





## *Pachnoda Marginata* Larva'sının arka bağırsağından anaerobik lignoselülitik mikrobiyal kültür geliştirilmesi

### Anaerobic lignocellolytic microbial community derived from hindgut of *Pachnoda Marginata* Larva

Emine Gözde ÖZBAYRAM<sup>1\*</sup> , Orhan İNCE<sup>2</sup> , Sabine KLEINSTEUBER<sup>3</sup> , Marcell NIKOLAUSZ<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Deniz ve İç Su Kaynakları Yönetimi Bölümü, Su Bilimleri Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.  
gozbayram@itu.edu.tr

<sup>2</sup>Çevre Mühendisliği Bölümü, İnşaat Fakültesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.  
inceor@itu.edu.tr

<sup>3,4</sup>Çevre Mikrobiyolojisi Bölümü, Helmholtz Çevre Araştırmaları Merkezi-UFZ, Leipzig, Almanya.  
sabine.kliensteuber@ufz.de, marcel.nikolausz@ufz.de

Geliş Tarihi/Received: 14.06.2019  
Kabul Tarihi/Accepted: 23.11.2019

Düzeltilme Tarihi/Revision: 25.08.2019

doi: 10.5505/pajes.2019.50980  
Araştırma Makalesi/Research Article

#### Öz

Tarım atıkları, yüksek enerji içerikleri ve üretim miktarları ile düşük maliyetleri nedeniyle anaerobik çürütücüler için en önemli biyokütle olarak değerlendirilmesine rağmen karmaşık lignoselülozik yapıları bu maddelerin hidroliz aşamalarını sınırlandırmaktadır. Hidroliz verimini artırmak için etkin lignoselüloz degradasyon stratejileri geliştirilmektedir. Bu çalışmanın amacı, *Pachnoda marginata* larvalarının arka bağırsağından lignoselüloz parçalayabilen anaerobik mikrobiyal topluluğun zenginleştirilmesidir. Bu kapsamda, *Pachnoda marginata* larvaları 3 hafta süre ile lignoselülozik substrat ile beslenmiş, sonrasında disekte edilmiştir. Arka bağırsak kültür şişelerine transfer edilmiştir. Bakteriyel topluluk çeşitliliği 16S rRNA ampikon dizileme yöntemi ile Illumina MiSeq platformunda analiz edilmiş, metanojenik arkeal topluluk ise T-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. Kültür şişelerinde biyogaz üretimi zaman ile artış göstermiş, tüm şişelerde metan üretimi gözlenmiştir. Zenginleştirme prosedürü sonucunda, kültürün bakteriyel topluluk profili değişiklik göstermiş, üç transfer sonrasında alınan örneklerde Porphyromonadaceae (phylum: Bacteroidetes) bolluğunun artarak baskılandığı görülmüştür. Metanojenik topluluk ise *Methanobrevibacter* ile baskılanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, *Pachnoda marginata* larvasının sindirim sisteminden üretilen zenginleştirilmiş kültürün, lignoselülozca zengin kompleks biyokütleyi etkin bir şekilde parçalayabildiğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bağırsak mikrobiyotası, Illumina Miseq, Lignoselüloz degradasyonu, Scarabaeidae, T-RFLP, Zenginleştirilmiş kültür.

#### Abstract

Agricultural wastes are considered as the most important biomass for anaerobic digesters due to the high energy content, high abundance, and low costs. However, complex lignocellulosic structure limits the hydrolysis of these materials. Thus, effective lignocellulose degradation strategies are developing to enhance the hydrolysis rate. The aim of this study is to enrich microbial consortia that degrade lignocellulosic biomass from the hindgut of *Pachnoda marginata* larvae. Within this scope, *Pachnoda marginata* larvae kept on a lignocellulose rich diet for 3 weeks and then dissected. The hindgut compartment was transferred to culture bottles. Bacterial community compositions were examined by amplicon sequencing of the 16S rRNA gene on the Illumina MiSeq platform, methanogenic archaeal communities were determined by the T-RFLP method. Biogas production was increased over time and methane production was observed in all bottles. The bacterial community profile of the enrichment culture was shifted as a result of the enrichment procedure with particularly the abundance of Porphyromonadaceae (phylum: Bacteroidetes) increasing during prolonged subcultivation. The methanogenic community was dominated by *Methanobrevibacter*. Our results show the successful establishment of an enrichment culture from the gut system of *Pachnoda marginata* larvae that effectively degrades complex lignocellulose rich biomass.

