



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUMEN BAKTERİYEL VE FUNGAL POPULASYON
DİNAMİĞİNİN RT-PCR İLE MOLEKÜLER
DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

ALTUĞ KARAMAN

DOKTORA TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RUMEN BAKTERİYEL VE FUNGAL POPULASYON
DİNAMİĞİNİN RT-PCR İLE MOLEKÜLER
DÜZEYDE BELİRLENMESİ

ALTUĞ KARAMAN

Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Altuğ Karaman tarafından hazırlanan “RUMEN BAKTERİYEL VE FUNGAL POPULASYON DİNAMİĞİNİN RT-PCR İLE MOLEKÜLER DÜZEYDE BELİRLENMESİ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/10/2018 tarihinde oy birliği ile Zootekni Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

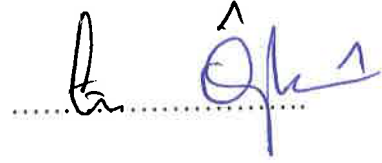
Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ (DANIŞMAN)



Zootekni Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE (ÜYE)



Zootekni Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Mesut KARAMAN (ÜYE)



Zootekni Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Bahri Devrim Özcan (ÜYE)



Zootekni Anabilim Dalı

Çukurova Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Bülent KAR (ÜYE)



Tunceli Meslek Yüksekokulu

Munzur Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKEİ



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Altuğ KARAMAN



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi bilimsel araştırma projesi koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2016/3-47 D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

RUMEN BAKTERİYEL VE FUNGAL POPULASYON DİNAMİĞİNİN RT-PCR İLE MOLEKÜLER DÜZEYDE BELİRLENMESİ

(DOKTORA TEZİ)

Altuğ KARAMAN

ÖZET

Ruminantlar, rumende yaşayan anaerobik mikroorganizmaların üretmiş olduğu yüksek aktiviteli fibrolitik enzimler sayesinde tüketmiş oldukları bitkisel materyali tek mideli herbivorlara göre daha yüksek oranlarda parçalama yeteneğine sahiptirler. Ruminantlar, özellikle konakçı hayvanın başlıca diyetinin büyük miktarda bitki kaynaklı selüloz ve hemiselüloz ihtiva ettiği rumenlerinde (düşük redoks potansiyeline sahip yüksek düzeyde anaerobik bir ortam olan) yaşayan mikroorganizmalar ile simbiyotik bir ilişki göstermektedir. Buna karşılık, konakçı hayvan bu mikroplar için ısı, anaerobik koşullar, su ve enerji kaynakları girdileri sağlar. Rumenin fonksiyonel mikroorganizma populasyonunu genel anlamda bakteriler, funguslar, protozoa ve arkea grubu oluşturmaktadır. Bakteriler ve funguslar, çoğu otçulların gastrointestinal bölgeden alınan bitki biyokütlesinin sindiriminde önemli bir rol oynar. Bu tez kapsamında farklı meralarda beslenen sığır, koyun ve keçilerde rumenin mikrobiyal popülasyonunun moleküler teknikler yardımıyla kantitatif olarak belirlenmesi ve farklı diyetlerin rumen mikrobiyal dinamiğine etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla, Kahramanmaraş'ta 6 farklı ilçeden sığır, koyun ve keçilerden (toplam n = 48) taze olarak toplanan dışkı örnekleri laboratuvara ulaştığında MPN analizi için kullanılmıştır. Dışkı örneklerinin kalan kısmı, toplam DNA ekstraksiyonu için kullanım sağlanana kadar -20 °C'de tutulmuştur. Rumen mikroorganizmalarının başlıca grupları, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Neocallimastix* ve *Orpinomyces*'i hedef alan yeni tasarlanmış primerler kullanılarak, RT-PCR kullanılarak hem grup hem de tekli cins/tür düzeyinde kantitatif olarak belirlenmiştir. Fungus popülasyonu olarak, hayvanların tüm dışkı örnekleri için çoğunlukla *Neocallimastix spp.* (*Orpinomyces spp.* ile karşılaştırarak) belirlenmiştir. İnek ve koyundan alınan dışkı örnekleri *Ruminococcus albus* ile karşılaştırıldığında daha fazla *Fibrobacter succinogenes* barındırmıştır, ancak *Ruminococcus albus* keçilerden toplanan dışkı örneklerinde daha baskın olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, rumen mikrobiyal ekosisteminin dinamiği ve yapısı hakkındaki bilgimizi ve ayrıca beslenme rejimi ve mikrobiyal dinamikler arasındaki ilişkiyi genişletmek için yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Real-Time PZR, Rumen Mikroorganizmaları.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı, Ekim/2018

Danışman: Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ

Sayfa sayısı: 156



**MONITORING OF RUMEN BACTERIAL AND FUNGAL POPULATION
DYNAMICS BY RT-PCR AT MOLECULAR LEVEL
(PhD. THESIS)**

Altuğ KARAMAN

ABSTRACT

Ruminant animals digest the ingested plant material more efficiently than non-ruminant herbivores due to their active rumination systems and powerful fibrolytic enzymes produced by microorganisms inhabiting the rumen. Ruminants have a symbiotic association with the microorganisms which live in their rumen (which is a highly anaerobic environment with low redox potential), particularly where the main diet of the host animal contains large amount of plant derived celluloses and hemicelluloses. In return, host animal provides inputs of heat, anaerobic conditions, water and energy sources for these microbes. Main functional microbial groups of the rumen are bacteria, fungi, archaea and protozoa. Bacteria and fungi play pivotal role in the biodegradation of ingested plant biomass in the gastro intestinal tract of the most herbivores. In this thesis the microbial population dynamics of rumen in cows, sheep and goats fed different types of pastures were quantitatively determined with the aid of molecular techniques. For this purpose, faecal samples collected freshly from cow, sheep and goat (total n=48) located in 6 different province of Kahramanmaraş and they were used for MPN analysis as soon as they were arrived to laboratory. Remaining part of the faecal samples were kept in -20°C until further usage for total DNA extraction. Main groups of the rumen microbes were quantitatively determined both as group and individually at genus/species level using RT-PCR by using newly designed primers targeting *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Neocallimastix spp.* and *Orpinomyces spp.* As fungal population, *Neocallimastix spp.* were determined mostly (comparing with *Orpinomyces spp.*) for all faecal samples regardless of animal. Faecal samples, taken from cow and sheep, harboured more *Fibrobacter succinogenes* compare to *Ruminococcus albus*, although *R.albus* dominated the faecal samples collected from goat. These results will be helpful to extent our knowledge about dynamics and structure of rumen microbial ecosystem, and moreover, about the relationship between feeding regime and microbial dynamics.

Key words: Real-Time PCR, Rumen microorganisms.

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science, October/2018

Supervisor: Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ

Page number: 156



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında göstermiş oldukları her türlü yardım, rehberlik ve çok değerli katkılarından dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ olmak üzere katkı, eleştiri ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni cesaretlendiren tez izleme komisyonu üyeleri Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE ve Prof. Dr. İsmail AKYOL hocalarıma yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni her zaman destekleyen ve bugünlere gelmemde emekleri büyük olan aileme de teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda yardımını esirgemeyen eşim yüksek gıda mühendisi Hülya KOCA KARAMAN'a ve savaşçı kızım Alya Begüm'e teşekkür ederim.

BİGEM laboratuvarında geçirdiğimiz yıllar içerisinde çok değerli arkadaşlıkları ve yardımları için Dr. Ferit Can YAZDIÇ, Arş. Gör. Tuğçe TURGUT, Arş. Gör. Fatma Gül DEMİRBANKA, Kübra EKİNCİ, Büşra UZDİL ve Nebal HAMAM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Altuğ KARAMAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Ruminant sindirim sistemi	3
1.1.1. Rumen	4
1.1.2. Retikulum	5
1.1.3. Omasum	5
1.1.4. Obomasum	6
1.2. Rumen Ekosistemi	6
1.2.1. Rumen mikroorganizmaları	7
1.2.1.1. Rumen bakterileri	8
1.2.1.1.1. <i>Fibrobacter succinogenes</i>	10
1.2.1.1.2. <i>Ruminococcus albus</i>	11
1.2.1.2. Rumen Fungusları	12
1.2.1.2.1. Anaerobik Fungusların Klasik ve Pragmatik Taksonomisi	13
1.2.1.2.2. Hayat döngüsü	14
1.2.1.2.3. Anaerobik Fungusların Metanojenler ve Bakterilerle Etkileşimleri	15
1.2.1.2.4. Anaerobik Fungusların Lignoselülozik Enzimleri ve Bunların Potansiyel Kullanımı	16
1.2.1.2.5. Anaerobik Fungal Selülozomlar	18
1.2.1.3. Rumen Protozoaları	19
1.2.1.4. Rumen Arkeaları	20
1.2.1.5. Diğer Rumen Mikroorganizmaları	21
1.3. Rumen Ekosistemindeki Farklı Mikroorganizma Grupları Arasındaki İlişkiler	21
1.4. Rumen Ekosistemini Etkileyen Faktörler	23
1.5. Rumen Mikroorganizmaları Tarafından Bitki Hücre Duvarı Parçalanması	24
1.5.1. Bitki Hücre Duvarlarının Yapısı	25
1.5.1.1. Selüloz	26
1.5.1.2. Ksilan	27
1.5.1.3. Lignin	27

