanosarcina'nın anaerobik sindirim sürecindeki rolünün daha yavaş, ancak istikrarlı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Carr, 2022). Özellikle atık aktif çamurun anaerobik sindirimi sırasında karbon döngüsüne ve gaz üretimine olan katkısı önemli bir noktadır.

Buna karşılık, Firmicutes hızlı biyokütle artışı sergileyen bir fermantatif organizma olarak ön plana çıkmaktadır (Şekil 3.). Organik maddelerin fermantasyon yoluyla hızlı bir şekilde ayrıştırılması, Firmicutes'in biyokütlesinin kısa sürede ciddi bir artış göstermesine neden olmaktadır. Bu organizma, anaerobik sindirim sırasında organik maddelerin hızlı tüketilmesi ve enerji üretiminin verimli hale gelmesine katkı sağlamaktadır (Chen ve ark., 2016). Özellikle organik madde açısından zengin ortamlarda baskın bir rol oynayabileceği anlaşılmaktadır.

Firmicutes ve Methanosarcina'nın biyokütle artışları arasındaki bu farklar anaerobik sindirim süreçlerine olan katkılarının farklı metabolik stratejilere dayandığını göstermektedir (Şekil 3.), Methanosarcina yavaş büyümesine rağmen sürece istikrarlı bir katkı sunarken, Firmicutes'in hızlı büyümesi, mikrobiyal topluluk dinamiklerini etkileyerek organik maddelerin daha hızlı tüketilmesini sağlamaktadır (Valentin ve ark. 2023).

Ayrıca, Firmicutes tarafından kullanılan Ex_LAlanine, Ex_LArginine ve Ex_LMethionine gibi metabolitlerin konsantrasyon değişimleri, organizmanın amino asit metabolizmasındaki dinamiklerini ortaya koymaktadır (Neis ve ark., 2015). Bu metabolitlerin zamanla gösterdiği dalgalanmalar, özellikle 5. ve 9. zaman noktalarında ani düşüş ve zirve yapmaları, metabolik ağın karmaşık düzenlemelerini ve çevresel koşullara verdiği tepkileri göstermektedir (Şekil 4.). Özellikle amino asit metabolizmasındaki bu tür dalgalanmalar, Firmicutes'in çevresel uyaranlara nasıl adapte olduğunu ve metabolik akışlarını nasıl optimize ettiğini anlamak açısından önemlidir.

Firmicutes'in Ex_Spermidine ve Ex_Sulfate metabolitleri üzerindeki dinamik değişimleri, hücresel büyüme ve adaptasyon süreçlerine dair ipuçları vermektedir. İlk zaman noktalarındaki düşük konsantrasyonlar, hücresel metabolizmanın başlangıç aşamasında (Tablo 3.) daha düşük bir hızda çalıştığını gösterirken, ilerleyen zamanlardaki artışlar, hücrelerin dış metabolitlerden yararlanmaya başladığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.). Özellikle Ex_Spermidine'in zirve yaptığı noktalar, hücre zarı stabilizasyonu ve stres yanıtlarında bu metabolitin kritik rol oynadığını düşündürmektedir (Kaiser, 2023). Ex_Sulfate'in ise daha sabit bir artış göstermesi, sülfat metabolizmasının farklı biyosentetik yollarla ilişkili olabileceğini göstermektedir (Lv ve ark. 2015), (Şekil 5).

Methanosarcina'nın EX_h2_e, EX_ac_e ve EX_so3_e metabolitlerine yönelik tepkileri, bu organizmanın anaerobik süreçte enerji üretiminde kullandığı farklı substratlara olan bağımlılığını yansıtmaktadır (FitzGerald ve ark., 2015). EX_h2_e'nin (Hidrojen) başlangıçtaki yüksek konsantrasyonu (Şekil 6.), Hidrojen, metanojenik arkeler için temel elektron vericilerden biridir (Szuhaaj ve ark.,2023). Methanosarcina türleri, hidrojenotrofik metanogenez adı verilen bir süreçte hidrojeni kullanarak karbondioksiti (CO_2) indirger ve metan (CH_4) üretir. Bu süreç, enerji üretimi için önemlidir ve biyogaz üretimi sırasında etkili bir yoldur (Boone ve ark., 1993).

