



**Review Paper / Derleme Makalesi**

**MOLECULAR TECHNIQUES FOR DETERMINING MICROBIAL  
DIVERSITY IN TREATMENT SYSTEMS**

**Sevgi DEMİREL\***

*Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, ŞANLIURFA*

**Received/Geliş: 17.02.2011 Revised/Düzeltilme: 25.11.2011 Accepted/Kabul: 28.11.2011**

---

**ABSTRACT**

Determination of microbial identification, distribution and treatment mechanism is quite difficult in complex environmental samples with traditional identification methods. Therefore, research in the field of microbial ecology in recent years, new molecular techniques has been developed for this purpose. Among these techniques, cloning and the creation of a gene library, denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent in situ hybridization with DNA probes (FISH) stand out. The application of these molecular methods for the detection of microorganisms in treatment systems is an important step for understanding their roles in the ecosystem.

**Keywords:** Molecular techniques, 16S rDNA, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), fluorescence in situ hybridization (FISH), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RLFP).

**ARITMA SİSTEMLERİNDE MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN  
MOLEKÜLER TEKNİKLER**

**ÖZET**

Geleneksel yöntemlerle karışık türler içeren ortamlardaki (su, atıksu ve çamur v.b) mikrobiyal dağılımın belirlenmesi ve arıtma mekanizmasının anlaşılması oldukça güçtür. Çünkü bu ortamlardan saf kültürler elde etmek zor ve uzun zaman gerektiren süreçlerdir. Bu amaçla, son yıllarda mikrobiyal ekoloji alanındaki araştırmalarla birlikte yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında, klonlama ve gen kütüphanesi oluşturma, denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE) ve DNA problemleriyle floresan yerinde hibritleşme (FISH) gibi moleküler yöntemler ön plana çıkmıştır. Bu yöntemlerin ortaya çıkması ile arıtma sistemlerinde yer alan mikroorganizmaların tespiti ve ekosistemdeki rollerinin anlaşılması için önemli bir adım atılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Moleküler teknikler, 16S rDNA, denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE), floresan in situ hibridizasyon (FISH), çoğaltılmış ribozomal DNA kesim analizi (ARDRA), uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (T-RLFP).

---

**1. GİRİŞ**

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili

---

\* sevgi.demirel@gmail.com, tel: (414) 344 00 20 / 1438

bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [1]. Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile “moleküler mikrobiyal ekoloji” olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan (16S rDNA parçalarının kopyalanması gibi) yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [2].

Bu çalışma arıtma sistemlerindeki mikroorganizmaların tanımlanmasında ve mikrobiyal dağılımın belirlenmesinde kullanılan moleküler biyoloji tekniklerini avantaj ve dezavantajları ile birlikte ele almaktadır. Bu teknikler henüz laboratuvar ölçekli olarak uygulanmaktadır. Yakın gelecekte, tam ölçekli arıtma tesislerinin izlenmesinde ve tasarımında bir araç olarak kullanılması hedeflenmektedir.

## 2. GELENEKSEL TEKNİKLER

Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili geniş bilgi vermektedir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex-situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir.

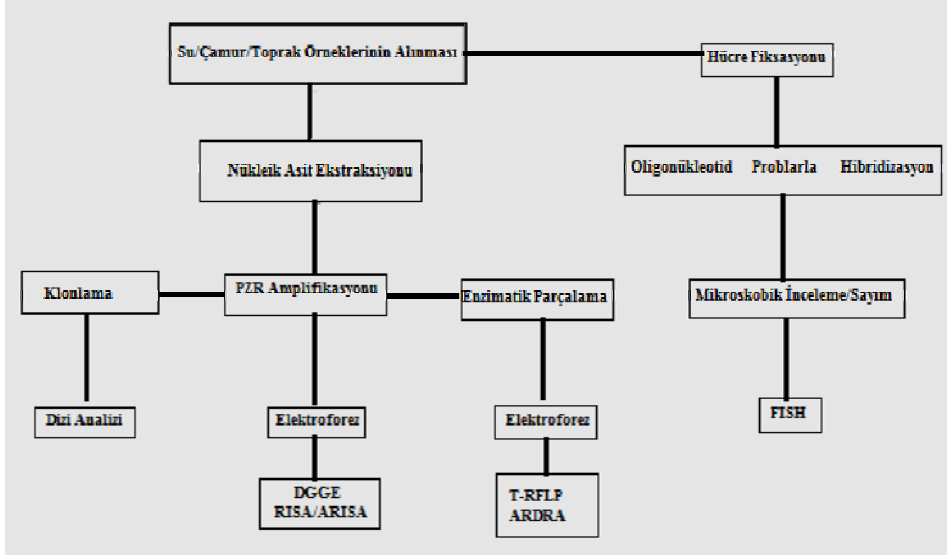
Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı (Bakteri ve arkeler) oldukça azdır ve bakteriyel çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [3,4]. Bununla birlikte, mikroorganizma çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda arıtma sistemlerinde hem arıtma verimini değerlendirmek hem de mikroorganizma gruplarındaki değişimi izleyebilmek için moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır [5].

## 3. MOLEKÜLER TEKNİKLER

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur [6]. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [7]. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir. Ayrıca farklı 16S

gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Moleküler tekniklerin kullanıldığı yöntemler çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Şekil 1. moleküler tekniklerin uygulanmasında kullanılan adımları göstermektedir.