1.5.1.4. Pektin ve Proteinler	28
1.5.1.5. Likenan	29
1.5.2. Karbonhidratları Parçalayan Enzimler	29
1.5.3. Selülozun Mikroorganizmalar Tarafından Biyodegradasyonu.....	30
1.6. Rumen Mikroorganizmalarının Tanımlanmasında Kullanılan Bölgeler	31
1.6.1. Bakteriler için 16S	31
1.6.2. Funguslar için ITS (Internal transcribed spacer)	31
1.7. Rumen Mikrobiyal Popülasyonun Belirlenmesi	32
1.7.1. Manuel Olarak belirleme	32
1.7.2. Moleküler Tekniklerle Belirleme (Real-Time PZR)	32
1.8. Çalışmanın Önemi ve Amacı.....	37
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	38
3. MATERYAL VE METOD	50
3.1. Materyal.....	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	50
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Temel Alet ve Ekipmanlar	50
3.1.3. Bakteri ve Fungus Suşları.....	50
3.2. Metot.....	52
3.2.1. Dışkı Örnekleri Toplanması	52
3.2.2. Funguslar için Anaerobik Besi Ortamının Hazırlanması ve Kullanılan Antibiyotikler	54
3.2.3. Rumen Bakterilerinin Gelişme Ortamı Hazırlanması	55
3.2.3.1. LB besi Ortamının Hazırlanması	56
3.2.3.2. Anaerobik Besi Ortamında Kullanılan Antibiyotikler.....	56
3.2.4. Fungus İzolasyonu.....	57
3.2.4.1. Anaerobik Fungusların Saflaştırılması	57
3.2.4.2. Morfolojik Tanımlama	57
3.2.4.3. Anaerobik Fungusların Tanımlanması	58
3.2.4.4. Anaerobik Fungusların Alt Kültürlere Alınması	60
3.2.4.5. Fungus Stoklarının Oluşturulması	61
3.2.4.6. Fungal Popülasyonun Manuel Olarak Belirlenmesi	62
3.2.4.7. Rumen Bakteri Popülasyon büyüklüğünün Manuel Olarak Belirlenmesi....	62
3.2.5. DNA İzolasyonu	63
3.2.5.1. Dışkıdan Toplam DNA İzolasyonunu	63
3.2.5.2. Bakteri Örneklerinden DNA İzolasyonu	64
3.2.5.3. Anaerobik Funguslardan Genomik DNA İzolasyonu	64
3.2.6. Moleküler Biyoloji Metodları.....	65

3.2.6.1. Konvensiyonel PZR.....	65
3.2.6.2. Eş Zamanlı PZR Protokolü (Real-Time PZR).....	66
3.2.6.3. Real-Time PZR için Fungus ve Bakteri DNA Standartlarının Oluşturulması	66
3.2.6.4. Real Time PZR çalışması için primerler ve problemlerin tasarlanması	67
3.2.6.5. İstatistiksel analizler	69
3.2.7. Enzim Çalışmaları	69
3.2.7.1. Protein Tayini	69
3.2.7.2. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması.....	70
3.2.7.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	70
3.2.7.4. Enzimlerin Çalıştığı Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	70
3.2.7.5. Enzimlerin Çalıştığı Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	71
3.2.7.6. Enzimlerin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi	71
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	72
4.1. Dışkı Örneklerinin Tanımlanması ve Anaerobik Fungus İzolasyonu	72
4.1.2. Toplanan Örneklerdeki Anaerobik Fungus Miktarının Manuel Sayım Yöntemiyle Belirlenmesi	73
4.2. Konvensiyonel PZR Yaklaşımı ile Örneklerde Hedef Mikroorganizma Varlığının Belirlenmesi.....	78
4.2.1. Anaerobik Fungusların Konvensiyonel PZR ile Belirlenmesi	79
4.2.2. Anaerobik Bakterilerin Konvensiyonel PZR ile Belirlenmesi	80
4.2.3. Toplanan Örneklerde Anaerobik Rumen Fungus Varlığının Moleküler Belirlenmesi.....	82
4.2.4. Toplanan Örneklerde Anaerobik Rumen Bakteri Varlığının Moleküler Belirlenmesi.....	83
4.3. Eş zamanlı PZR İle Mikroorganizmaların Kantitatif Olarak Belirlenmesi	84
4.3.1. Uniplex RT-PZR ile Anaerobik Fungus Yoğunluğunun Belirlenmesi	87
4.3.1.1. Neocallimastix spp. Real Time PZR Standartının Belirlenmesi	87
4.3.1.2. Orpinomyces spp. Real Time PZR standartının belirlenmesi	89
4.3.2. Uniplex RT-PZR ile Anaerobik Bakteri Yoğunluğunun Belirlenmesi	90
4.3.2.1. Ruminococcus albus RT-PZR Standartının Belirlenmesi	90
4.3.2.2. Fibrobacter succinogenes Real Time PZR Standartının Belirlenmesi	91
4.3.3. Örneklerde Mikroorganizma Miktarının Belirlenmesi.....	93
4.3.4. Mikrobiyal dağılımının belirlenmesi	98
4.4. Multiplex Real Time PZR Sonuçları	108
4.4.1. Rumen mikroorganizmalarının mikrobiyal popülasyonlarının belirlenmesi	116
4.5. Prokaryotik ve Protozoal Popülasyonların Kültür Bazlı ve Mikroskopik Yöntemlerle Sayılması	121

4.6. Anaerobik Fungusların Farklı Substratlarda Enzim Aktivitesinin Araştırılması	124
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	131
6. KAYNAKLAR.....	132
7. ÖZGEÇMİŞ.....	165



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Ruminant sindirim sisteminin sadeleştirilmiş şematik diyagramı	4
Şekil 1.2. Anaerobik fungusların yaşam döngüsü	15
Şekil 1.3. Anaerobik funguslardaki ITS bölgesi ve rRNA bölgeleri.....	32
Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı ilçeleri gösteren Kahramanmaraş haritası.....	54
Şekil 3.2. Anaerobik rumen besi ortamı hazırlanması.....	56
Şekil 3.3. Saflaştırma işlemi yapılan agarlı Hungate tüpü.....	58
Şekil 3.4. Fungus gelişimi ve tanımlanması için kullanılan mikroskoplar.....	58
Şekil 3.5. Rumen funguslarının alt kültüre alınması ve manuel sayım için kullanılan düzenek.....	60
Şekil 3.6. Rumen fungus kültürlerinin karyovialler içerisinde alüminyum kamışlara sabitlenerek sıvı azot içerisine bırakılması.....	61
Şekil 3.7. Fungus izolasyonu yapılan dışkı örnekleri.....	62
Şekil 3.8. Real Time PZR standartına ait Ct görüntüleri.....	67
Şekil 4.1. İnek örneklerinde fungus TFU sayıları	74
Şekil 4.2. Koyun örneklerinde fungus TFU sayıları.....	75
Şekil 4.3. Keçi örneklerinde fungus TFU sayımı.....	75
Şekil 4.4. Enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren anaerobik besi ortamında gelişen funguslar.....	76
Şekil 4.5. CTAB metodu ile dışkı örneğinden elde edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	77
Şekil 4.6. <i>Neocallimastix</i> ve <i>Orpinomyces</i> fungusları	78

Şekil 4.7. Funguslar için tasarlanan primer setlerinin kontrolü amacıyla yapılan PZR.....	79
Şekil 4.8. <i>Ruminococcus albus</i> ve <i>Fibrobacter succinogenes</i> mikroskop görüntüsü	79
Şekil 4.9. Bakteriler için tasarlanan primer setlerinin kontrolü amacıyla yapılan PZR.....	80
Şekil 4.10. <i>Neocallimastix sp.</i> anaerobik fungusunun jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.11. <i>Orpinomyce sp.</i> anaerobik fungusunun jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.12. <i>Ruminococcus albus</i> anaerobik rumen bakterisinin jel görüntüsü.....	82
Şekil 4.13. <i>Fibrobacter succinogenes</i> anaerobik rumen bakterisinin jel görüntüsü...	82
Şekil 4.14. Real Time PZR amplifikasyon grafiğinin şematik gösterimi.....	84
Şekil 4.15. <i>Neocallimastix spp.</i> Real time PZR standartı.....	86
Şekil 4.16. <i>Orpinomyces spp.</i> Real-Time PZR standartının oluşturulması.....	87
Şekil 4.17. <i>Ruminococcus Albus</i> RT-PZR standartının oluşturulması.....	89
Şekil 4.18. <i>Fibrobacter Succinogenes</i> Real-Time PZR standartının oluşturulması...	90
Şekil 4.19. Sığır örneklerinde <i>Neocallimastix</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri.....	97
Şekil 4.20. Sığır örneklerinde <i>Orpinomyces</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği...	97
Şekil 4.21. Sığır örneklerinde <i>R.Albus</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	98
Şekil 4.22. Sığır örneklerinde <i>F.Succinogenes</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	99
Şekil 4.23. Koyun örneklerinde <i>neocallimastix</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	101
Şekil 4.24. Koyun örneklerinde <i>Orpinomyces</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği	102
Şekil 4.25. Koyun örneklerinde <i>Ruminococcus albus</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	102

Şekil 4.26. Koyun örneklerinde <i>F.Succinogenes</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	103
Şekil 4.27. Keçi örneklerinde <i>Neocallimastix</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği	104
Şekil 4.28. Keçi örneklerinde <i>Orpinomyces</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği	104
Şekil 4.29. Keçi örneklerinde <i>Ruminococcus albus</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	105
Şekil 4.30. Keçi örneklerinde <i>Fibrobacter succinogenes</i> DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği.....	106
Şekil 4.31. Sığır örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği.....	112
Şekil 4.32. Koyun örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği.....	113
Şekil 4.33. Keçi örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği.....	114
Şekil 4.34. Enzim aktivitesi için KMSaz optimum örneklerin belirlenmesi.....	124
Şekil 4.35. Enzim aktivitesi için ksilanaz optimum örneklerin belirlenmesi.....	124