EX_ac_e (Asetat) metabolitinin ise daha istikrarlı bir artış göstermesi, asetatin hücresel enerji üretiminde sürekli bir kaynak olarak kullanıldığını ve metanogenezis sürecinin ilerleyen aşamalarında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Wang ve ark., 2011).

Methanosarcina, hem hidrojenotrofik hem de asetotrofik metanogenez yapabilen çok yönlü bir metanojen türüdür. Ortamda hidrojen bulunmadığında, asetatı kullanarak metan üretir. Eğer hidrojen mevcutsa, hidrojen ve karbondioksiti kullanarak metan sentezler. Bu adaptasyon yeteneği, Methanosarcina'nın farklı ekosistemlerde hayatta kalmasını sağlar ve biyogaz üretimi gibi süreçlerde onu önemli bir oyuncu yapar (Stams ve ark., 2009).

EX_so3_e'nin (Sülfat) ise düşük seviyelerde kalması, bu sistemde ya çok az ya da hiç kullanılmadığını gösterebilir. Methanosarcina, sülfat indirgeyen bakterilerle simbiyotik ilişkiler kurabilir. Bu bakteriler sülfat gibi kükürt bileşiklerini indirgerken, Methanosarcina onların ürettiği hidrojen ve organik asitleri kullanarak metan üretir. Ancak sülfat tipik olarak bu sülfat indirgeyen süreçlerde yer almaz. Sülfatin Methanosarcina için doğrudan metabolik bir rolü bulunmamaktadır. (Stams ve ark., 2005).

EX_meoh_e (Metanol) ve EX_so4_e (Sülfat) metabolitlerinin Methanosarcina üzerindeki etkileri de dikkate değerdir. EX_meoh_e'nin başlangıçtaki yüksek konsantrasyonu (Şekil 7.), metanolün bu organizmanın enerji üretiminde önemli bir substrat olduğunu gösterirken, zaman içindeki dalgalanmalar metanol kullanımının hücresel enerji gereksinimlerine göre değiştiğini ortaya koymaktadır (Welander ve ark., 2005).

EX_so4_e'nin ise tüm zaman diliminde sabit kalması (Şekil 7.), sülfatın metanojenik yollar tarafından fazla kullanılmadığını teyit etmektedir (Lv ve ark. 2015).

Başlangıç metabolit konsantrasyonları 10 mM olarak belirlenmiş olmasına rağmen, simülasyon sonuçları ilk adımda bu değerin altında çıkmıştır. Bunun olası sebeplerinden biri, organizmaların metabolik aktivitesinin simülasyonun ilk adımlarında metabolitleri hızla tüketmesidir. Dinamik Akı Denge Analizi (dFBA) simülasyonlarında, her zaman adımında metabolitlerin tüketimi ve üretimi gerçekleştiğinden, özellikle başlangıçta hücre dışı metabolitlerin tüketilmesi bu düşüşü açıklamaktadır. Ayrıca, modelin başlangıç koşullarındaki zaman adımı hassasiyeti de metabolit seviyelerinin, simülasyonun ilk adımında hemen belirgin bir artış veya azalış göstermemesine yol açmıştır. Bu durum, organizmaların çevresel değişimlere metabolik adaptasyonunu yansıtarak zamanla daha dengeli bir metabolik davranış sergileyeceklerini göstermektedir (Gomez ve ark., 2014; Karlsen ve ark., 2023).

Bu bulgular, anaerobik sindirim süreçlerinin mikrobiyal topluluklar açısından ne kadar karmaşık ve dinamik olduğunu göstermekte ve bu süreçlerde yer alan organizmaların farklı metabolik stratejilerle birbirlerini nasıl tamamladığını anlamamıza yardımcı olmaktadır (Lee ve ark., 2024).