Şekil 1. Moleküler tekniklerin uygulama diyagramı

Atıksu ya da kirletilmiş alanların arıtılmasında rol alan mikrobiyal grupları belirleme ile ilgili çalışmalarda klonlama ve gen kütüphanesi oluşturma, denatürleyici jel elektroforezi (DGGE), floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), ribosomal genlerarası boşluk analizi (RISA, ARISA), çoğaltılmış ribosomal DNA kesim analizi (ARDRA), uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (T-RFLP) gibi birçok yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 1). Bu derleme çalışmasında bu yöntemler, uygulamadaki avantaj ve dezavantajları ile birlikte ele alınmaktadır.

Çizelge 1. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar

<b>Teknik</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Kısıtlamaları</b>	<b>Kullanım örnekleri</b>
<b>Çoğaltılmış ribozomal DNA kesim analizi</b>	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve PCR sapmaları Sayısal değildir.	Aktif çamurda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi
<b>Ribozomal RNA genlerarası boşluk analizi</b>	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. Bakteriler arasındaki mesafe ve dizilemede önemli heterojenlik	DNA ekstraksiyonu ve PCR sapmaları Sayısal değildir. Bakteriler arasındaki mesafe ve dizilemede önemli heterojenlik	Farklı kağıt endüstrisi atıksularında bakteriyel çeşitlilik ve komünite analizi
<b>Denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE)</b>	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. rRNA gen dizilimi hetero-jenliğinin kullanımı	DNA ekstraksiyonu ve PCR sapmaları Sayısal değildir. Kısa hedef dizilemelerinden dolayı özgünlük sorun olabilir	Mikrobiyal komünite kompozisyonu Populasyon değişimi
<b>Uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (t-RFLP)</b>	Kültürden bağımsız geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. Hızlı ve yarı sayısal olması	DNA ekstraksiyonu ve PCR sapmaları	Selüloz fabrikası atıksuyunda mikrobiyal komünite kompozisyonu
<b>Floresan in situ hibridizasyon (FISH)</b>	Sayısal Kültür edilemeyenleri de içeren mikrobiyal hücrelerin doğrudan görsel olarak ayırt edilmesi	İnaktif hücreler tespit edilemeyebilir.	Evsel AAT atıksuyunda bakteriyel komünite kompozisyonu Aktif çamurda mikrobiyal komünite yapısının yerindeanalizi

### 3.1. Klonlama ve Gen Kütüphanesi Oluşturma

Bu metodun ilk aşaması, 16S rDNA'nın nükleik asit ekstraksiyonu (extraction), çoğaltma (amplification) ve dizileme aşamalarından oluşmaktadır. Elde edilen diziler, internetten erişimi mümkün olan bazı tarama sitelerindeki (Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), GenBank, Ribosomal Database Project (RDP)) mevcut tür dizileri ile kıyaslanmaktadır [8,9,10]. Mevcut türlere benzerlik oranlarına göre türün şimdiye kadar tanımlanmış olup olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile geliştirilen spesifik oligonükleotidler, başka moleküler tekniklerde kullanılabilir. Mesela elde edilen proflar, floresan yerinde hibritleşme tekniğinde (FISH) kullanılmak üzere ya da kademeli jel elektroforezinde (DGGE) kullanılacak primerler için dizayn edilmektedir [11]

Bu yöntem, atıksu arıtma proseslerinde yeterince yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun nedeni yetişmiş personel ve ekipman ihtiyacından kaynaklanabilir. Az da olsa birkaç çalışma mevcuttur. Bunlardan birisinde, granüler çamur numunesindeki filamentli bakterilerin filogenetik pozisyonunu belirlemek amacıyla yapılmıştır [12]. You ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, tekstil atıksuyu arıtımında kullandıkları membrane biyoreaktörlerdeki (MBR) mikrobiyal çeşitliliği hem klasik hem de moleküler tekniklerle (16S ribosomal RNA

yaklaşımı ile) belirlemişlerdir [13]. Başka bir çalışmada, biyofilm yapısındaki yaygın sülfat indirgeyen bakteri türü belirlenmiştir [14]. Egli ve ark [15] dönen biyolojik kontaktörde yaptıkları çalışmada, mikrobiyal kompozisyonu ve yapıyı 16S rDNA klonlama ve dizi analizi yöntemi ile belirlemişlerdir. 16S rDNA klon kütüphanelerinde tanımlanmamış ve yaygın olmayan mikroorganizma dizileri bulmuşlardır. Hata ve ark. [16] biyokütledeki mikrobiyal topluluk yapısını incelemişlerdir. Parçalamayı yapan bakterinin filogenetik pozisyonu belirlenmiş ve kesikli deneylerle bakteri aktivitesi onaylanmıştır. Dorigo ve ark. [17] yaptıkları çalışmada, klonlama-dizileme stratejisi ile French Nehri'ndeki kirlenmiş ve kirlenmemiş bölgedeki fitobentik kompozisyonu karşılaştırmışlardır.

Genellikle, atıksu arıtmada klonlama ve rRNA gen kütüphanesi, diğer tekniklerle birleştirilerek kullanılmaktadır [18]. Beer ve ark. [19] yılında yaptıkları çalışmada, 16S rDNA gen kütüphane dizilerine ve DGGE analizi ile elde edilen bilgilerle *in situ* hibridizasyon için yeni problemler tasarlamayı başarmıştır.