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve temin edilen firma.....	51
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan standartlar ve alındığı yerler.....	52
Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler, kimyasallar ve miktarları.....	52
Çizelge 3.4. Toplanan dışkı örneklerine ait bilgiler.....	54
Çizelge 3.5. Anaerobik besiyeri içeriği.....	55
Çizelge 3.6. LB besiyeri.....	56
Çizelge 3.7. Anaerobik fungus ortamında bakteri gelişiminin engellenmesi için kullanılan antibiyotikler.....	57
Çizelge 3.8. anaerobik fungusları cins düzeyinde tanımlama anahtarı. Orpin (1994) tarafından geliştirilen tanımlama anahtarı.....	59
Çizelge 3.9. Bakteri ve Fungus Standart DNA dilüsyonları.....	66
Çizelge 3.10. Konvensiyonel PZR ve Real-Time PZR için tasarlanan primer ve proplar.....	67
Çizelge 4.1. Dışkı örneklerinin alındığı yerler ve fungus üremesi gösteren örnek sayısı.....	72
Çizelge 4.2. Dışkı örneklerinin ait olduğu hayvanlar ve fungus üremesi.....	72
Çizelge 4.3. <i>Neocallimastix spp</i> standart DNA dilusyonları.....	86
Çizelge 4.4. <i>Orpinomyces spp</i> standart DNA dilusyonları.....	88
Çizelge 4.5. <i>Ruminococcus Albus</i> standart DNA dilusyonları.....	89
Çizelge 4.6. <i>Fibrobacter Succinogenes</i> standart DNA dilusyonları.....	90
Çizelge 4.7. Sığır örneklerinde primer ve proplar ile elde edilen Ct değerleri	91
Çizelge 4.8. Koyun örneklerinde primer ve proplar ile elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonları.....	92
Çizelge 4.9. Keçi örneklerinde primer ve proplar ile elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonları.....	95

Çizelge 4.10. Sığır örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları.....	108
Çizelge 4.11. Koyun örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları.....	110
Çizelge 4.12. Keçi örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları.....	111
Çizelge 4.13. Artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi.....	124
Çizelge 4.14. Farmaton katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi.....	125
Çizelge 4.15. Kızılçam artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi.....	125
Çizelge 4.16. Artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi.....	126
Çizelge 4.17. Farmaton katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi.....	127
Çizelge 4.18. Kızılçam artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi.....	127

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	:	Adenin difosfat
ATP	:	Adenin trifosfat
bç	:	Baz çifti
BİGEM	:	Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı
BSA	:	Bovin serum albümin
Ct	:	Threshold cycle
CTAB	:	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DNS	:	3-5 dinitrosalisilik asit
dH₂O	:	Distile su
dNTP	:	Deoksi nükleotid trifosfat
Et-Br	:	Etidium Bromür
EDTA	:	Ethylendinitrilotetraasetat
HCl	:	Hidroklorik asit
ITS	:	Internal transkriptional spacer
KMSaz	:	Karboksi metil selülaz
LB	:	Luria-Bertani
lt	:	Litre
ml	:	Mililitre
µl	:	Mikrolitre
NDF	:	Nötral deterjan fiber
NAD / NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NDF	:	Nötral deterjan fiber
OD	:	Optik yoğunluk

PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	:	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SH	:	Standart hata
T_m	:	Primer erime sıcaklığı
TBE	:	Tris, Borik asit, EDTA
TE	:	Tris, EDTA
UV	:	Ultra viyole
V	:	Volt

1. GİRİŞ

Otçul hayvanlar bitki selülozik materyallerini, ön ve arka bağırsakta simbiyotik olarak bulunan bağırsak mikroorganizmalarının fermentasyonu yoluyla uçucu yağ asitlerine dönüştürerek bir enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar (Forsberg ve ark. 1997). Bitki materyalinin sindirimi ve enerji gereksinimi için dönüşümü, rumendeki mikroorganizmaların karmaşık simbiyotik ilişkisi yoluyla gerçekleştirilir (Mackie, 1997). Ruminant otoburların, bitki materyalinden enerji elde etmesi, rumendeki mikrobiyotik fermentasyona bağlıdır. Hayvanlardaki verimliliği artırabilmek için; rumenin fonksiyonu, yem diyetlerindeki kolayca fermente olabilen karbonhidratlar ve katkı maddeleri ile takviye ederek manipüle edilebilir (Jouany, 1994; Jouany ve ark., 2000). Bununla birlikte, bu tür beslenme bazen mikrobiyal popülasyonlardaki düzensizliği nedeniyle rumende fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (Mosoni ve ark., 2007). Buna en iyi örnek yemlik diyetlerin kolayca fermente edilebilir karbonhidratlarla desteklenmesinin, rumendeki lifli besinlerin yıkımına mani olduğu gösterilebilir (Mosoni ve ark., 2007). Zootečni alanında, son yıllarda yapılan araştırmalarda, simbiyotik mikroorganizmaların fizyolojisini ve ekolojisini keşfetmek için ruminantların rumenine odaklanmıştır (Kobayashi, 2006). Mikroorganizmaların bileşimi ve oranı genellikle diyet, beslenme sıklığı, yaş, coğrafi konum ve ruminant-konak etkileşimi gibi dış etkenlerden etkilenmektedir (Hungate, 1966; Dehority ve Orpin, 1997). Bu etkileşimin daha iyi anlaşılması için araştırmacılar; yağ asidi metabolizması, liflerin sindirimi, metanogenez ve bakteriyel sindirim gibi rumen içerisinde meydana gelen olayların gerçekleşmesini sağlayan mikrobiyal üyeleri daha ayrıntılı incelemişlerdir (Mackie, 1997). Araştırmalarda rumen mikroorganizmaları için uygun koşullar sağlayarak diyetin sindirim ve fermentasyonun optimizasyonu yoluyla hayvansal üretimin maksimize edilmesini sağlamaktadır (Kobayashi, 2006). Özgül mikrobiyal grupların aktivasyonu ve inaktivasyonu diğer yöntemlerin yanı sıra farklı besleme tipleri, besleme kombinasyonları ve yem katkıları kullanılarak diyet manipülasyonu ile gerçekleştirilir (Krause ve ark. 2003; Kobayashi ve ark. 2004). Rumen'in mikrobik ekosistemi, yemlerin uçucu yağ asitlerine biyolojik olarak dönüşümü işlevini yerine getirmek için oluşturulmuş tam bir denge halindedir. Aynı zamanda sağlıklı bir ruminant yem, içme suyu ve hava yoluyla her gün milyonlarca mikroba maruz kalır ancak buna rağmen rumen ekosistemi bu durumdan etkilenmez (Kamra, 2005). Mikroorganizma

popölasyonu beslenmenin değişimine adapte olacak şekilde değişecek bir ekosisteme sahiptir yani dinamiktir. Bu durum rumen mikroorganizmalarının rumende bulunan bir dizi kısıtlamada hayatta kalabilmesi için adaptasyonlarından kaynaklanmaktadır ve bu kısıtlamalar diğer kontamine olan mikroorganizmalarını ortadan kalkmasına yardımcı olur. Başlıca çevresel kısıtlamalar, anaerobiyozis, yüksek tamponlama kapasitesi ve ozmotik basınç ve saprofitik rekabettir (Kamra, 2005).

Rumen içerisindeki anaerobiyozis, rumen ekosistemindeki ana kısıtlamalardan biridir ve bu enerji, sonuç olarak ev sahibi hayvanlar tarafından kullanılarak korunmaya yardımcı olur. Anaerobik yolla üretilen enerji miktarı aerobik yol ile üretilen enerjiye göre daha düşüktür çünkü aerobik solunumda elektron transfer reaksiyonu tarafından salınan enerji miktarı terminal elektron alıcısına bağlıdır. Aerobik mikroorganizmalarda terminal elektron alıcısı oksijendir ve ATP formundaki enerji serbest bırakıldığı zaman, terminal elektron alıcısı anaerobik bakterilerde olduğu gibi organik bir bileşik olduğunda serbest bırakılan enerjiye kıyasla çok daha yüksektir. Hayvanın tükettiği yemde sıkışan oksijenin bir kısmı rumende mevcut olan fakültatif anaeroblar tarafından kullanılır ve böylece optimum bir anaerobik durum oluşturulur ve sürdürölür (Kamra, 2005). Rumen redoks potansiyeli oldukça düşük olan anaerobik bir ortama sahiptir. Bu durum konak hayvan tarafından kullanılan enerjinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, düşük redoks potansiyelini (-350 mV) tolere edebilen mikroorganizmalar rumende hayatta kalabilir ve bunların dışındaki mikroorganizmalar sistemden atılır. Diğer taraftan yüksek tamponlama kapasitesi ve ozmotik basınç, rumene yabancı mikroorganizmaların büyümesini de sınırlar. Rumendeki mikroorganizmaların bir kısmı, ekosistemde bulunan diğer mikroorganizmaların büyümesini sınırlayan antimikrobiyal bileşikler üretirler.

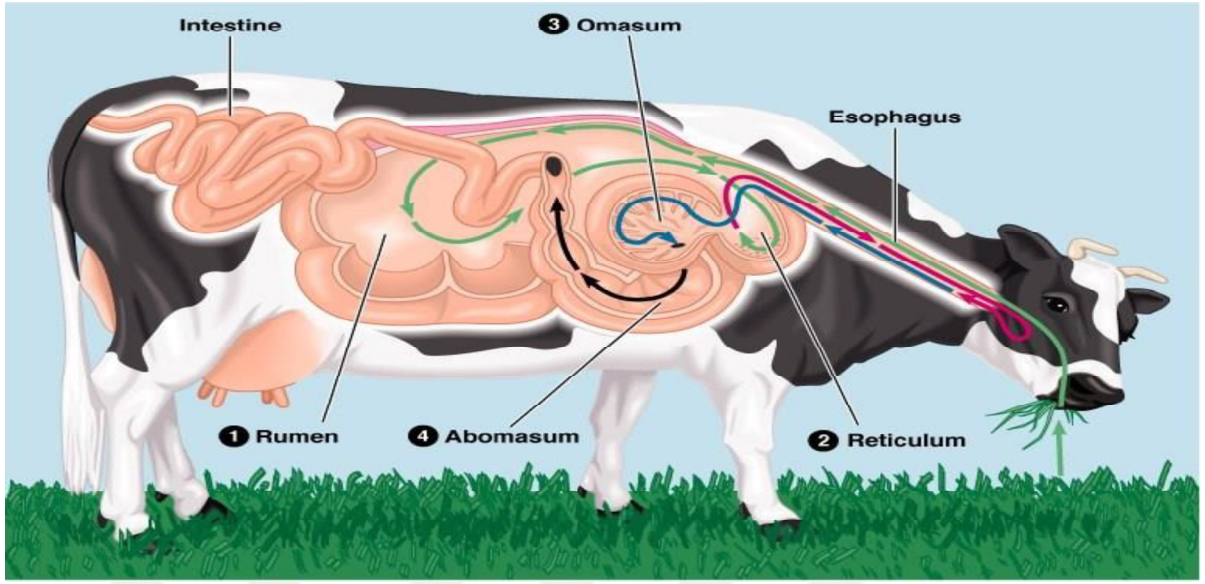
Ruminant hayvanlar rumen mikroorganizmalarının bir kısmının gelişimini engelleyici tarımsal ve endüstriyel yan ürünlerden beslenebilmektedirler (Bhatti ve Khan, 1996). Tanenler, ligninler, saponinler, mimosinler gibi besinsel olmayan bileşikler, zararlı mikroorganizmalara karşı savunma için bitkiler tarafından sentezlenen bileşiklerdir. Dolayısıyla bu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, hayvanlar tarafından tüketildiğinde, bu bileşikler, rumendeki farklı türdeki mikroorganizmaların (yararlı ve istenmeyen) büyümesini sınırlamaktadır (Kamra, 2005). Rumen mikroorganizmalarında, özellikle de