5. KAYNAKÇA

- AA Gündüzalp, S Güven (2016). Atık, Çeşitleri, Atık Yönetimi, Geri Dönüşüm ve Tüketici: Çankaya Belediyesi ve Semt Tüketicileri Örneği.
- Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y. A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C. T., Hassoun, A., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Rusu, A. V., & Aadil, R. M. (2022). Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Alhraishawi, A., & Aslan, Ş. (2022b). Düzenli Depolama Alanlarından Sızıntı Suyunun Mikrodalga Işınlama ile Arıtılmasına Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2), 1122–1149.
- Boone, D.R., Whitman, W.B., Rouvière, P. (1993). Diversity and Taxonomy of Methanogens. In: Ferry, J.G. (eds) Methanogenesis. Chapman & Hall Microbiology Series. Springer, Boston, MA.
- Castellano-Hinojosa, A., Armato, C., Pozo, C., González-Martínez, A., & González-López, J. (2018). New concepts in anaerobic digestion processes: recent advances and biological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5065–5076.
- Chen, S., Cheng, H., Wyckoff, K. N., & He, Q. (2016). Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(6), 771–781.
- De Vrieze, J., Pinto, A. J., Sloan, W. T., & Ijaz, U. Z. (2018). The active microbial community more accurately reflects the anaerobic digestion process: 16S rRNA (gene) sequencing as a predictive tool. *Microbiome*, 6(1).
- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 173–190.
- Esvap, E., & Ulgen, K. O. (2021). Advances in Genome-Scale Metabolic Modeling toward Microbial Community Analysis of the Human Microbiome. *ACS Synthetic Biology*, 10(9), 2121–2137.
- FitzGerald, J. A., Allen, E., Wall, D. M., Jackson, S. A., Murphy, J. D., & Dobson, A. D. W. (2015b). Methanosarcina Play an Important Role in Anaerobic Co-Digestion of the Seaweed Ulva

lactuca: Taxonomy and Predicted Metabolism of Functional Microbial Communities. *PLoS ONE*, 10(11), e0142603.

Gilmore, S. P., Henske, J. K., Sexton, J. A., Solomon, K. V., Seppälä, S., Yoo, J. I., Huyett, L. M., Pressman, A., Cogan, J. Z., Kivenson, V., Peng, X., Tan, Y., Valentine, D. L., & O'Malley, M. A. (2017). Genomic analysis of methanogenic archaea reveals a shift towards energy conservation. *BMC Genomics*, 18(1).

Gomez, J.A., Höffner, K. & Barton, P.I. (2014). DFBAlab: a fast and reliable MATLAB code for dynamic flux balance analysis. *BMC Bioinformatics*, 15, 409.

Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., Haraldsdóttir, H. S., Wachowiak, J., Keating, S. M., Vlasov, V., Magnúsdóttir, S., Ng, C. Y., Preciat, G., Žagare, A., Chan, S. H. J., Aurich, M. K., Clancy, C. M., Modamio, J., Sauls, J. T., Noronha, A., ... Fleming, R. M. T. (2019). Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0. *Nature protocols*, 14(3), 639–702.

Hinton H. S., (2015) *Lesson: dFBA & dRFBABIE 5500/6500* Utah State University H. (n.d.). <https://slideplayer.com/slide/7793309/>

Kaiser, A. (2023). The Role of Spermidine and Its Key Metabolites in Important, Pathogenic Human Viruses and in Parasitic Infections Caused by *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*. *Biomolecules*, 13(5), 803.

Karlsen, E., Gylseth, M., Schulz, C., & Almaas, E. (2023). A study of a diauxic growth experiment using an expanded dynamic flux balance framework. *PLoS ONE*, 18(1), e0280077.

Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME Journal*, 3(11), 1223–1230.

Lee, J., Lee, B. T., Kwon, M. S., & Kim, H. U. (2024). Metabolic modeling of microorganisms involved in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.

Lv, L., Mbadinga, S. M., Wang, L., Liu, J., Gu, J., Mu, B., & Yang, S. (2015). Acetoclastic methanogenesis is likely the dominant biochemical pathway of palmitate degradation in the presence of sulfate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(18), 7757–7769.