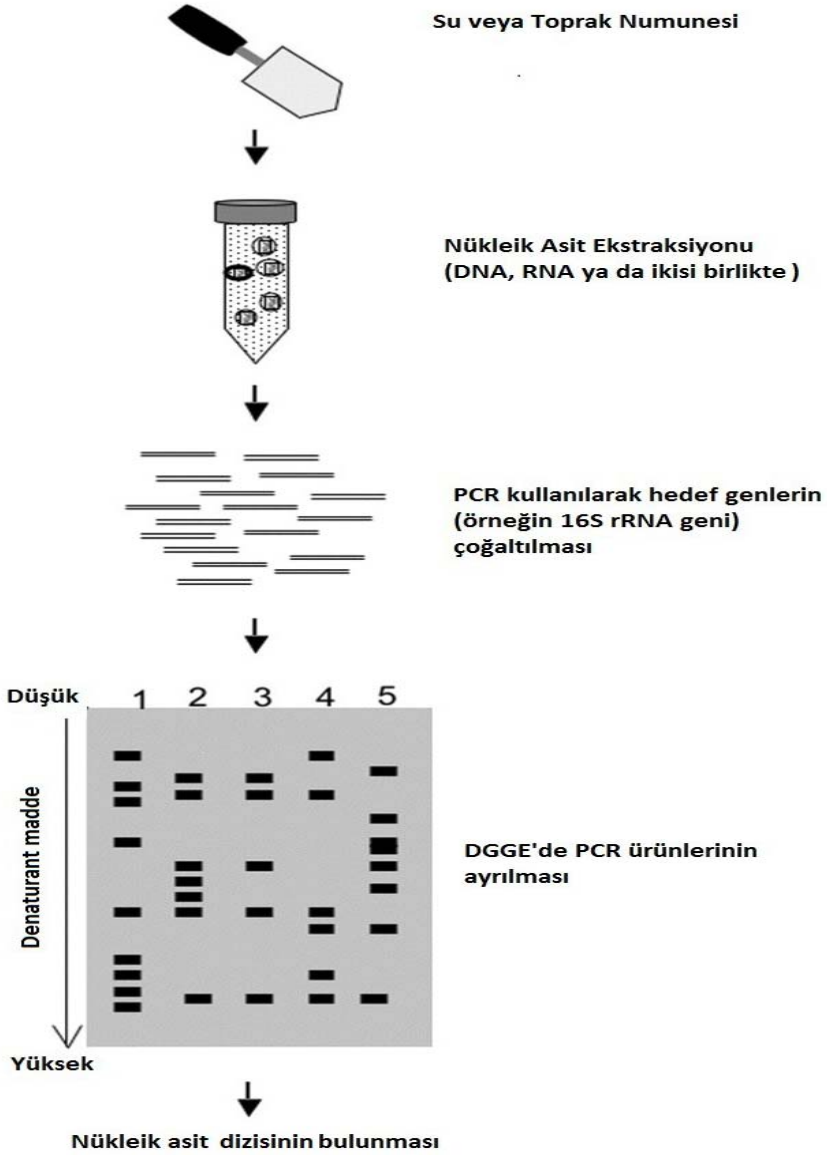
Klon kütüphanesi tekniği, çok hassas taksonomik çalışmalar yapmaya imkan vermektedir. Yapılacak çalışmada, zaman ve emek sınırlayıcı faktör değilse, çoğu mikroorganizmaları kaplamaktadır. Bu yöntemle, kültür edilmiş ve henüz tanımlanmamış mikroorganizmaları tanımlamak da mümkündür. Klon kütüphanesi tüm avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Çoklu numune gerektiren çalışmalarda, zaman isteyen bir yöntem olduğu için çok pratik değildir. Ayrıca, toprak ve sediment gibi bazı numuneler tipleri ile çalışıldığı zaman DNA ekstraksiyonu zor olabilir. Bu yöntemin kantitatif olmaması da istenmeyen bir özelliğidir [4].

### 3.2. Denatürleyici Kademeli Jel Elektrofrez (DGGE)

Denatürleyici kademeli jel elektrofrez (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) metodunda, aynı boyuttaki farklı nükleik asit dizilerinin, jel üzerinde hareketi temeline dayanır. Yani, farklı rRNA dizileri, elektrofrez üzerinde kendine özel farklı denatüre bölgelerde erimeye başlar. Böylece numunedeki genetik bicoçeşitliliği doğrudan yansıtan band desenleri üretilir. Bantların sayısı, numunedeki baskın türlerin sayısını ifade eder [20]. DGGE beş temel aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.)

1. Su/toprak/çamur örneklerinden DNA ekstraksiyonu;
2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile rDNA bölgesini çoğaltma;
3. Denatürleyici kademeli jel elektrofrez (DGGE) ile PCR ürünlerinin birbirinden ayrılması,
4. Dizi Analizi
5. Belirlenen dizilerin gen bankalarındaki diziler ile homoloji taraması