bakterilerde taksonomi, ekoloji ve fizyoloji verileri zengindir buna karşılık, rumen mikrobiyotunun karmaşıklığı, bu ekosistemi tam olarak anlamamızı engellemektedir (Hespehl ve ark., 1997).

1.1. Ruminant Sindirim Sistemi

Ruminant sindirim sistemi, diğer birçok yabani geviş getiren hayvanla birlikte sığır, geyik, koyun ve keçiler gibi hayvanları içeren Artiodactyla sınıfına aittir. Ruminantların midesi rumen, retikulum, omasum ve abomasum olmak üzere 4 bölümden oluşur (Şekil 1.1). Bunların arasında en büyük bölme rumendir. Ruminantlar başlangıçta bitki materyalini çiğnemekte ve sonrasında hayvanın ilk iki midesinde (retikulum ve rumen, toplu olarak retikülorumen olarak veya genellikle "rumen" olarak adlandırılır) sindirmektedirler. Bu işlem, yarı sindirilmiş materyali geri çıkarmak ve onu yeniden çiğnemek suretiyle desteklenir. "Ruminant" kelimesi "tekrar tekrar çiğnemek" anlamına gelen Latin ruminare'den gelir. Geviş en doğru şekilde, bir ruminantın retikülorumeninden yarı sindirilmiş besin geri çıkarması olarak tanımlanır iken bitki özünü daha fazla parçalamak ve sindirimi teşvik etmek için gerçek çiğneme süreci "ruminasyon" olarak adlandırılmaktadır (Palevich, 2011). Bugüne kadar yapılan çoğu rumen mikrobiyoloji çalışmaları, *Bovidae* familyasına ait olan sığır ve koyun gibi tarımsal açıdan önemli olan geviş getiren hayvanlara ve *Cervidae* familyasına ait geyiklere odaklanmıştır. Sığırlarda yaklaşık 100 L ve koyunda 10 L'ye kadar olan rumen ön mide bölmelerinin ilk ve en büyüğüdür. Retikulum basit bir rumen uzantısı olarak kabul edilir ve omasuma, retikülo-omasal delik adı verilen kısa tünel benzeri bir yapı ile bağlanır. Abomasum ruminantın gerçek midesidir; histolojik olarak monogastrik memelilerinkine benzemektedir (Flint ve ark., 2008). Rumende bitki materyali tükürük ile karıştırılarak katı ve sıvı tabakalara ayrılır. Katı bitki materyali bir araya toplanır ve sıkışmış gaz kabarcıkları tarafından yukarı doğru itilir, böylece bir malzeme salını oluşturmak için retikülorumen yüzeyine yüzer. Rumenin proksimal lokalizasyonu, kısmen sindirilmiş lignoselülozun daha fazla çiğnenmesi için yeniden ağıza döndürülmesini kolaylaştırır. Bazen, katı materyalin bir kısmı ağıza tekrardan parçalanması için gönderilir ve partikül büyüklüğünü azaltmaya yardımcı olmak için çiğnenir. Bu süreç, bol miktarda tükürüğün ağızdan ön mideye akışını tetikler, bu da

ideal koşullar altında rumeni yaklaşık olarak pH 6.8'de tamponlar ve etkin rumen fonksiyonu için gereklidir.



Şekil.1.1. Ruminant sindirim sisteminin sadeleştirilmiş şematik diyagramı (www.mun.ca/biology/scarr/Ruminant_Digestion.htm).

1.1.1. Rumen

Rumen ve retikulum benzerlikleri ve içeriklerinin serbestçe birbirine karışabilmesi nedeniyle ruminantların midesinin bu iki ön bölümü genellikle retikulo-rumen olarak birlikte anılmaktadır. Midelerin bu bölümü karın boşluğunun büyük bir kısmını doldurur. Rumen duvarları oldukça güçlü bir kas yapısına sahiptir ve sindirim kanalındaki toplam içeriğin üçte ikisinden fazlası rumende bulunur. Alınan yem 20-48 saat gibi bir zaman boyunca rumende kalır. Bu süre yemin sindirim kanalından toplam geçiş süresinin (40-72 saat) yarısı kadardır. Rumenin kasılıp gevşemesi arasında 50-60 sn kadar bir süre geçer (KAR, 2013). Bu rumen hareketleri ile rumen duvarının içini kaplayan yaprakçıklar yemle temas ederler. Bu yaprakçıklar rumenin iç yüzeyinin çok geniş bir alanda yemle temas etmesini sağlar. Bu sayede rumende fermentasyon yoluyla oluşan uçucu yağ asitleri gibi sindirim ürünleri rumen duvarından etkin bir şekilde emilirler ve kana geçerler. Rumenin yapısı lifli yemleri uzun süre burada tutmaya ve mikroorganizmalar tarafından fermente edilmeleri için zaman tanımaya müsaittir. Bu sayede lifli yemler ruminantlar tarafından sindirilebilir. Ancak kaba yemler çok ince kıyılmışsa rumenden geçiş hızları da yüksek olur ve sonuç olarak mikroorganizmalar tarafından iyi sindirilemezler. Bu gibi kaba yemlerden hayvanlar iyi yararlanamazlar.

İnce kıyılmış kaba yemler, sıvı kısım ve öğütölmüş konsantre yemler geviş getirilmeden rumenden hızlı bir şekilde geçerler.

Rumen farklı bakteri türleri, arkealar, funguslar ve siliat protozoalar ile temsil edilen karmaşık bir mikrobiyal topluluğı barındıran doğadaki en çeşitli ekosistemlerden biridir. Bu mikroorganizmalar, yem bitki polimerlerinin monomerlere ve nihayetinde ruminantların karbon ve enerji ihtiyaçlarını karşılayan uçucu yağ asitlerine dönüştürölmesine katılırlar (Krause ve ark. 2003). Stabil ve sürekli doğası nedeniyle uygun bir model ekosistemi olarak görölen rumen (Hungate, 1966); ve bu ekosistem üzerinden edinilen bilgiler ruminant beslenmesinin iyileştirilmesinde önemli bir etkiye sahip olmakla kalmamış, aynı zamanda rumende geliştirilen teknikler ve teoriler diğerk mikrobiyal ekosistemlere uygulanmıştır (Krause, 2014). Rumende pH 5.5-7.0 arasında iken rumen iç sıcaklığı ise 39-41 °C arasındadır (Church, 1984; Murphy ve ark., 1982). Rumendeki ekosistemi oluşturan organizmaların tamamına yakını anaerobik yada fakültatif anaerob organizmalardır (Patterson, 1992).

1.1.2. Retikulum

Retikulum, vücut boşluğunun ileri bölgesinde bir kese benzeri yapıdır. Dokular, bir petek benzeri bir ağda düzenlenir. Retikulum ve rumen arasında küçük bir doku katmanı bulunur, ancak ikisi aslında ayrı bölmeler değildir. Toplu olarak rumino-retikulum denir. İnek tarafından dökölen ağır ya da yoğun besleme ve metal nesneler bu bölmeye düşer. Retikulum kalbe yakındır. Çivi ve diğerk keskin nesneler dokularda hasara yol açabilir ve "donanım hastalığı" adı verilen travmatik gastrite neden olabilir. Mıknatısla engellenmez veya ameliyatla düzeltilmezse enfeksiyon meydana gelebilir ve hayvan öldürebilir (Parish ve ark., 2009).

1.1.3. Omasum

Çok sayıda kas yaprakçıkları tabakalarını içeren omasumun fonksiyonu tam olarak anlaşılmış değildir. Omasum, yapraksı kas tabakaları arasına su alarak sıkı tabakalar haline gelmektedir. Rumenden gelen su ve mineral maddelerin emilimi büyük oranda buradan gerçekleşmektedir. Böylece de bir sonraki bölme olan abomasumda sindirim için salgılanan asit ve enzimler sulandırılmamış olmaktadır (Parish ve ark., 2009).

1.1.4. Obomasum

Abomasum ruminantların dördüncü midesidir. Bu bölüm tek midelilerdeki midenin tam karşılığıdır. Doğumdan itibaren aktif olarak çalışır ve bu kısımda sindirim enzimleriyle hidroklorik asit salgılanır. Abomasumun iç duvarında salgılama sahasını artıran çok sayıda katlanma bulunmaktadır. Rumende üretilen mikrobiyal proteinler ve rumende sindirilmeden gelen by-pass proteinlerin sindirimi burada başlar ve ince bağırsaklarda devam eder (Kar, 2013)

1.2. Rumen Ekosistemi

Rumen mikroorganizmaları ağırlıklı olarak bakterilerden (ml başına 10^{10} - 10^{11}), funguslardan (ml başına 10^3 - 10^6) ve protozoalardan (ml başına 10^4 - 10^6) oluşmaktadır (Hespell ve ark., 1997; Orpin ve Joblin, 1997; Williams ve Coleman, 1997). Rumen ekosistemindeki mikrobiyal çeşitliliğe bakan kültürden bağımsız moleküler araştırmalar, toplam bakteriyel taksonların % 83'ünün kültürlendiğini ortaya koymuştur (Seshadri ve ark., 2018). Rumen içindeki kültüre alınmamış bireysel türlerin sayısının, yüzlerce ile binlerce arasında değiştiği, çoğunluğun Gram-pozitif Firmicutes veya Gram-negatif Bacteroidetes olarak kategorize edildiği düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, mevcut kültürlenmiş ve tamamen karakterize edilmiş rumen mikroorganizmalarının, rumen mikrobiyotasının başlıca ve metabolik açıdan önemli bileşenlerini tam olarak temsil etmediğini göstermiştir (Attwood ve ark., 2008).