**Keywords:** Enrichment culture, Gut microbiota, Illumina Miseq, Scarabaeidae, T-RFLP, Lignocellulose degradation.

## 1 Giriş

Bitkisel biyokütle, yenilenebilir enerji üretiminde en önemli doğal kaynak olarak nitelendirilmektedir. Bitki hücrelerinin lignin, selüloz ve hemiselülozdan meydana gelen kompleks yapıları enzimatik reaksiyonlara direnç oluşturmaktadır. Selüloz ve hemiselülozik yapılar anaerobik bozunma sürecinde biyogaza dönüştürülebilirken, kompleks kristalin yapı biyokütlenin hidroliz verimini sınırlandırmaktadır [1]. Bu nedenle, anaerobik çürütücülerdeki biyogaz veriminin iyileştirilmesine yönelik mekanik/fiziksel/ kimyasal ön arıtma, enzim ekleme, spesifik mikroorganizmalar ile biyoaugmentasyon, silolama gibi farklı teknikler geliştirilerek

sisteme entegre edilmektedir [2]. Anaerobik çürütücüler üzerine yürütülen son çalışmalarda biyoaugmentasyon uygulamaları ön plana çıkarak, çalışmalar hidroliz aşamasını etkin olarak gerçekleştirebilen doğal sistemlerinden mikrobiyal kültürlerin geliştirilerek anaerobik çürütücülere uygulanması üzerine kurulmuştur [2]-[5].

Toprak solucanı, kınkanatlı larvaları, termitler gibi çok çeşitli canlılardan oluşan toprak makrofaunası, organik madde ayrışımının başladığı ortam olması nedeniyle karbon döngüsünde çok önemli bir rol oynamaktadır [6],[7]. Toprakta yaşayan omurgasızların bağırsak sistemleri, lignoselülozik substratları ayrıştırabilen enzimler salgılayan mikroorganizmalar için uygun habitatlardır [8]. Bu canlıların

\*Yazışılan yazar/Corresponding author

çoğunun fiziksel olarak küçük boyutuna göre yüksek substrat alım hızları, sindirim sistemlerindeki etkin bozunma mekanizması nedeniyle mümkündür [9]. Bu nedenle omurgasızlardaki lignoselülozik biyokütle bozunması ruminantlar gibi omurgalı hayvanlardan daha etkilidir [10]. Lignoselüloz degradasyonunun uçucu yağ asidi (UYA) üretim oranı cinsinden değeri, ruminantlarda 18 g UYA-KOI/rumen.gün iken, termitlerde bu değerin oldukça yüksek olduğu bulunmuş, 225 g UYA-KOI/L.gün olarak hesaplanmıştır [10].

Taksonomik sınıflandırmada en büyük böcek takımı olan kınkanatlıların (Coleoptera), çoğu üyesinin larvalarının lignoselüloz bakımından zengin substratlar ile beslendiği Scarabaeidae ailesini de içermektedir [11],[12]. *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvaları, bağırsak sistemlerinde lignoselülozik bileşikler etkin bir şekilde sindirme kabiliyetine sahip olan mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapmakta, bitki fiberlerinin yaklaşık %65'ini parçalayabilmektedir. Bu nedenle, *Pachnoda marginata* larvaları mikro-ölçekli biyokütle dönüşüm sistemi olarak nitelendirilmektedir [13]. Larvaların bağırsak sistemleri basit olarak alkali orta bağırsak ile fermentasyonun gerçekleştiği arka bağırsaktan oluşmaktadır [11]. Orta-bağırsaktaki yüksek pH, metanojenik arkeler için elverişli olmamakla birlikte, mikrobiyal çeşitliliği sınırlandırmaktadır.

Ulusal ve uluslararası literatürde, lignoselülozik substratları etkin olarak parçalayabilen stratejilerin geliştirilmesi konusunda artan bilimsel çalışmalara rağmen, bu substratlarla beslenen ruminant ve termitler gibi canlıların sindirim stratejilerinin biyomimik uygulamaları alanında sınırlı sayıda çalışma mevcuttur [10],[14].

Mikroorganizmaların simbiyotik etkileşimleri biyoteknoloji ve biyoaugmentasyon uygulamalarına ilham vermektedir [15]. Gerçek ölçekli anaerobik çürütücü tesislerindeki biyoaugmentasyon uygulamalarında bağırsak içeriğinin doğrudan uygulanması pratikçe mümkündür değildir. [15]. Bu nedenle bağırsak mikrobiyotasındaki lignoselüloz parçalayabilen mikrobiyal toplulukların seçici olarak zenginleştirilmesi [16] ve anaerobik çürütücülerde biyoaugmentasyon uygulamalarında kullanılması etkin bir strateji olarak görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, *Pachnoda marginata* larvalarının, mikrobiyal çeşitliliğin yüksek olduğu, fermentasyon ünitesi de olarak adlandırılan arka bağırsağından lignoselüloz parçalayabilen anaerobik mikrobiyal topluluğun zenginleştirilmesidir. Bu kapsamda, *Pachnoda marginata* larvaları lignoselülozik substratla beslenerek bağırsak mikrobiyotası bu substrata alıştırmış, diseksiyon sonrasında arka bağırsaktan alınan örnekler anaerobik kültür ortamına aktarılmıştır. Seri transferlerle lignoselüloz parçalayabilen mikrobiyal kültür geliştirilmiştir.