Baz dizilimi farklı DNA parçalarının kimyasal denatüran gradyanı artan jel içerisinde ilerlerken gösterdikleri erime (çift sarmalın birbirinden ayrılması) özellikleri de farklıdır. Çift sarmalı DNA parçasının erime sıcaklığı, eş bazlar arasındaki hidrojen bağları ve komşu bağlar arasındaki etkileşim tarafından belirlenir. DGGE'de kimyasal denatüre gradyanı artan jel üzerinde ilerleyen DNA parçasının çift sarmalı yavaş yavaş birbirinden ayrılmaya başlar. Sarmalın açılması DNA parçasının jel üzerindeki hareketliliğini azaltır ve bu durum DNA hareketsiz kalana dek devam eder. Kimyasal denatüre gradyan olarak genellikle formamit ya da üre kullanılır. Ayrılan DNA parçaları jelin uygun bir metot ile boyanmasıyla görüntülenir [11]. DGGE'nin en önemli avantajı birden fazla numunenin aynı jel üzerinde yürütülebilmesi, dolayısıyla zamanla ve farklı çevresel koşulların etkisiyle oluşan popülasyon değişimlerinin izlenmesine olanak sağlamasıdır. Ayrıca, klonlama ve dizi analizi gibi zahmetli, pahalı ve numune sayısı arttıkça vakit alıcı bir teknik değildir [7]. DGGE genomik, klonlanmış ve PCR ile çoğaltılmış DNA'daki tek baz değişimlerinin ve polimorfizmin belirlenmesinde etkili bir genetik analiz yöntemidir.



Şekil 2. Denatürleyici kademeli jel elektroforezinin aşamaları [21]

Bantların filogenetik analizi ve dizilemenin birleştirilmesi ile bu metod, numunedeki mikrobiyal topluluk hakkında iyi bir sonuç verebilir. Bilinmeyen türlerin kesin olarak tanımlanması için dizi analizleri gerekse de, DGGE'nin en büyük avantajları bir biyokütle topluluğundaki mikrobiyal çeşitliliği açıkça ortaya koyan ve zamana karşı alınan numunelerde uygulanması durumunda mikrobiyal kompozisyondaki popülasyon kaymalarını doğrudan gösterebilen pratik bir ayırıştırma yöntemi olmasıdır. DGGE yöntemi, yüksek ve düşük aktiviteye

sahip mikrobiyal komünitelerin karşılaştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Fromin ve ark. [22] yaptıkları çalışmada, elde edilen DGGE verilerini yorumlamada kullanılan istatistiksel analizleri tanımlamışlardır.

DGGE, istenen bilginin klonlamadaki gibi detaylı olmasının gerekmediği durumlarda tercih edilen bir metoddur. Fakat yine de mikrobiyal topluluktaki baskın türleri belirlemek için yeterlidir. Muyzer ve Smalla [2], DGGE metodunda karşılaşılan muhtemel sorunları ve uygulamaları konu alan bir derleme çalışması yazmışlardır. Bu metot toprak, bakteriyoplankton, termal sular gibi çok geniş uygulama alanlarına sahiptir [23,24]. Anaerobik atıksu arıtımında uygulama alanı nisbeten daha azdır. DGGE alkol, kağıt fabrikası atıksularının arıtımı için kullanılan UASB reaktörlerdeki granüler çamurun mikrobiyal dağılımını belirlemek için kullanılmıştır [25,26,27].

Genellikle bu metod, *in situ* hibridizasyon gibi yöntemlerle birleştirilerek kullanılmaktadır. Sülfat indirgeyen bakteriler [28] ve fosfor eliminasyonunu [29] konu alan bazı çalışmalarda, elde edilen DGGE bantlar ile, prosesteki baskın (öncü) türler belirlenmiş ve sonrasında baskın bant dizilerinin yardımı ile spesifik problemler dizayn edilmiştir. Tang ve ark. [30] evsel katı atık arıtımında, istenmeyen kötü kokulu H<sub>2</sub>S gazı üretmeyen mikro havalandırılmalı termofilik parçalama sistemi kullanmışlardır. Yazarlar mikroaerofili ve anaerobik (strictly) parçalayıcıların mikrobiyal dağılımını detaylı bir şekilde tanımlayabilmek amacıyla tam rRNA çevrim teknolojisini kullanmışlardır.

DGGE'nin en önemli uygulama alanı, özellikle birden fazla numune ile çalışılacaksa, mikrobiyal topluluklardaki dinamik değişimlerin izlenmesidir. Xing ve ark. [31] yaptıkları çalışmada, hidrojen üreten biyoreaktörün farklı işletim safhalarında mikrobiyal dağılımda meydana gelen değişiklikleri belirlemişlerdir. Yazarlar, reaktörün başlangıç ve stabilizasyon fazındaki mikrobiyal değişimi izlemiş ve H<sub>2</sub> üreten mikrobiyal topluluktaki kometabolizma ve türler arası ilişkilerin önemli rol aldığını bulmuşlardır.

Kjellin ve ark. [32], tarafından yapılan çalışmada, denitrifikasyon bakterisi topluluğunun yapısının sedimentin farklı bölgelerinde değişim gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışmadaki mikrobiyal topluluk desenindeki değişim, hidrolik bekleme süresi ve denitrifikasyon aktivitesine göre değişim göstermiştir. Bazı DGGE sonuçlarında, sadece 4 bant gözlenmesine karşın denitrifikasyon aktivitesi yüksek görülmüştür. Bu sonuç, yüksek denitrifikasyon hızı için, denitrifikasyon bakterilerinin çok çeşitli olması gerektiğini ortaya koymuştur.

Mikrobiyal popülasyondaki zamansal ve boyutsal değişimi hızlı ve basit bir izleme ile tespit edilmesine imkan sağlayan DGGE'de de klonlamada olduğu gibi, numunenin doğal yapısına bağlı olarak, genomik DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu zor olabilir. Ayrıca primer seçimi, jel koşullarının optimizasyonu ve jel üzerinde birçok farklı bant oluşması durumunda, bu bantların karşılaştırılması aşamasının zor olması önemli bir sınırlayıcıdır [33]. Bu yöntemin bir diğer sınırlayıcı özelliği ise, bazen farklı türlere ait DNA parçalarının jel üzerinde birlikte hareket etmesinden kaynaklanmaktadır. Böylece iki farklı tür aynı noktada denature olduğu için tür tespiti hassasiyeti sınırlı olabilmektedir [34].