Rumen bakterileri ve arkea esas olarak zorunlu anaeroblardır ve indirgenmiş bir ortama ihtiyaç duyarlar. Klasik saf kültür teknikleri ile kültür türlerinin analizleri ve her bir türün fermentasyon özellikleri, rumen fermentasyonunun tam olarak anlaşılmasını sağlamak amacıyla ilk rumen mikrobiyoloji araştırmalarında yer almıştır (Hungate, 1955). Sirohi ve ark., (2012) na göre rumendeki en çeşitli grup rumen bakterileridir, fakat silli protozoalar sayıca en düşük olsa da, rumen'deki canlı biyokütlenin yaklaşık % 50'sine katkıda bulunmaktadır. İneklerin rumen içeriğinde bulunan *Entodinium*'un (% 69.6) ve *Epidinium*'un (% 31.4) Protozoal 18S rDNA sekanslarının analizi yardımı ile iki dominant cins olduğunu ortaya konmuştur (Shin ve ark., 2004). Protozoa, düşük oksijen toleransı olan bakterilere yarar sağlayarak, rumendeki oksijeni temizlemeye yardımcı olabilmektedir (Zhu, 2016). Rumen içindeki bakterilerin çoğu, farklı enzimatik aktiviteler yoluyla lignoselülozik besleme maddelerinin parçalanmasında aktif olarak rol oynayan zorunlu

anaeroblardır. Enzimatik aktivitelerine bağı olarak; bakteriler, fibrolitik, amilolitik, proteolitik, lipolitik, ureolitik ve tanniyolitik bakteriler gibi farklı gruplara ayrılabilir (Denman ve ark., 2003, Denman ve ark., 2007, Ramos-Morales ve ark. 2010, Patra ve Yu, 2014). Rumen mikroorganizmalarından arkealar ise CH₄ ve ATP üretmek için protozoa, mantar ve bakterilerin heksoz katabolizmasından elde edilen H₂ ve CO₂'yi kullanır (Albers ve ark. 2007; Ferry ve Kasteed, 2007). Euryarchaeota, arkeanın en baskın filumudur ve rumen metanojenleride bu filumun içerisinde sınıflandırılmıştır (Woese 1987, Janssen ve Kirs 2008). Şu ana kadar çok az metanojen türü rumenden izole edilmiştir, ancak gelecekte daha fazla türün tanımlanması beklenmektedir. Ruminantların gastrointestinal sisteminde bulunan anaerobik funguslar Neocallimastigomycota filumuna, Neocallimastigomycetes sınıfının Neocallimastigales takımına aittir (Hibbett ve ark., 2007). Farklı karbon kaynaklarına sahip seçici zenginleştirme kültürü ile sığırlarda anaerobik fungus popülasyonunun çeşitliliği, % 61.3'lük bir genel sıklığa sahip olan çok merkezli fungusların (*Anaeromyces* ve *Orpinomyces*), kolonilerin ve monocentrik fungusların çoğunluğunu oluşturduğu ortaya konmuştur (% 27,1 *Neocallimastix* ve % 14.8 *Piromyces*) (Griffith, Ozkose ve ark., 2009). Farklı karbon kaynaklarına sahip seçici zenginleştirme kültürü ile, sığırlarda anaerobik fungus popülasyonunun çeşitliliği, % 61.3'lük genel bir sıklığa sahip olan polisentrik fungusların (*Anaeromyces* and *Orpinomyces*), kolonilerin çoğunluğunu oluşturduğu ve monosentrik fungusların daha az baskın olduğu ortaya konmuştur (Griffith, Ozkose ve ark., 2009).

1.2.1. Rumen mikroorganizmaları

Rumen'de, konak ile bakteriler, protozoa, funguslar, arkea ve bakteriyofajlardan oluşan çeşitli mikrobiyal popülasyon arasında karmaşık bir ekolojik sistem bulunmaktadır. Yeni doğmuş bir ruminant sindirim sistemlerinde bir dizi olay meydana gelir. İlk aşama, doğumdan sonra sıvı bir fazda bakterilerin çoğalmasıyla başlar, daha sonra sindirim sisteminde bakterilerin kolonizasyon fazı, ardından fungus ve protozoanın akışkan içinde oluşturulması ile başlar (Cheng ve ark., 1991). Ayrıca, olgun geviş getiren hayvanlarda normal mikrobiyal aktiviteler için kompleks çok türlü grupların oluşturulması gerekmektedir (Fonty ve ark., 1987; Fonty ve ark., 1988; Stewart ve ark., 1988). Rumen mikroorganizmaları, rumendeki yem parçacıklarına saldıran ve parçalayan çalışma birimlerinin bir kombinasyonu olarak görülebilir.

Bununla birlikte, net bir cümle ile rumen mikroorganizmaları bakteri, fungus, protozoa ve archaea'dan oluşmaktadır.

1.2.1.1. Rumen bakterileri

Rumen içindeki yoğun bakteri popülasyonunun gelişimi; sabit bir besleme kaynağı ve fermentasyon son ürünlerinin ve kalıntılarının sürekli olarak uzaklaştırılması yoluyla nispeten sabit koşulların muhafaza edilmesiyle elde edilir (Hungate, 1966). Rumen bakterileri, normal rumende toplam mikrobiyal biyokütlenin yarısını oluşturur ve bu nedenle, genel metabolizmaya daha fazla katkıda bulunurlar (Leedle ve Hespell, 1984). Mikrobiyal topluluğun çok yönlü fiziksel yapısıyla birlikte rumen bakterilerinin metabolik çeşitliliği, ruminant hayvanların geniş bir yelpazede yem tüketmesini sağlar (Leedle ve ark., 1982). Ancak, ruminant için beslenme şekli yüksek lifli bir yem diyetinden yüksek nişasta konsantreli diyeteye geçerse, bakteri popülasyonu ve türlerinde bileşimindeki değişiklikler ortaya çıkar (Grubb ve Dehority, 1975). Bakteriyel türlerindeki değişiklik: yem alımı, beslenme sıklığındaki değişikliklerden ve beslenme sonrası örnekleme zamanından kaynaklandığı bilinmektedir (Warner, 1962; Hungate, 1966).

Rumen bakterilerin büyük çoğunluğu Gram negatiftir. Ancak rasyonda kullanılan yüksek enerjili besinler gram pozitif bakteri sayısında artışa neden olmaktadır. Bakterilerin çoğunluğu zorunlu anaerobtur. Bazıları oksijene karşı aşırı hassasiyet gösterir ve oksijene maruz kaldıklarında ölürler. Bazı rumen bakterileri, çok düşük redoks potansiyeline (yüksek bir anaerobiyoz derecesine işaret eder) ihtiyaç duyar ve -350 mV'dan daha düşük bir redoks potansiyelidir. Rumen bakterilerinin gelişimi için optimum pH değeri 6.0 ile 6.9 arasında bulunur. Optimum sıcaklık 39°C'dir. Bakteriler, metabolizmayı olumsuz etkilemeksizin, oldukça yüksek oranda organik asitleri tolere edebilirler (Kamra, 2005).

Rumen bakterileri son yıllarda yoğun çalışmaların konusunu oluşturmuştur farklı ruminant hayvanlarda çeşitli bakteri soylarının izolasyonu ve karakterizasyonu ile bağlantılı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Bryant, 1959; Stewart ve ark., 1997). Rumende yaşayan bakteriler, çevresel yaşam alanlarına bağlı olarak dört gruba ayrılmıştır: birinci grup, rumende sıvı faz ile ilişkili serbest yaşayan bakteriler; ikinci grup, yem partikülleri ile ilişkili bakteriler; üçüncü grup, rumen epiteli ile ilişkili bakteriler; ve dördüncü grup bakteriler ise, protozoa yüzeyine yapışmış olanlardır

(Czerkawski ve Cheng, 1988; McAllister ve ark., 1994). Bu gruplar içinde dikkat çeken nokta ise yem parçacıklarıyla ilişkili mikrobiyal popülasyonların, ruminal endoglukanaz ve ksilanaz aktivitesinin % 88-91'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Williams ve Strachan, 1984; Minato ve ark., 1993). Özellikle bu açıdan önemlidir bakteri rolleri çünkü yem parçacıklarıyla ilişkili bakteri popülasyonları, sayısal olarak baskındır ve toplam mikrobiyal popülasyonun % 75'ini oluşturur (Minato ve ark., 1993). Bu sonuç, lifle ilişkili bakteri popülasyonlarının ruminal lif sindiriminde önemli olduğunu açıkça göstermektedir. Bağlanma, fibrolitik bakterilerin, rumendeki bitki lifinin sindirimini başlatması için önemli bir adım olduğundan, birçok araştırma, yem parçacıklarına bakteriyel bağlanmanın nasıl oluştuğunu anlatmaktadır (Koike, 2009).