## 2 Materyal ve metod

### 2.1 Numunelerin hazırlanması

*Pachnoda marginata* larvaları ticari bir yetiştiriciden temin edilmiştir (Bugs International GmbH, Irsingen/Unterfeld, Almanya). Lignoselülozik substrata alışmaları için larvalar oda sıcaklığında sadece buğday samanı bulunan ortamda 3 hafta tutulmuştur, farklı bir besin eklenmemiştir. Larvaların diseksiyonu Lemke vd. tarafından açıklanan yöntemdeki alıkoyma süresi değiştirilerek gerçekleştirilmiştir [8]. Her birey bir cam vialle yerleştirilmiş, 5 dakika boyunca N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>

karışımıyla (% 80/20; h/h) anestezi uygulanmıştır. Sonrasında, laminer akış kabininde steril diseksiyon aletleri kullanılarak disekte edilmiştir. Arka bağırsak bölümü ayrılarak elde edilen numunelerin bir kısmı 1 mL steril besiyeri içeren ependorf tüplerine aktarılmış, burada süspansiyon edildikten sonra hızlı bir şekilde zenginleştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Diğer kısım ise mikrobiyal karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonuna kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### 2.2 Anaerobik zenginleştirilmiş kültür

Anaerobik zenginleştirme çalışmaları Özbayram vd. tarafından belirtilen protokole substratta bazı değişiklikler yapılarak yürütülmüştür [2]. Anaerobik kültür çalışmaları modifiye edilmiş DSMZ 1036 (0.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0.2 g KCl, 2.0 g NaCl, 0.2 g maya özütü, 1.0 mL iz element çözeltisi SL10 (DSMZ 320) ve 0.550 mg resazurin 850 mL'de yüksek saflıkta suda çözünmüştür) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada karbon kaynağı olarak buğday samanı kullanılmıştır. Buğday samanınin toplam katı maddesi %89.6, toplam uçucu katı maddesi (UKM) %69.5, çözünmüş kimyasal oksijen ihtiyacı (çKOİ) değeri 7210 mg/L'dir [3]. Metan verimi ise 173-184 mL<sub>N</sub> CH<sub>4</sub> /g UKM'dir [17]. Larva sindirim sistemindeki orta bağırsağın alkali koşullarını simüle etmek için 0.5 g öğütülmüş ve otoklavlanmış buğday samanı, 12 mL steril su içinde 0.05 g Ca(OH)<sub>2</sub> ile muamele edilmiş ve gece boyunca oda sıcaklığında tutulmuştur. Karbon kaynağı olarak alkali işlem gören bu buğday samanı kullanılmıştır.

Arka bağırsak numuneleri ön kültür şişelerinde 37 °C'de iki gün inkübe edilmiştir. Sonrasında, taze hazırlanmış 50 mL besiyerine önkültürlerden 1 mL eklenmiş ve 37 °C'de 30 gün boyunca anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Olası kontaminasyonları takip etmek için aşılınmayan şişeler de kontrol olarak aynı koşullarda tutulmuştur. Deney setleri üç tekrarlı yürütülmüştür. İnkübasyon süresince biyogaz üretimi, gaz bileşimi, uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonu (UYA) ve pH değerleri takip edilmiştir [18]. Bu analizler için örnekleme laminar akış kabininde yapılmış, örnekler azot gazı ile yıkanarak havasız hale getirilen 1 mL şırıngayla alınmıştır. Gaz kompozisyonunun belirlenmesi için 1 mL biyogaz örneği, argonla yıkanmış 20 mL'lik cam viallere aktarılmıştır.

Gaz kompozisyonu, gaz kromatografi cihazı ile (Micro GC CP-2002P, Chrompack, Hollanda) belirlenmiştir. Cihazda iki kolon bulunmaktadır. Bu kolonlardan, Molsieve 5Å PLOT (uzunluk: 30 m, çap: 0.53 mm) 30 °C'de H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ve CH<sub>4</sub>'ü, diğer kolon olan HayeSep A (uzunluk: 15 m, çap: 0.53 mm, 20 µm film) ise 50 °C'de CO<sub>2</sub>'yi ayırmaktadır. Cihazda taşıyıcı gaz olarak argon kullanılmaktadır. Program başlatıldıktan sonra, numune cihaza enjekte edilmiştir. Gaz kompozisyonu ısıletkenlik dedektörü ile tespit edilmiş, MAESTRO (Chrompack) yazılımı ile analiz edilmiştir. Molsieve kolonunun detektör modu, düşük hassasiyete, HayeSep kolonunun yüksek hassasiyete ayarlanmıştır. H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve CH<sub>4</sub> gazları %100'e normalize edilmiştir. UYA ölçümü için sıvı fazdan alınan 900 µL numune, 4 °C'de ve 20817xg hızda 10 dk. santifüj edilerek süpernatant ölçüm zamanına kadar -20 °C'de saklanmıştır. Ölçüm günü, numuneler çözülürerek 0.2 µm'lik selüloz filtrelerden süzülmüş, HPLC ölçümünde bu süzüntü kullanılmıştır. Nucleogel Ion 300 OA kolonu (uzunluk: 300 mm, çap: 7.8 mm, Macherey-Nagel, Almanya) kullanılan kromatografya, fırın sıcaklığı 70 °C, enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Eluent olarak 5 µM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır (debi: 0.6 mL/dk). Numune ölçümleri 40 dk içerisinde tamamlanmış, refraktif

index dedektörü ile belirlenen içerikler CLASS-VP yazılımı ile analiz edilmiştir (Shimadzu, Japan). pH ölçümleri H138 miniLab cihazı ile yapılmıştır (Hach, Almanya).