### 3.3. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH)

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) analizi, mikroorganizmaların hücrelerine zarar vermeden rRNA'larını hedef alan floresan boyalı oligonükleotidler kullanılarak izlenmesine dayalı bir tekniktir. Oligonükleotidler, hücrede çok miktarda bulunan rRNA'ların belirli kısımlarına bağlanabilen floresan boyalı, tek sarmal halinde özel baz dizileridir. rRNA'ların mikroorganizma tayininde hedef olarak kullanılmasının sebepleri şu şekilde özetlenebilir;

- rRNA moleküllerinin her canlı hücrede bulunması,
- Numunedeki mikroorganizma miktarı düşük olsa da besi yerinde çoğaltmaya gerek kalmadan rRNA'larına ulaşılabilirlik,

- Pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA gen dizisi ile ilgili geniş bilgi birikimi mevcuttur.

FISH mikroskopik sayıma dayalı sonuç veren kültürden bağımsız yöntemlerden birisidir. FISH ile fikse edilmiş ve spesifik problemlerle hibritlenmiş mikrobiyal hücreler; epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu ile görselleştirilebilir [35].

FISH tekniğinin avantajları arasında rRNA hedefli nükleik asit problemlerinin metabolik olarak aktif hücrelerin tanımlanması, önemli popülasyonların morfolojilerinin belirlenmesi, filogenetik olarak tanımlanması ve kantitatif analizlerinin yapılmasına olanak sağlaması sayılabilir [36]. Ayrıca, kullanılan oligonükleotitlerin türlere özgünlüğünün kontrol edilebilmesi de bu yöntemin önemli avantajları arasındadır. Farklı flüoresan boyalar ile işaretlenmiş oligonükleotitler kullanıldığı takdirde FISH tekniği ile mikroorganizma dağılımı miktarsal olarak tespit edilebilmekte, ayrıca işlevsel etkileşimde bulunan mikroorganizmalar, konumsal olarak da incelenebilmektedir.

FISH yöntemi reaktörde mevcut aktif mikrobiyal türlerin miktarları hakkında bilgi vermesine rağmen, kompozisyondaki değişimi tespit etmede yeterli değildir. Bu nedenle çoğu araştırmacı FISH'i diğer moleküler tekniklerle birlikte kullanmaktadır. Örneğin, Collins ve ark. [37] FISH-DGGE ve Jardillier ve ark. [38] FISH ve T-RFLP tekniğini birlikte kullanarak, mikrobiyal dağılımı ve hücre sayısını belirlemişlerdir. FISH'in birçok avantajına rağmen halen uygulamada bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Hem metodolojik hem de çevresel faktörler FISH performansını etkilemektedir. FISH tekniğinin uygulamasında en çok vakit alan aşama, uygun oligonükleotitlerin tasarlanması ve özgünlüklerin incelendiği aşamadır [39]. Bu tekniğin geliştirilmesi amacı ile ileri araştırmalar devam etmektedir [40,41].

Baptista ve ark., [42] tarafından yapılan çalışmada; pilot ölçekli yatay akışlı yapay sulak alanda mikrobiyal dağılım FISH ve DGGE teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada anaerobik karbon artırımında rol alan üç fonksiyonel grup; heterotrofik bakteriler, sülfat indirgeyen bakteriler ve arkeler (metanojenler) karşılaştırılmıştır.

UASB reaktörlerde, serbest amonyakın metanojenler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada DGGE, FISH ve dizi analizi gibi 16S rRNA/rDNA kaynaklı moleküler yöntemler birlikte kullanılmıştır [43].

Xia ve ark. [44] tarafından yapılan bir çalışmada, tek bir biyofilm reaktörde nitrifikasyon ve denitrifikasyon birlikte geliştirilmiş ve nütrient giderim mekanizması araştırılmıştır. Farklı karbon/azot oranlarında değişen popülasyon DGGE ile incelenmiş ve popülasyon dinamiği FISH ile görselleştirilmiştir.

#### **3.4. Ribozomal Genlerarası Boşluk Analizi (RISA) ve Otomatik Ribozomal Genlerarası Boşluk Analizi (ARISA)**

RISA (Ribozomal Intergenic Spacer Analysis), Borneman ve Triplet [45] tarafından geliştirilmiş ve ilk defa bir toprak numunesinde mikrobiyal çeşitliliği belirlemek üzere uygulanmış bir yöntemdir. Bu yöntem, rRNA operonunda küçük (16S) ve büyük (23S) alt unite rRNA genleri arasındaki boşluk bölgesinin PZR ile çoğaltılmasını içermektedir. Bu bölge değişen uzunluk (50 - 1500 bp) ve nükleotid dizisine sahiptir [46]. Çoğaltma sonucu elde edilen farklı uzunluktaki ürünler, poliakrilamid jel üzerinde boyutlarına göre birbirlerinden ayrılır ve gümüş boyama ile görselleştirilir. Mikrobiyal toplulukları belirlemede başarılı bir şekilde uygulanan bu parmakizi yönteminde her band en az bir organizmayı ifade etmektedir [11].