F. succinogenes, *R. flavefaciens* ve *R. Albus*'un bitki liflerine yapışma yeteneği ve bu bağlanma mekanizması saf kültürler kullanılarak incelenmiş (Minato ve Suto, 1978; Mosoni ve ark., 1997; Pegden ve ark., 1998) ve bu kültürlerin sindirim faaliyetleri elektron mikroskobu ile görselleştirilmiştir (Latham ve ark., 1978; Cheng ve ark., 1980, 1981). Minato ve Suto (1978) ruminal bakterilerin in vitro selüloz tutunma yeteneklerini değerlendirmiş ve ortak rumen izolatları arasında en yüksek bağlanma kabiliyeti *F. succinogenes*'in gösterdiğini bildirmiştir. Mosoni ve ark. (1997) selüloz ile 45 dakika temas sonrasında *R. flavefaciens* ve *F. succinogenes*'in en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Roger ve ark. (1990) *R. flavefaciens*, ilk temasta 1 dakika içinde Avicel'e bağlanırken *F. succinogenes* 30 dakikaya ihtiyaç duyduğunu, ilk lif yapışması ile ilgili olarak *Ruminococcus spp.* nin *F. succinogenes*'e üstün olduğu bildirilmiştir. Diğer çalışmalar aynı zamanda in vitro selülozun bir substrat olarak kullanıldığı üç fibrolitik tür arasındaki rekabeti göstermiştir (Odenyo ve ark., 1994; Shi ve ark., 1997). *F. succinogenes*, bitki lifinin yüzeyine sıkıca bağlanır ve küçük vezikülleri serbest bırakır (Cheng ve ark., 1983/1984; Gaudet and Gaillard, 1987). Buna karşın bitki lifine bağlanan *R. flavefaciens* hücrelerinde vezikül oluşumu gözlenmez ancak, çok geniş bir hücre dışı glikoliz görülür (Latham ve ark., 1978a). Bitki lifi bozunmasına katılan enzimleri kodlayan çok sayıda gen, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'tan izole edilmiştir (Barros and Thomson, 1987; Kawaive ark., 1987; Sipat ve ark., 1987; Ohmiya ve arkl., 1988; White, 1988; Flint ve ark., 1989; Gong ve ark., 1989; McGavin ve ark., 1989).

Rumen bakterileri arasında bulunan, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium* ve *Eubacterium cellosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium longisporum*, *Clostridium lochheadii* bakterileri başlıca fibrolitik bakteri türleri olarak kabul edilmektedir (Stewart ve ark., 1997; Kamra, 2005). *Ruminococcus amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrosolvens* ve *Streptococcus bovis* gibi bakteriler amilolitik aktiviteye sahiptir (Patterson, 1992). Ayrıca *Butyrivibrio fibrisolvens* ve *Anaerovibrio lipolytica* bakterilerinin lipidleri hidrolize ettikleri bilinmektedir (Patterson, 1992). Asetojenik bakteriler *Eubacterium limosum* ve *Acetitomaculum ruminis* olarak bilinmektedir (Kamra,2005). Asit kullanan bakteriler *Megasphaera elsdenii*, *Wollinella succinogenes*, *Veillonella gazogenes*, *Oxalobacter formigenes*, *Desulphovibrio desulphuricans*, *Desulphatomaculum ruminis*, *Succiniclasticum ruminis* olarak bildirilmiştir. Şeker kullanan bakteriler *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Succinivibrio amyolytica*, *Selenomonas ruminantium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. Helveticus* *Bifidobacterium globosum*, *B. longum*, *B. Thermophilum* iken *Treponema saccharophilum* *Lachnospira multiparus* gibi bakteriler pektin kullanmaktadır (Kamra,2005).

1.2.1.1.1. *Fibrobacter succinogenes*

İlk olarak Robert E. Hungate, 1947'de *Fibrobacter succinogenes*'i (eski *Bacteroides succinogenes*) sığır rumeninden izole ettiğinden beri (Hungate 1947,1950), *Fibrobacter* cinsinin üyeleri, otobur bağırsaklarında selülozik bitki biyokütlesinin önemli sindiricileri olarak düşünülmüştür (Hungate,1966; Kobayashi ve ark., 2008; Stewart ve ark.,1998). *Fibrobacter* halen iyi karakterize edilmiş *Bacteroidetes* ve *Chlorobi* filumuna filogenetik olarak bağlı olan *Fibrobacteres* bakteri filumunun tek resmi cinsidir (Cole ve ark.,2003). *F. succinogenes* başlangıçta *B. succinogenes* olarak sınıflandırılmıştır ve bu durum, *Bacteroides*'lerin cins tanımına tarihsel açıdan bakıldığında "karbonhidratların fermentasyonundan bütirik asit üretmeyen tüm anaerobik, gram negatif, nonmotile yada peritriköz ve non-sedimanter çubuklar" olarak bildirildiği görülmektedir (Cato ve Salmon 1976). Bununla birlikte, *Bacteroides* cinsi içinde birçok ilgisiz türün birikmesine neden olmuştur. *B. succinogenes* ağırlıklı olarak düz zincirli yağ asitlerine sahiptir ve diğer *Bacteroides* türlerinde gözlemlenen

membran sfingolipidlerinden yoksun olduğu için cinsin dışında bırakılması önerilmiştir (Shah ve Collins 1983). Daha sonra, *B. succinogenes* ve *Bacteroides amylophilus*'un diğeri Bacteroides türleri ile yakından ilişkili olmadığını göstermek için 16S rRNA oligonükleotid kataloglama yöntemleri kullanılmıştır (Paster,1985).

Rumen bakterileri içerisinde *F. succinogenes*'in fibrolitik enzimleri en iyi çalışanlar arasındadır. İlk enzim saflaştırma çalışması, EG1 ve EG2 endoglukanazlar (McGavin ve Forsberg, 1988), bir klorür ile uyarılan sellobiosidaz (Huang ve ark.,1990) ve bir sellodextrinaz (Huang ve ark.,1988) üzerine yapılmıştır. Genel olarak, endoglukanazların klonlanması en yaygın olanıdır (Forsberg ve ark., 1997). Bir endoglukanaz geni olan cel-3, dizilenen ilk genlerden biri olmuştur (McGavin ve ark.,1989) ve *F. succinogenes* S85 suşunun en az yedi farklı glukanaz aktivitesi bildirilmiştir (Forsberg ve ark., 1997, Lynd ve ark., 2002).

1.2.1.1.2. *Ruminococcus albus*

Ruminococcus albus en önemli selülitik rumen bakterilerinden biridir ve selülozik türevler tarafından inhibe edilen bir mekanizma ile selüloz liflerine yapıştığı belirtilmiştir (Minato ve Suto, 1978). *R. albus*, spor oluşturmeyen, zorunlu bir anaerobik, kokoid ve gram pozitif bakteridir (Hungate, 1966; Desvaux ve ark.,2006). Selüloz ve hemiselülozu parçalayan hücre dışı hidrolitik enzimler (ekzoglukanazlar ve endoglukanazlar) üretmektedirler (Dehority, 1973; Ohmiya ve ark.,1985). *R. albus* da glikozda büyüme gösterebilir, ancak hem glikoz hem de sellobioz içeren kültürlerde sellobioz kullanımını tercih ettiği görülür (Thurston ve ark.,1993). *R. albus*'un selülozunu üzerine çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Wood ve ark. (1982), *R. albus* SY3'ün selülaz aktivitesinin hücre ile ilişkili olduğunu ve kararsız yüksek moleküler kütleli bir kompleks olarak var olduğunu bildirmiştir.

R. albus suşlarından geniş bir GH (glikoz hidrolaz) aralığı izole edilmiştir. *R. albus* F-40 suşu önemli ilgi görmüş ve yedi farklı endoglukanaz, bir sellobiosidaz ve iki L-glukozidaz bildirilmiştir (Forsberg ve ark., 1997). Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları ile, iki endoglukanaz (Poole ve ark., 1990), bir sellobiosidaz (Ohmiya ve ark., 1982) ve bir L-glukozidaz (Ohmiya ve ark.,1985) tanımlanmıştır. L-glukosidaz daha sonra klonlanmış ve dizilenmiştir (Ohmiya ve ark.,1990).

1.2.1.2. Rumen fungusları

Tüm anaerobik funguslar Neocallimastigomycota filumunda bulunmaktadır. Bu funguslar özellikle otoburların sindirim sisteminde, yemlerin tüketiminde temel koloni olduğundan dolayı önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Akin DE ve Borneman WS 1990 Liggenstoffer AS ve ark., 2010). Son zamanlardaki moleküler çalışmalar eklem bacaklılardan termitler (Lee SM ve ark.,2015) ve yeşil iguana (Liggenstoffer AS ve ark., 2010) gibi otçul sürüngenlerde de bulunabileceklerini göstermiştir. Anaerobik fungusların diğer funguslardan çeşitli ayırıcı özellikleri karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon mitokondriyum, sitokromlar ve diğer biyokimyasal özelliklerin Oksidatif fosforilasyon yolunun bulunmaması gibi zorunlu anaerobik fizyolojilerinden kaynaklanır (Van der Giezen M 2009). Diğer ökaryotların aksine anaerobik funguslardaki enerji üretimi hidrojenozomlar aracılığıyla gerçekleşir. Bu süreç malat dekarboksilaz yoluyla asetat, CO₂ ve H₂ nin kullanılmasıyla ATP üretilmesidir. Neocallimastigales, fizyolojik süreçlerinin herhangi biri için moleküler oksijen gerektirmeyen ve oksijenin varlığı toksik olan funguslardır. Bu özellik, anaerobik fungusların kendilerini oksijenin toksik etkilerine karşı nasıl savunurlar sorusunu gündeme getirmektedir, Ek olarak genomları şimdiye kadar bulunan en yüksek AT içeriğine sahiptir ve önemli hidrolitik ve selülozik gen ailelerinin ciddi bir genişlemesi ile özgündürler (Youssef NH ve ark., 2013). Anaerobik funguslar, selülozomlara sahip olan tek funguslardır. Anaerobik fungusların durumu bir bazal fungus soyu olarak genom özelliklerine yansır, diğer erken dallanma fungus soylarında ve / veya fungus olmayan Opisthokontlarda mevcut olmakla birlikte, daha sonra birbirinden ayrılan Dikarya genomlarında (Ascomycetes ve Basidiomycetes) bulunmamaktadır (Liu YJ ve ark.,2006).