### 2.3 Mikrobiyal çeşitlilik

Bakteriyel çeşitlilik 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini kapsayan bölge hedeflenerek ampikon dizileme yöntemi ile Illumina MiSeq platformunda analiz edilmiştir. Ham sekans dataları öncelikle Illumina bcl2fastq 1.8.4 yazılımında işlenerek numuneler birbirinden ayrılmış, sonrasında indeks ve primer sekansları kırılarak özgün sekanslar tanımlanmıştır. Kırılan özgün sekanslar RDP veri tabanı sekansları (<https://rdp.cme.msu.edu/>) ve blastn algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Sekansların her iki ucunda bulunan hizalanmamış diziler filtreleme yöntemi ile uzaklaştırılarak hata denetimi yapılmıştır. 100 bp'dan küçük diziler uzaklaştırılmıştır. İki yönlü okumalar BBMerge 34.48 ile birleştirilmiştir (<http://bbmap.sourceforge.net/>). Fastq dosyaları oluşturulduktan sonra QIIME v. 1.9.0 kullanılarak taksonomik sınıflandırma yapılmıştır. Taksonomik sınıflandırmada Greengenes referansı [19] ve RDP veri tabanı [20] kullanılmıştır. Operasyonel taksonomik birim (OTU) USEARCH kullanılarak seçilmiştir. Benzerlik %97 olarak alınmıştır. Bakteriyel komünite kompozisyonu Krona grafik ile gösterilmiştir [21]. Alfa çeşitlilik indisleri ise R studio programında kurumiçi oluşturulan kodlar ile hesaplanmıştır.

Metanojenik topluluk ise [22]'de açıklanan protokol izlenerek terminal restriksiyon uzunluk polimorfizmi (TRFLP) metodu ile belirlenmiştir.

## 3 Sonuçlar

### 3.1 Zenginleştirilmiş kültürün fizikokimyasal karakterizasyonu

Lignoselülozik biyokütle parçalayabilen mikrobiyal topluluk, *Pachnoda marginata* larvasının arka bağırsağından alınan örnek ile aşılama buğday samanının substrat olarak kullanıldığı besiyerinde zenginleştirilmiştir.

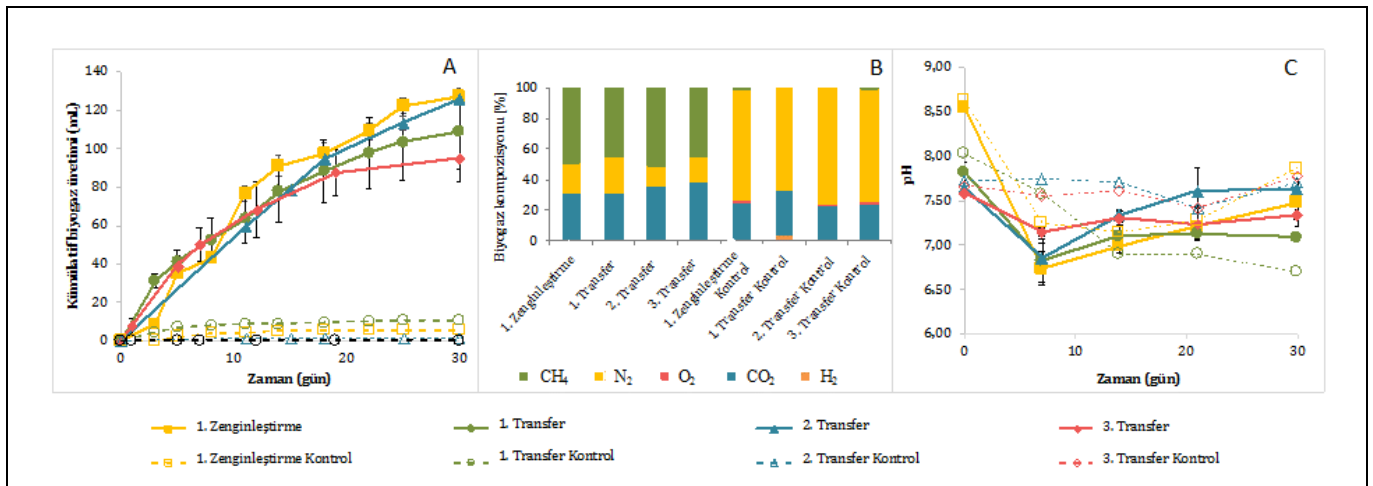
Şekil 1'de, ilk zenginleştirme ile üç başarılı transfer kültürleri için biyogaz üretimi, gaz kompozisyonu, pH değişimi verileri