Aerobik toprak koşullarında PAH'ın biyolojik parçalanması ile ilgili bir çalışmada, mikrobiyal topluluğu tespit etmek amacıyla RISA tekniği kullanılmıştır [47]. RISA yöntemi ile kirletilmiş kaynaklardaki mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ile ilgili uygulamaların az sayıda olması, ribozomal genlerarası boşluk dizileri ile ilgili veritabanlarının yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır [48].



Fisher ve Triplet [49] tarafından yapılan çalışmada RISA yöntemini daha çabuk ve etkin bir şekilde yürütmek amacıyla ARISA (Automated Ribozomal Intergenic Spacer Analysis) adı verilen otomatik versiyonu geliştirilmiştir. ARISA'da elde edilen toplam floresan pik sayısı, numunedeki toplam tür sayısı hakkında tahmini bilgi vermektedir. Ayrıca, parça ebatlarını GenBank veritabanı ile kıyaslamak mümkündür.

### **3.5. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Kesim Analizi (ARDRA)**

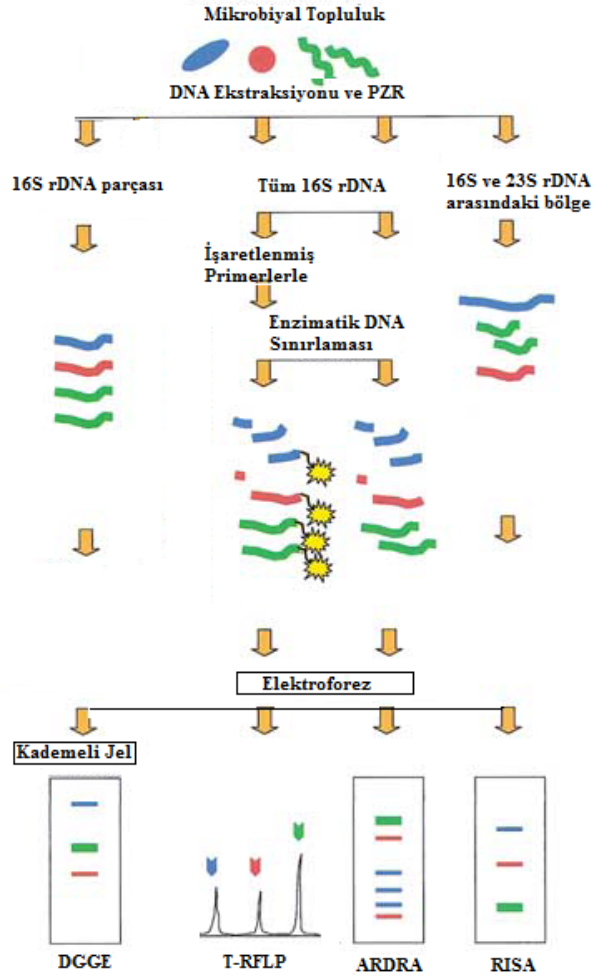
ARDRA (Amplified Ribozomal DNA Restriction Analysis) yönteminde PZR ile çoğaltılmış 16S rDNA parçaları, kesim (restriction) enzimleri ile spesifik bölgelerden parçalanır ya da kesilir. Sonra jel elektroforezi ile birbirinden ayrılır. Farklı DNA dizileri farklı yerlerden kesilmiş olacaktır [50]. ARDRA mikrobiyal tanımlamada kullanılan basit, hızlı ve etkin maliyetli bir yöntemdir [51].

ARDRA yöntemi ile yapılmış bir çalışmada; fenol, toluene ve klorlu alifatik hidrokarbonlar uygulanan bir akiferde degradasyonu gerçekleştiren baskın mikrobiyal grup belirlenmiştir [52].

Gich ve ark. [50] tarafından yapılan başka bir çalışmada; evsel ve endüstriyel atıksu ile beslenen iki farklı arıtma tesisinin aktif çamur ünitesindeki mikrobiyal farklılıklar, ARDRA metodu ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda tesislerdeki mikrobiyal grupların birbirinden farklı olduğu sonucuna varmışlardır. Bazı çalışmalarda ARDRA, diğer moleküler tekniklerle (DGGE ve T-RFLP) birleştirilerek kullanılmaktadır [53,54].

### **3.6. Uçtan Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (T-RFLP)**

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), ARDRA yönteminin modifiye olmuş şeklidir. T-RFLP analizinde kullanılan floresan işaretlenmiş primerler kullanılır. RZR ürünleri görselleştirilir ve sayısallaştırılır [39]. T-RFLP analizi, diziler arasında kesim yerlerinin pozisyonunun değişimi esasına dayanır. Ayrıca, yüksek çözünürlüklü jel elektroforezi ile floresan işaretlenmiş uçtan kesilmiş parçaların uzunluğu belirlenir [55]. Oluşan her bant deseni kompleks mikrobiyal grup içindeki tek bir taksonomik birimi ifade etmektedir [56]. T-RFLP analizi çeşitli akiferlerde mikrobiyal grupları karakterize etmeyi hedefleyen çalışmalarda uygulanmıştır [57,58,59]. Liu ve ark. [57] ardışık anaerobic-aerobik kesikli reaktörlerde yaptıkları bir çalışma ile T-RFLP analizinin hızlı ve yarı sayısal olması nedeniyle mikrobiyal yapının belirlenmesi ile ilgili araştırmalar için uygun bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. T-RFLP analizinin aşamaları ve diğer moleküler tekniklerle farklılıkları Şekil 3'te görülmektedir.