Anaerobik fungusların rumende gerçek rolü hala tamamen çözülmemiş bir konudur ancak tanımlanan enzim aralıkları ile kanıtlandığı üzere GH'lerine ilişkin bilgilerimiz artmaktadır. Bununla birlikte, anaerobik fungusların bitki dokusunu kolonize ettiği ve diğer mikroorganizmalar tarafından parçalanmayan lignin dokuları bozduğu görülmektedir (Lowe ve ark., 1987). Fungusların büyüme ve bozunma oranlarının bakterilerinkinden çok daha yavaş olduğu ve kalıcılıklarının sınırlı olduğu doğrulanmıştır, çünkü büyüme oranları rumen seyreltme oranından çok daha düşük olduğu belirtilmiştir. Funguslar, bitki dokusundaki lignini % 34'üne kadar

sindirebilmektedir (McSweeney ve ark 1994), filamentli büyümesinin bir sonucu olarak bitki dokusuna nüfuz eder, çok etkili enzimlere sahiptirler ve ekzo-etkili selüloz aktivite ile bilinen tek rumen organizmalarıdır (Forsberg, 1997). Fungusların önemi, rumen bakterileri ile oluşan sinerji ile daha da desteklenmektedir (Dehority ve Tirabasso, 2001). Otoklavlanmamış kök parçalarının metanojenik ko-kültürleri *Neocallimastix frontalis* ve *Piromyces* izolatları ile *Caecomycetes*'e göre daha fazla sindirilmiştir ve *N. frontalis* ve *Piromyces* izolatları kök parçalanma oranlarının en yüksek olduğunu göstermiştir. *Neocallimastix* spp. rumen funguslarının en iyi çalışılmış olan ve kristal selüloza karşı oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar rumen funguslarını ruminant hayvanlar için vazgeçilmez yapmaktadır.

1.2.1.2.1. Anaerobik fungusların klasik ve pragmatik taksonomisi

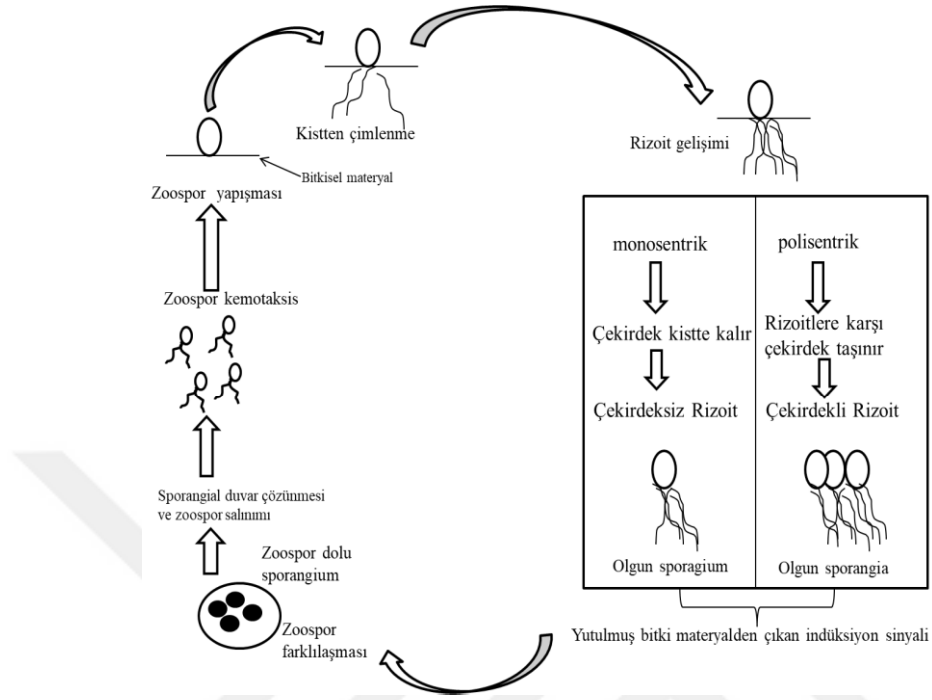
Anaerobik fungusların tipik morfolojisi ve fizyolojisi taksonomik belirsizliğe neden olmaktadır. Protozoa, *Phycomycetes* ve *Chytridiomycetes* (Barr 1980; Barr 1988; Liebetanz, 1910; Orpin, 1977) olarak yanlış sınıflandırmadan sonra, anaerobik funguslar sonunda *Neocallimastigomycota*'da farklı bir filuma yerleştirilmiştir (Hibbett 2007). Bu filum içerisinde şu ana kadar tanımlanmış olan sekiz cinsin içinde bulunmaktadır. Monosentrik rizoidal cinsler *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Ontomyces*, *Buwchfawromyces*, *Feromyces* polisentrik rizoidal cinsler *Anaeromyces* ve *Orpinomyces*, ve iki küresel cins sırasıyla monosentrik *Caecomycetes* ve polysentrik *Cyllamyces*'tir (Dagar ve ark., 2015; Callaghan, 2015). Cinsler thallus morfolojisine, substrat ve zoospor morfolojisinin içindeki rhizoidal filamentlere veya küresel holdfastların oluşumuna dayanarak tanımlanır. Tek kamçılı ve çok kamçılı zoosporlar arasında bir ayrım yapılır. Tek kamçılılarda sahip olunan 7-20 arası arka kamçılar ikili sıralara yerleştirilmiştir. Çok kamçılı zoosporların oluşumu *Orpinomyces* spp. ve *Neocallimastix* spp. ye özgü özelliktir, bu iki cins *Neocallimastigomycota* içinde ayrı bir dallanma oluşturur (Koetschan ve ark., 2014). Ek olarak sporangia şekline göre farklılaşma mümkün olabilir, ancak kültür koşullarına bağlı olarak değişebileceğinden yanıltıcı olabilir. Şu ana kadar yaklaşık 20 tür tanımlanmıştır (Fliegerová, 2012). Laboratuvarlar arası karşılaştırmalardaki ve uygulanabilir birçok tipteki kültürlerin kaybedilmesinin neden olduğu belirsizlikler, DNA barkodlama ve kültür alışverişi yöntemleri kullanılarak çözülebilir (Griffith ve ark., 2010).

Çevresel nükleik asit sekanslarının kültürden bağımsız analizi, Yabani ve yerli otoburların sindirim sisteminde daha önce şüphelenilenden çok daha fazla fungus çeşitliliğinin bulunduğunun en önemli göstergesidir. Son çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, bugüne kadar en az on iki veya daha fazla tanımlanmamış cinsin bulunabileceği anlaşılmaktadır (Liggenstoffer AS ve ark., 2010, Koetschan C ve ark., 2014, Fliegerová K ve ark.,2010).

1.2.1.2.2. Hayat döngüsü

Anaerobik fungusların yaşam döngüsü hareketli bir zoospor evresi ile hareketsiz bir vejetatif evre arasındadır (Şekil 1.2). Hareketsiz olan, bitki materyali ve sporangiyum olarak bilinen cisimcikler ile ilişkili bir tallustan oluşmaktadır. Kamçılı zoosporlar olgun sporangiyumdan etkin olarak taze bitki dokularına doğru yönelir, çözünabilir şekerlere ve / veya fenolik asitlere kemotaksis tepki sonucu salınırlar (Wubah ve Kim 1996). Besin partiküllerine tutunduktan sonra, kamçılar dökülür ve bir kist oluşur. Kist daha sonra tallus oluşturmak üzere çimlenir. Tüm monosentrik türlerde (*Piromyces*, *Neocallimastix* ve *Buwichfawromyces*) çekirdek, genişleyen Sporangiyumu oluşturan kistin içinde kalır. Polisentrik türlerden *Anaeromyces* ve *Orpinomyces* te bulunan çekirdekler, tek bir talus üzerine birden fazla sporangia oluşturmak üzere rotozoidal sistemden geçerler. Eksojen ve endojen çimlenme terimleri Chytrid gelişimini tanımlamakta yaygın olarak kullanılır, rizoidler oluşturmayan fakat birden fazla sporangezi oluşturan küresel anaerobik funguslara daha az uygulanabilir (Ozkose ve ark., 2001). Rizoid sistem, enzimatik aktivite kombinasyonu ve hidrostatik basınç ile bir bitki dokusuna Appressoryum benzeri nüfuz yapılarını kullanarak nüfuz eder (Ho, Bauchop 1991; Ho, 1988). Rizoid olmayan küresel türlerde (*Caecomycetes*, *Cyllumycetes*), substrat içinde genişleyen holdfast oluşumu bitki liflerinin bölünmesine neden olur (Orpin ve Joblin 1997; Lowe, 1987). Sporangiyum olgunlaşması ve aseksüel zoosporların salınması, kese içine almanın ardından sekiz saat içinde ortaya çıkabilir (France, 1990; Theodorou, 1993). Yaşam döngüsünün tamamı, 24-32 saat içinde gerçekleştirilir (Lowe, 1987). Anaerobik fungus propagüllerinin, dışkıda muhtemelen bir yıla kadar hayatta kalabildikleri bilinmektedir (McGranaghan, 1999), tükürük yoluyla yenidoğana transfer edildiği tespit edilmiştir (Davies, 1993). Oksijene toleranslı hayatta kalma yapıları nadiren gözlenmiştir (Callaghan, 2015; Brookman, 2000;

Wubah, 1991) ancak anaerobik fungus türlerindeki meydana gelen bu yapıyla ilgili birçok soru halen cevaplanmayı beklemektedir.