gösterilmiştir. Biyogaz üretimi zaman ile artış göstermiş, 30 gün inkübasyon sonucunda kümülatif gaz üretimi ortalama 114 mL olarak ölçülmüştür. En yüksek biyogaz üretimi ilk zenginleştirme kültüründe gözlenmiş, 127 mL olarak belirlenmiştir. 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda kontrol şişelerindeki gaz üretiminin ise 10 mL'den az olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, zenginleştirilmiş kültürlerden elde edilen biyogaz miktarının, Özbayram vd tarafından rumen-orişinli geliştirilen kültürlerden daha yüksek olduğu görülmüştür [4]. Üretilen biyogazdaki metan oranının transferler arasında belirgin bir şekilde değişmediği görülmüş, biyogazın ortalama metan içeriği %48 olarak ölçülmüştür. Biyogazdaki CO<sub>2</sub> miktarı transferler arasında artış göstermiş, en yüksek oran 3. transferin 30. gününde tespit edilmiştir (%38). Kültürlerden ilk gün alınan örneklerde pH değeri 8.5 olarak ölçülmüş, sonrasındaki örneklerde ise pH değerlerinde düşüş tespit edilmiştir. Transfer kültürlerdeki pH trendine bakıldığında, pH değerlerinde genel olarak inkübasyonun ilk haftasında düşüşü (6.9±0.2) takiben yükseliş olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, sırasıyla uçucu yağ asidi (UYA) üretimi ve tüketiminin ardından metan üretiminin gerçekleşmesi ile açıklanabilir. İnkübasyon sonunda pH değerlerinin 7.1-7.5 aralığında olduğu belirlenmiştir. İnkübasyonun ilk haftasında alınan örneklerde başlıca üretilen UYA'ların asetik asit (0.75 ± 0.14 g/L) ve propiyonik asit (0.24 ± 0.07 g/L) olduğu tespit edilmiştir. 30 günlük inkübasyon süresi sonunda alınan örneklerde UYA belirlenememesinin nedeni sentrofik tüketim sonucunda metan üretimi ile açıklanabilir.

### 3.2 Mikrobiyal Kompozisyon

Çalışmada, arka bağırsak, zenginleştirilmiş kültür ve larvaların yetiştirildiği toprak numunelerinin mikrobiyal komünite profilleri incelenmiştir.

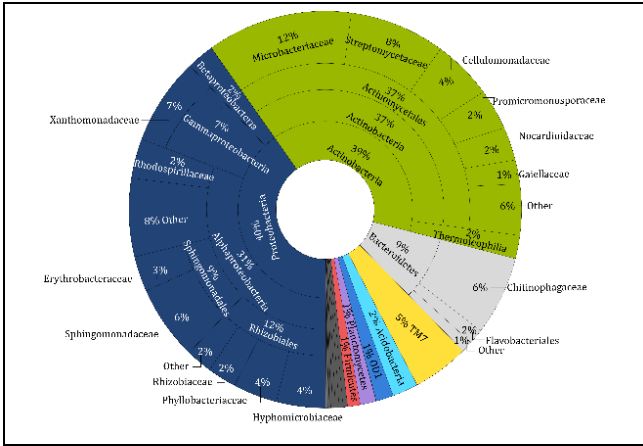
Larvaların yetiştirildiği topraktan alınan numunedeki bakteriyel topluluğun Proteobacteria (%40) ve Actinobacteria (%39) filumlarının baskın olduğu 10 filumla temsil edildiği görülmüş, bunları Bacteroidetes (%9) ve TM7 (%5) filumları takip etmiştir (Şekil 2).



(A): Kümülatif gaz üretimi. (B): 30 günlük inkübasyon sonrası gaz kompozisyonu. (C): pH değerleri (■ : 1. Zenginleştirme, ● : 1. Transfer, ▲ : 2. Transfer, ◆ : 3. Transfer).

Şekil 1. Zenginleştirilmiş kültürün fizyolojik karakterizasyonu.

Figure 1. Physiological characterization of the enrichment culture.

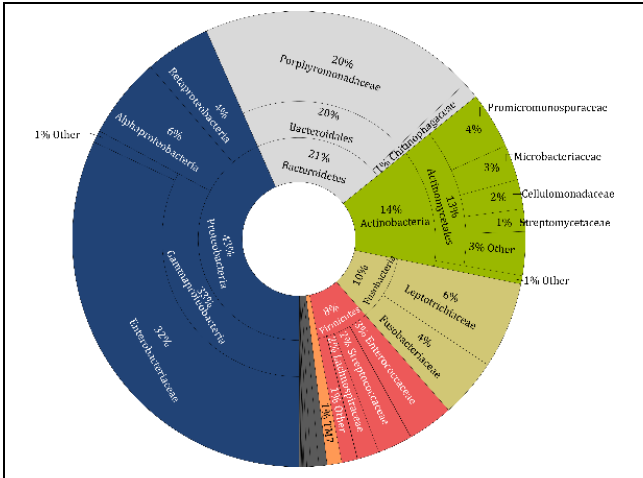


Şekil 2. *Pachnoda marginata* larvalarının tutulduğu topraktaki bakteriyel profil

Figure 2. Bacterial community profile of the soil.