Şekil 3. DNA parmakizi yöntemlerinin kademelerini içeren şematik gösterim [60]

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Etkili bir biyolojik arıtma sistemi tasarlamak için; arıtmada rol alan mikrobiyal grupların ve bu grupların hangi mekanizmalarla arıtımı gerçekleştirdiğinin bilinmesi gerekmektedir. Günümüzde, arıtma sistemlerindeki mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde; saf kültür elde etme ya da tek başına mikroskopik analizler kullanılarak elde edilen veriler yeterli değildir. Bu amaçla yeni moleküler yaklaşımları içeren tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışmada klonlama ve rRNA genlerinin dizilemesi, denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) gibi moleküler teknikler detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Ayrıca bu tekniklerin çevre mühendisliğindeki uygulama alanlarından örnekler verilmiştir.

Bu tekniklerin kullanımı ile çevre mühendisliğinde arıtma amaçlı kullanılan mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü anlamaya bir adım daha yaklaşmak mümkün olacaktır. Elde edilen verilerin, arıtma sistemlerinde kullanılan biyoreaktörlerin tasarımında,

işletme ve kontrolünde kullanımını sağlamak mümkündür. Çevre mikrobiyolojisinde moleküler tekniklerin kullanımı ile daha etkin çalışan arıtma sistemlerinin tasarlanması mümkün olacaktır.

## REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Muyzer, G., “DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ekosystems”, *Current Opinion in Microbiology*, 2:317-322, 1999.
- [2] Muyzer, G. and Smalla, K., “Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology”, *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141, 1998.
- [3] Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., “Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation” *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169, 1995.
- [4] Sanz JL., Kochling TK., “Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview”, *Process Biochemistry*, 42 119–133, 2007.
- [5] Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Florent C., Burr, M.D., Brisson, J., Camper A.K., Steina O.R., “Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review”, *Ecological Engineering* 35, 987–1004, 2009.
- [6] Ludwig, W. and Schleifer, KH., “Bacterial Phylogeny Based on 16S and 23S rRNA Sequence Analysis”, *FEMS Microbio Rev.*, 15 (2-3):155-173, 1994.
- [7] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., “Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate”, *Bioresource Technology*, 97, 641–647, 2006.
- [8] Madden, TL., Tatusov, RL., Zhang, J., “Application of network BLAST server”, *Methods Enzymol*, 266:131-141, 1996.
- [9] Benson, DA., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, DJ., Ostell, J., Wheeler, DL., “Genbank:update”. *Nucleic Acids Res.*, 32:D23-D26, 2004.
- [10] Maidak, BL., Cole, JR., Lilburn, TG., Parker, CT., Saxman, PR., Farris, RJ, Garrity, GM., Olsen, GJ., Schmidt, TM, Tiedje JM., “The RDP-II (Ribosomal Database Project)”, *Nucleic Acids Res.*, 29: 173-174, 2001.
- [11] Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, JF., “Molecular Approaches to the Assesment of Biodiversity in Aquatic Microbial Communities”, *Water Research*, 39, 2207-2218, 2005.
- [12] Sekiguchi Y, Takahashi H, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H. “In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I”. *Appl Environ Microbiol*; 67, 2001.
- [13] You SJ., Tseng DH., Liu CC., Ou SH., Chien HM., “The performance and microbial diversity of a membrane bioreactor treating with the real textile dyeing wastewater”, *Water Practice & Technology*, 1(3), 2006.
- [14] Ito T, Okabe S, Satoh H, Watanabe Y. “Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions” *Appl Environ Microbiol*, 68:1392–1402, 2002.
- [15] Egli K, Bosshard F, Werlen C, Lais P, Siegrist H, Zehnder AJ, et al. “Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon” *Microb Ecol*, 45:419–432, 2003.
- [16] Hata J, Miyata N, Kim ES, Takamizawa K, Iwahori K. “Anaerobic degradation of cis-1,2-dichloroethylene and vinyl chloride by *Clostridium* sp. strain DC1 isolated from landfill leachate sediment” *J Biosci Bioeng*; 97:196–201, 2004.
- [17] Dorigo, U., Berard, A., Humbert, JF., “Comparison of Eukaryotic Phytobentic Community Composition in a Polluted River by Partial 18S rRNA gene Cloning and Sequencing” *Microb.Ecol.*, 4, 372-380, 2002.