- Ma, T., Liu, L., Rui, J., Yuan, Q., Feng, D., Zhou, Z., Dai, L., Zeng, W., Zhang, H., & Cheng, L. (2017). Coexistence and competition of sulfate-reducing and methanogenic populations in an anaerobic hexadecane-degrading culture. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1).
- Matlab, S. (2012). Matlab. *The MathWorks, Natick, MA*, 9.
- Microbiome Atlas. (n.d.). <https://www.microbiomeatlas.org/>
- Narihiro, T., & Sekiguchi, Y. (2007). Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 273–278.
- Navid, A. (2021). A beginner's guide to the COBRA toolbox. *Methods in Molecular Biology*, 339–365.
- Neis, E. P. J. G., Dejong, C. H. C., & Rensen, S. S. (2015). The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients*, 7(4), 2930–2946.
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., & Nghiem, L. D. (2018). Microbial community in Anaerobic digestion System: Progression in Microbial Ecology. In *Energy, environment, and sustainability* (pp. 331–355).
- Norsigian, C. J., Pusarla, N., McConn, J. L., Yurkovich, J. T., Dräger, A., Palsson, B. O., & King, Z. (2019). BiGG Models 2020: multi-strain genome-scale models and expansion across the phylogenetic tree. *Nucleic Acids Research*.
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248.
- Rani, R. U., Kaliappan, S., Kumar, S. A., & Banu, J. R. (2012). Combined treatment of alkaline and disperser for improving solubilization and anaerobic biodegradability of dairy waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 126, 107–116.
- Rani, R. U., Kaliappan, S., Kumar, S. A., & Banu, J. R. (2012b). Combined treatment of alkaline and disperser for improving solubilization and anaerobic biodegradability of dairy waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 126, 107–116.
- Shi, Z., Campanaro, S., Usman, M., Treu, L., Basile, A., Angelidaki, I., Zhang, S., & Luo, G. (2021). Genome-Centric Metatranscriptomics analysis reveals the role of hydrochar in anaerobic digestion of waste activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 55(12), 8351–8361.

- Stams, A. J. M., & Plugge, C. M. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 568–577.
- Stams, A. J., Plugge, C. M., de Bok, F. A., van Houten, B. H., Lens, P., Dijkman, H., & Weijma, J. (2005). Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 52(1-2), 13–20.
- Szuhaj, M., Kakuk, B., Wirth, R., Rákhely, G., Kovács, K. L., & Bagi, Z. (2023). Regulation of the methanogenesis pathways by hydrogen at transcriptomic level in time. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(20), 6315–6324.
- The COBRA toolbox. (n.d.). <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/stable/index.html>, 2024
- TÜRKER M. (2008). ANAEROBK BYOTEKNOLOJ VE BYOGAZ ÜRETİM DÜNYA’DA VE TÜRKİYE’DE ELİMLER, VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES.
- Valentin, M. T., Luo, G., Zhang, S., & Białowiec, A. (2023). Direct interspecies electron transfer mechanisms of a biochar-amended anaerobic digestion: a review. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1).
- Vasilakou, E., Machado, D., Theorell, A., Rocha, I., Nöh, K., Oldiges, M., & Wahl, S. A. (2016). Current state and challenges for dynamic metabolic modeling. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 97–104.
- Wagner, D. (2020). Methanosarcina. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–23.
- Wagner, T., Watanabe, T., & Shima, S. (2018). Hydrogenotrophic methanogenesis. In *Springer eBooks* (pp. 1–29).
- Welander, P. V., & Metcalf, W. W. (2005). Loss of the mtr operon in Methanosarcina blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10664–10669.
- Wu, S., Qu, Z., Chen, D., Wu, H., Caiyin, Q., & Qiao, J. (2024). Deciphering and designing microbial communities by genome-scale metabolic modelling. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 23, 1990–2000.

Zomorodi, A. R., Islam, M. M., & Maranas, C. D. (2014). D-OPTCom: dynamic multi-level and multi-objective metabolic modeling of microbial communities. *ACS Synthetic Biology*, 3(4), 247–257.