Aile düzeyinde, toprak numunesindeki en yüksek göreceli bolluğa Actinobacteria filumuna mensup Microbacteriaceae ailesinin sahip olduğu tespit edilmiştir (%12). Streptomycetaceae (Actinobacteria) ve Xanthomonadaceae (Gammaproteobacteria) aileleri birlikte bakteriyel topluluğun %15'ini temsil etmektedir. Bunları Sphingomonadaceae (Proteobacteria) ve Chitinophagaceae (Bacteroidetes) izlemektedir. İncelenen numuneler arasında, toprak numunesinin en yüksek çeşitliliğe sahip ve aerobik bakterilerle baskın olduğu gözlemlenmiştir.

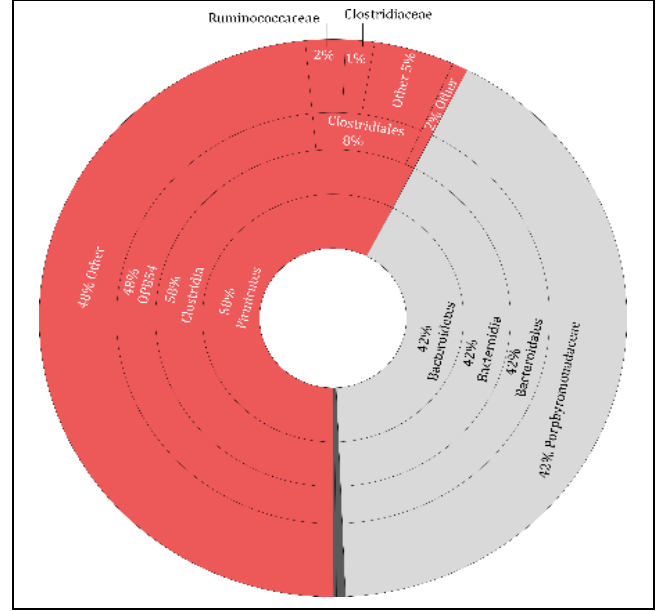
Toprak numunesinde olduğu gibi arka bağırsak numunesinde de Proteobacteria'nın en baskın filum olduğu görülmüştür. Proteobacteria üyeleri bakteriyel komünitenin %43'lük bölümünü temsil etmektedir (Şekil 3). Bunları, Bacteroidetes (%21), Actinobacteria (%14) ve Fusobacteria (%10) filumları izlemektedir. Aile düzeyinde Enterobacteriaceae'nin bakteriyel komünitenin %32'sini temsil ederek en baskın aile olduğu görülmüştür. Porphyromonadaceae üyelerinin ise bakteriyel komünitenin %20'sini oluşturduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel komüniteyi sırasıyla, Leptotrichiaceae, Fusobacteriaceae ve Promicromonosporaceae üyeleri baskılamıştır.



Şekil 3. Arka bağırsaktaki bakteriyel topluluk profili.

Figure 3. Bacterial community profile of the hindgut.

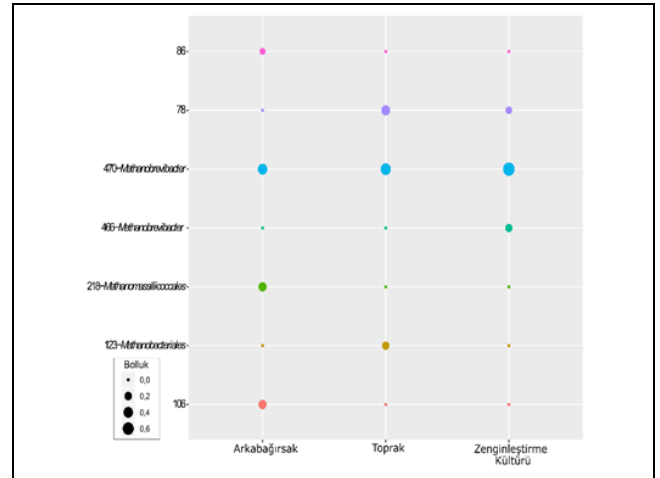
Zenginleştirilmiş kültürdeki bakteriyel komünitenin %99.3'lük kısmı Firmicutes ve Bacteroidetes'ten oluşmaktadır. Porphyromonadaceae ailesi Bacteroidetes filumunun neredeyse tamamını temsil ederken, Firmicutes filumu Clostridia sınıfının kültüre alınamamış üyelerinden oluşmaktadır (%48 OPB54 sınıfı, %8 Clostridiales) (Şekil 4).



Şekil 4. Zenginleştirilmiş kültürün bakteriyel profili.

Figure 4. Bacterial community profile of the enrichment culture.

Amplikon sekans datasından hesaplanan çeşitlilik indisleri Tablo 1'de özetlenmiştir. En yüksek Operasyonel taksonomik birim (OTU) sayısı ile indisler toprak örneği için hesaplanmıştır. Böylece üç numune arasında bakteriyel çeşitliliğin en yüksek olduğu örneğin toprak numunesi olduğu tespit edilmiştir. Beklendiği gibi arka bağırsak bakteriyel topluluğunun zenginleştirilmiş kültürden daha çeşitli ve zengin olduğu gözlemlenmiştir. Numunelerin metanojenik topluluk profilleri T-RFLP yöntemi ile incelenmiş, Şekil 5'te sunulmuştur.



Şekil 5. Numunelerdeki metanojen kompozisyonu.