- [18] Kowalchuk GA., Stephen JR., de Boer W., Prosser JI., Embley TM., Woldendorp JW, "Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$ -subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by DGGE and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments", *App. Environ. Microbiol.*, 63:1489-1497, 1997.
- [19] Beer M, Kong YH, Seviour RJ. "Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic: aerobic sludge systems members of the alpha-proteobacteria?" *Microbiol*, 150:2267-75, 2004.
- [20] Nicomrat, D., Dick, W.A., Tuovinen O.H., "Assesment of the microbial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage", *Microbial Ecology*, 51, 83-89, 2006.
- [21] Nakatsu C.H., "Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis", *Soil Science Society of America Journal*, 71 (2), 562-571, 2006.
- [22] Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvella S., Gillet F., Aragno M., Rossi P., "Statistical analysis of DGE fingerprinting patterns", *Environ. Microbiol.*, 4, 634-643, 2002.
- [23] Casamayor, E.O., Muyzer, G., Pedro' s-Alio' , C., "Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing", *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 237-246, 2001.
- [24] El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles", *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 982-988, 1999.
- [25] Buzzini A.P, Sakamoto I.K., Varesche M.B., Pires E.C, "Evaluation of the microbial diversity in a UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant", *Process Biochemistry*, 41: 168-176, 2006.
- [26] Roest K., Heilig G.H.J., Smidt H., de Vos WM., Stams A.J.M., Akkermans A.D.L., "Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater", *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 175-185, 2005.
- [27] Akarsubasi A.T., Ince O., Oz N.A., Kırdar B., Ince B.K. a, "Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters", *Process Biochemistry*, 41: 28-35, 2006.
- [28] Santegoeds CM, Ferdelman TG, Muyzer G, de Beer D. "Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms". *Appl Environ Microbiol*, 64:3731-9, 1998.
- [29] Onda S, Hiraishi A, Matsuo Y, Takii S. "Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system". *J Gen Appl Microbiol*, 48:43-54, 2002.
- [30] Tang Y, Shigematsu T, Ikkal, Morimura S, Kida K. "The effects of microaeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester". *Water Res*; 38: 2537-50, 2004.
- [31] Xing D, Ren N, Gong M, Li J, Li Q. "Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)". *Sci China C Life Sci*; 48:155-62, 2005.
- [32] Kjellin, J., Hallin, S., Wörman, A., "Spatial variations in denitrification activity in wetland sediments explained by hydrology and denitrifying community structure", *Water Research*, 41, 4710-4720, 2007.
- [33] Hayes VW., Wu Y., Osinga J., Mulder IM., van der Vlies P., Elfferich P., Buys CH., Hofstra RM., "Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis for denaturing conditions for broad-range mutation analysis for DGGE", *Nucleic Acids Res.*, 27,e29, 1999.

- [34] Vallaeyts T., Topp E., Muyzer G., Macheret V., Laguerre G., Rigaud A., Saulas G., "Evaluation of DGGE in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs", *FEMS Microb. Ecol.*, 24, 279-285, 1997.
- [35] Edgcomb VP, McDonald JH, Devereux R, Smith DW, "Estimation of bacterial cell numbers in humic acid-rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA", *Appl Environ Microbiol*, 65:1516–23, 1999.
- [36] Moter, A., Gobel, U.B., "Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms", *J. Microbiol. Meth.* 41 (2), 85–112, 2000.
- [37] Collins G, Kavanagh S, McHugh S, Connaughton S, Kearney A, Rice O, et al. "Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through polyphasic experiments", *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41:897–922, 2006.
- [38] Jardillier L, Boucher D, Personnic S, Jacquet S, Thenot A, Sargos D, et al. "Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments" *FEMS Microbiol Ecol*, 53:429–43, 2005.
- [39] Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R., "The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water", *Environment International*, 34 : 265–276, 2008.
- [40] Biegala, I., Not, F., Vaulot, D., Simon, N., " Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry." *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5519–5529, 2003.
- [41] Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R.I., "Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*", 68, 3094–3101, 2002a.
- [42] Baptista, J. C, Davenport, R. J., Donnelly, T., Curtis, T.P., "The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled", *Water Research*, 42, 3182-3190, 2008.
- [43] Çallı, B., Mertoğlu, B., İnanç, B., Yenigün O., "Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels", *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 448–455, 2005.
- [44] Xia S., Li J., Wang R., "Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor", *Ecological Engineering*, 32; 256–262, 2008.
- [45] Borneman, J., Triplett, E.W., "Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2647–2653, 1997.
- [46] Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougel C, Thioulouse J, Nazaret S, "Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability", *Appl Environ Microbiol*, 67:4479–87, 2001.
- [47] Eriksson M, Sodersten E, Yu Z, Dalhammar G, Mohn WW, "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils", *Appl Environ Microbiol*, 69:275–84, 2003.
- [48] Spiegelman D, Whissell G, Greer CW. "A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities", *Can J Microbiol*, 51:355–86, 2005.
- [49] Fisher, M., Triplett, E.W., "Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities", *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636, 1999.

- [50] Gich FB, Amer E, Figueras JB, Abella CA, Balaguer MD, Poch M, "Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)", *Int Microbiol*, 3:103–6, 2000.
- [51] Kita-Tsukamoto K, Wada M, Yao K, Kamiya A, Yoshizawa S, Uchiyama N, et al. "Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis" *FEMS Microbiol Lett*, 256: 298–303, 2006.
- [52] Fries MR, Hopkins GD, McCarty PL, Forney LJ, Tiedje JM. "Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism". *Appl Environ Microbiol*; 63:1515–22, 1997.
- [53] Watts JE, Wu Q, Schreier SB, May HD, Sowers KR. "Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques". *Environ Microbiol*, 3:710–9. 2001.
- [54] Haack SK, Fogarty LR, West TG, Alm EW, McGuire JT, Long DT, et al. "Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer" *Environ Microbiol*, 6:438–48, 2004.
- [55] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:323–7.
- [56] Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 1999;13:109–22.
- [57] Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L., "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522, 1997.
- [58] Reardon CL, Cummings DE, Petzke LM, Kinsall BL, Watson DB, Peyton BM, et al. "Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer", *Appl Environ Microbiol*, 70:6037–46, 2004.
- [59] Macbeth TW, Cummings DE, Spring S, Petzke LM, Sorenson Jr KS. "Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture". *Appl Environ Microbiol*, 70:7329–41, 2004.
- [60] Dabert P., Delgen`es JP., Moletta R., Godon JJ., "Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community Dynamics", *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 1: 39–49, 2002.