Figure 5. Methanogenic community compositions of all samples.

Tablo 1. Bakteriyel çeşitlilik indis hesaplamaları.

Table 1. Bacterial diversity indices.

Örnek	OTU	Shannon-Weiener	Simpson	Chao1
Arka bağırsak	443	3.52	0.91	539
Toprak	588	4.83	0.98	697
Zenginleştirilmiş kültür	133	1.87	0.73	175

Tüm numunelerde metanojenlerin büyük bir kısmını *Methanobrevibacter* (T-RF 470) oluşturmaktadır. Toprak mikroflorasının, yersolucanı gibi toprakta yaşayan canlıların bağırsak mikrobiomları üzerine etki ettiği bilinmektedir [23]. Bu da *Methanobrevibacter*'in *Pachnoda marginata* larvasının arka bağırsağındaki baskınlığını açıklayabilmektedir. Diğer yandan, topraktaki *Methanobrevibacter* yoğunluğu larvaların dışkılarında da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Actinobacteria filumunu Microbacteriaceae, Cellulomonadaceae ve Streptococcaceae'nin domine ettiği görülmüştür. Bu ailelerin üyelerinin glikoz, maltoz, selüloz gibi çeşitli karbonhidratları parçalayabildiği bilinmektedir [24],[25]. Actinobacteria üyelerinin bazıları metabolik fonksiyonlarını aerobik ortamda gerçekleştirmektedir. *Pachnoda marginata* larvasında arka bağırsak, mikrobiyal selüloz degradasyonunun gerçekleştiği ana bölme olarak kabul edilmekte, rumen sistemleri ile benzerlik göstermektedir [8]. Arka bağırsak mikrobiyomunun %32'sini oluşturan Enterobacteriaceae üyeleri glikoz, sellobiyoz gibi çeşitli karbonhidratları fermente edebilen fakültatif anaerobik organizmalardır [26].

Seçici zenginleştirme çalışmaları sonrasında bakteriyel komünitenin değiştiği, beklendiği üzere çeşitliliğinin azaldığı görülmüştür. Aile düzeyinde tanımlanabilen diziler incelendiğinde, dizilerin büyük bir kısmının Porphyromonadaceae ailesine mensup olduğu belirlenmiştir. Bu aileye mensup üyeler şeker moleküllerini asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit gibi çeşitli fermantasyon ürünlerine dönüştürebilmektedir [27]. Buna karşın, Porphyromonadaceae üyeleri lignoselülozik substratı doğrudan kullanamaz. Kültür şişelerindeki UYA üretiminin Porphyromonadaceae ile zenginleştirilmiş kültürdeki mikrobiyal topluluk içerisindeki simbiyotik ilişki sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda, farklı türdeki ruminantlardan (keçi, koyun ve inek) ve lignoselülozik substrata alıştırılmış anaerobik sistemden lignoselüloz degrade edebilen metanojenik komünite geliştirilmiştir [2],[4],[5]. Çalışmalarda elde edilen rumen-orijinli kültürlerde Porphyromonadaceae üyeleri zenginleştirilemezken, lignoselülozik atığa alıştırılan anaerobik reaktörden alınan aşından zenginleştirilen kültürün önemli bir kısmının Porphyromonadaceae üyelerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, toprak ve arka bağırsak metanojenik toplulukları arasında bir etkileşim olduğunu ortaya koymuş, fakat komünitenin orijini hakkında bir sonuca varılamamıştır. Zenginleştirilmiş kültürün metanojen profili arka bağırsak ile benzerlik göstermekte, hidrogenotrofik metanojenlerle baskılanmaktadır. En baskın olduğu tespit edilen *Methanobrevibacter* üyeleri fermantasyon sonucu üretilen format ve hidrojeni kullanarak metan üretmektedir [28]. Buradan, kültür şişelerindeki metan üretiminin hidrogenotrofik metanojenik yolağı izlediği anlaşılmaktadır.

## 4 Sonuçlar

Çalışma sonucunda, *Pachnoda marginata* larvasının bağırsak sisteminden kompleks lignoselülozik biyokütleyi başarılı bir şekilde parçalayabilen mikrobiyal kültür zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme sırasında bakteriyel topluluk üzerinde önemli bir değişiklik meydana gelirken, metanojen profili bağırsak sistemi ile larvaların üzerinde büyütüldüğü toprağın profili ile benzerlik göstermiştir. İleriki çalışmalarda, geliştirilen selülozik kültürün anaerobik çürütücülerde bioaugmentasyon kültürü olarak kullanımı ve metan üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

## 5 Conclusions

Overall, microbial culture which can successfully break down complex lignocellulosic biomass was enriched from the intestinal tract of *Pachnoda marginata* larva. While the enrichment procedure revealed a significant change in the bacterial community structure, the methanogen profile was similar to that of the intestinal tract and the soil on which the larvae were grown. In further studies, it is aimed to use developed cellulosic culture as a bioaugmentation culture in anaerobic digesters and assess their effects on methane production.

## 6 Kaynaklar

- [1] Zhong W, Zhang Z, Luo Y, Sun S, Qiao W, Xiao M. "Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production". *Bioresource Technology*, 102, 11177-11182, 2011.
- [2] Özbayram EG, Kleinsteuher S, Nikolausz M, İnce B, İnce O. "Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw". *Anaerobe*, 46, 122-130, 2017.
- [3] Akyol Ç, İnce O, Bozan M, Özbayram EG, İnce B. "Biological pretreatment with *Trametes versicolor* to enhance methane T production from lignocellulosic biomass: A metagenomic approach". *Industrial Crops & Products*, 140, 1-10, 2019.
- [4] Özbayram EG, Kleinsteuher S, Nikolausz M, İnce B, İnce O. "Enrichment of lignocellulose-degrading microbial communities from natural and engineered methanogenic environments". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 1035-1043, 2018.
- [5] Özbayram EG, Akyol Ç, İnce B, Karakoc C, İnce O. "Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure". *Journal of Applied Microbiology*, 124, 491-502, 2018.
- [6] Egert M, Wagner B, Lemke T, Brune A, Friedrich MW. "Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae)". *Applied Environmental Microbiology*, 69, 6659-6668, 2003.

- [7] Takasuka TE, Book AJ, Lewin GR, Currie CR, Fox BG. "Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*". *Scientific Reports*, 3(1030), 1-10, 2013.
- [8] Lemke T, Stingl U, Egert M, Friedrich MW, Brune A. "Physicochemical Conditions and Microbial Activities in the Highly Alkaline Gut of the Humus-Feeding Larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae)". *Applied Environmental Microbiology*, 69, 6650-6658, 2003.
- [9] Morrison M, Pope PB, Denman SE, McSweeney CS. "Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new?" *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 358-363, 2009.
- [10] Bayané A, Guiot SR. "Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass". *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10, 43-62, 2011.
- [11] Huang SW, Zhang HY, Marshall S, Jackson TA. "The scarab gut: A potential bioreactor for bio-fuel production". *Insect Science*, 17, 175-183, 2010.
- [12] Huang S, Sheng P, Zhang H. "Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of holotrichia parallela larvae (Coleoptera: Scarabaeidae)". *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2563-2577, 2012.
- [13] Cazemier AE, Verdoes JC, Reubsat FAG, Hackstein JHP, van der Drift C, Op den Camp HJM. "*Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*". *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of Molecular Medicine*, 83, 135-148, 2003.
- [14] Watanabe H, Tokuda G. "Cellulolytic Systems in Insects". *Annual Review of Entomology*, 55, 609-632, 2010.
- [15] Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M. "Potential applications of insect symbionts in biotechnology Targeting insect-microbe symbioses for biotechnological applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1567-1577, 2016.
- [16] Sheng P, Huang J, Zhang Z, Wang D, Tian X, Ding J. "Construction and characterization of a cellulolytic consortium enriched from the hindgut of holotrichia parallela larvae". *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 2-12, 1646, 2016.
- [17] Özbayram EG, Kleinstauber S, Nikolausz M, Ince B, Ince O. "Bioaugmentation of anaerobic digesters treating lignocellulosic feedstock by enriched microbial consortia". *Engineering in Life Sciences*, 18(7), 440-446, 2018.
- [18] Porsch K, Wirth B, Tóth EM, Schattenberg F, Nikolausz M. "Characterization of wheat straw-degrading anaerobic alkali-tolerant mixed cultures from soda lake sediments by molecular and cultivation techniques". *Microbial Biotechnology*, 8, 801-814, 2015.
- [19] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A. "An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea". *ISME Journal*, 6, 610-618, 2012.
- [20] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Colen JR. "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy". *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261-5267, 2007.
- [21] Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. "Interactive metagenomic visualization in a Web browser". *BMC Bioinformatics*, 12(385), 1-9, 2011.
- [22] Sträuber H, Bühligen F, Kleinstauber S, Nikolausz M, Porsch K. "Improved anaerobic fermentation of wheat straw by alkaline pre-treatment and addition of alkali-tolerant microorganisms". *Bioengineering*, 2, 66-93, 2015.
- [23] Depkat-Jakob PS, Hunger S, Schulz K, Brown GG, Tsai SM, Drake HL. "Emission of methane by *Eudrilus eugeniae* and other earthworms: From Brazil". *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3014-3019, 2012.
- [24] Lory S. *The Family Mycobacteriaceae*. Editors: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes*, 571-575, Berlin, Heidelberg, Germany, Springer, 2014.
- [25] Stackebrandt E, Schumann P, Prauser H. *The Family Cellulomonadaceae*. Editors: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes*, 983-1001, Berlin, Heidelberg, Germany, Springer, 2006.
- [26] Octavia S, Lan R. *The Family Enterobacteriaceae*. Editors: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes*, 225-286, Berlin, Heidelberg, Germany, Springer, 2014.
- [27] Sakamoto M. *The Family Porphyromonadaceae*. Editors: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes*, 811-824, Berlin, Heidelberg, Germany, Springer, 2014.
- [28] Janssen PH, Kirs M. "Structure of the archaeal community of the rumen". *Applied Environmental Microbiology*, 74, 3619-3625, 2008.