Şekil.1.2. Anaerobik fungusların yaşam döngüsü (Gruninger ve ark., 2014)

1.2.1.2.3. Anaerobik fungusların metanojenler ve bakterilerle etkileşimleri

Anaerobik fungusların metanojenlerle yakın ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir (Orpin, 1997; Cheng, 2009), Türler arası hidrojen transferi hem metan üretimine hem de oksitlenmiş nükleotidlerin daha verimli yeniden üretilmesine neden olur. Sintrofik ortak-kültivasyon, selüloz ve ksilanoliz oranlarının artmasıyla birlikte mantar büyüme oranını belirgin bir şekilde artırmaktadır. Bunun sonucunda kuru maddenin sindirimini artırmaktadır (Nakashimada, 2000). Fakat anaerobik fungus-metanojen etkileşimi çapraz besleme daha karmaşıktır. Hidrojen transferi fungal katabolik yollarını ve spesifik enzim profillerini de etkiler. Fungus ürün oluşumu oksitlenmiş son üründen uzaklaşarak indirgenmiş ürünlerin üretimine doğru değişkendir. Rumende asetat ve özellikle format, metanojenler için tercih edilen büyüme substratlarıdır (Cheng 2009; Nakashimada 2000). Bu etkileşim o kadar önemlidir ki bazı anaerobik funguslar, aksenik kültürler olarak izole edilemezler, sadece kalıcı arkeal simbiyotlar ile birlikte izole edilebilir (Leis 2014). Asetojenik

bakteriler ve metanojenler arasındaki sintrofik etkileşimler sonucu biyogaz oluşumu bilinmektedir (Stams, 1994). Anaerobik funguslar, metanojenler varlığında gelişen bir büyüme gösterdiğinden, biyogaz reaktörlerini bu mikrobik grupla zenginleştirme için çalışmalar yapılmaktadır.

Üç anaerobik fungus ve iki selülozik bakteri soyunun farklı kültür kombinasyonlarındaki sindirim dereceleri test eden Bernalier ve arkadaşları tarafından gösterildiği gibi anaerobik fungusların bakterilerle olan etkileşimleri antagonistik ve simbiyotik niteliktedir (Kabir, 2015). Genel olarak her iki grup aynı biyolojik niş için rekabet içindedir. Ancak bitki dokusunun fungal rizoidler vasıtasıyla parçalanması, selülitik bakterilerin genel verimliliğini de artırmaktadır (Bernalier, 1992).

F. succinogenes ile çayır köklerinde yetişen fungusların metanojenik ortak kültürleri arasındaki etkileşimler araştırıldığında *N. Frontalis*'in *F. succinogenes*'i inhibe ettiği belirtilmiştir. Bunun aksine, *F. succinogenes* ile yetiştirilen *Caecomyces* türü kök sindirimini artırmıştır. *F. succinogenes* ve *Caecomyces spp.* tamamlayıcı fibrolitik etkinliklere sahip olabileceği bildirilmiştir (Joblin ve ark., 2002).

Bu gelişmiş sindirim, farklı mikrobiyal grupların (fungus, bakteri, protozoa) bitki parçalanmasına katkısını test ederken de doğrulanmıştır (Lee, 2000). Bununla birlikte, protozoaların varlığı, düşük sindirim verimi ve hem bakteri hem de fungusların inhibisyonu ile atfedilmiştir.

1.2.1.2.4. Anaerobik fungusların lignoselülozik enzimleri ve bunların potansiyel kullanımı

Ligninle gömülü selüloz ve hemiselüloz (Cullen, 1992) mikrobik ve enzimatik saldırılara karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. Birincil bitki biyokütle sindiricisi olan anaerobik rumen fungusları; rizoidal büyüme sırasında bitki dokusunu açabilme kabiliyetine sahiptir. Ürettiği enzimler sayesinde farklı bileşiklerdeki lignoselülotik biyokütelleri sindirip ayrıştırmaktadır. Ancak bu işlemler sırasında lignin anaerobik olarak sindirilemez durumdadır.

Bu enzimlerin bazıları serbestçe salınmaktadır, ancak bunların çoğu selülozom adı verilen çoklu enzim kompleksine bağlıdır. *Orpinomyces* suşu CIA'nın genom dizilimi, aerobik fungus ile karşılaştırıldığında daha geniş bir enzim aralığı içermektedir (357 adet glikozil hidrolaz, 92 karbohidrat esteraz ve 24 pektat liyoz) (Youssef ve ark.,

2013). Bu özelliğin rumen bakterilerinden gelen yatay gen aktarımı ile anaerobik fungusların bu kadar güçlü ve etkileyici selüloolitik ve hemiselülozik özellik geliştirmesinin başlıca nedenlerinden biri olarak görülmektedir. Genellikle selülaz olarak bilinen bir grup enzim, selülozda üç farklı enzimin üç ayrı enzimatik aktivite ile β -1, 4 glikozidik bağı sinerjik olarak hidroliz edilir. Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) selüloz iplikçiklerinin amorf bölgeleri içinde kesilmiş, oligosakaritler salmış ve ekzoglukanazlar ile enzimatik parçalanma için yeni serbest zincir uçlar oluşturmuştur (EC 3.2.1.176; EC 3.2.1.91). sellobiyohidrolazlar olarak da adlandırılan ekzoglukanazlar, indirgeyici (EC 3.2.1.176) veya indirgenmeyen (EC 3.2.1.91) uçlardan sellobiyoz disakkaritleri serbest bırakılır. *Neocallimastix frontalis* kültüründen ekstrakte edilen bir selülozomal kompleksde glikozil hidrolaz 5 ailesinden (GH5) enzimler endo- ve GH6 ve GH48'den enzimler vasıtasıyla, Ekso-mekanizma ile çalıştırılmıştır (Wang, 2014). Kalan sellobioz daha sonra β -glukozidazlar ile glikoza hidroliz edilir (Lynd, 2002; Juturu ve Wu, 2014). Yakın zamanda keşfedilen litik polisakkarid mono-oksidazlar gibi yardımcı enzimler, birçok fungus türünde selülozun kullanımını güçlendirir veya tamamladığı bildirilmiştir (Morgenstern, 2014). Hidrolize edici enzimlerin aksine, bakıra bağımlı bir oksidasyon mekanizması ile glikozidik bağları parçalamakta ve selülozun kristal bölgelerine saldırabilmektedirler. Fakat anaerobik funguslar da dahil olmak üzere bazal fungus gruplarının bu enzim eksikliği var gibi görünmektedir (Morgenstern I, 2014). *Neocallimastigomycota* anaerobik fungus için üç ana selülaz tipinin tamamı, yüksek verimli selülazlar için bir kaynak potansiyeline sahip olduklarını doğrulamıştır (Harhangi, 2002; Ljungdahl, 2008; Borneman, 1990; Borneman, 1989). Anaerobik fungal selüloz parçalanmasının başlıca ürünü olan glikozun biyoteknolojik uygulamalar için bir avantaj olduğu bir gerçektir. Sellobiyoz birikmez ve bu nedenle, birçok bakteri türü için bilinen selüloz hidrolizi için nihai ürün önleyicisi olarak görev yapamaz. Dolayısıyla, β -glukozidazın eklenmesi gereksiz hale gelir (Dashtban M 2009).

Hemiselülozların heterojen yapısı nedeniyle, katabolizmaları için birkaç enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdiye kadar anaerobik fungusların, bitki hücresi duvarının temel hemiselüloz bileşenlerini, yani β -glukanlar, mannanlar ve ksilanları parçalamak için gerekli tüm enzimleri sağladığı ve bazı durumlarda ksilanaz aktivitesinin selülaz etkinliğinden bile daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Aylward JH 1999). Aerobik

fungusların (Dikarya) aksine, anaerobik funguslar lignini katabolize etmek için enzimatik mekanizmadan yoksundur. Aromatik halkayı parçalamak için enzimatik tepki oksijeni gerektirir ve bu nedenle anaerobik bir ortamda gerçekleşemez (Berg, 2014). Fakat bir *Neocallimastix sp.*, bitki biyokütle ilişkili lignin'in %34'üne kadar olan kaybını araştırabilir, ancak bu muhtemelen ligninin fiziksel değişimi veya enzimatik katabolizma yerine kimyasal modifikasyonuna bağlı olarak kaybedileceğini göstermiştir (McSweeney, 1994). Hemiselülozlar ve lignin arasındaki bağı kesen ve bu iki bileşiğin ayrılmasıyla ilave feruloyl (EC 3.1.1.73) esterazlar üretilir ve selüloz ve hemiselülozu daha da bozunum için daha kolay erişilebilir hale getirir (Nagpal, 2009).

1.2.1.2.5. Anaerobik fungal selülozomlar

Selülitik ve hemiselüloitik enzimlerin çoğu selülozom olarak bilinen çoklu enzim kompleksidir. Selülozomlar ilk önce bakteri ailesi *Clostridiaceae*'de (Felix ve Ljungdahl, 1993) tanımlanmıştır ve anaerobik funguslar bu özelliği gösteren tek ökaryotik temsilcilerdir. Bakterilerde bulunan ve yatay bir gen aktarım olayı yoluyla ortaya çıktığı düşünülen Fungal selülozom yapısal ve filogenetik olarak benzerdir (Garcia-Vallvé ve ark., 2000). Bugüne kadar selülozomlar *Piromyces* (Nagy ve ark., 2007; Steenbakkers, 2002) *Orpinomyces*, (Ljungdahl, 2008) ve *Neocallimastix* (Aylward ve ark., 1999, Zhou ve ark., 1994) türleri için tanımlanmıştır. Anaerobik fungus bitki dokularını rizoid ile işgal eder. Çözünür enzimlerin salgılanmasına ilaveten rizoid uçlarını hücre duvarlarına saplayan selülozomları oluşturduğu varsayılmaktadır (Nagpal, 2009). Ne yazık ki, anaerobik fungal sellülozomun moleküler yapısı hala belirsizdir ve çeşitli teoriler mevcuttur (Haitjema ve ark., 2014). Anaerobik bakterilerde, katalizör olmayan bir protein olan 'iskele proteini', hücre duvarına bağlıdır ve birkaç tekrarlanan domain olan kohezineri içerir. Bu yapı enzimatik alt birimlerin katalitik olmayan alanlar, dockerinler tarafından bir araya getirildiği omurgayı oluşturur. Ek olarak, iskele substrata, bu durumda, selüloz moleküllerine, bir selüloz bağlayıcı etki yoluyla bağlanır (Shoham, 1999). Sadece bir türe özgü dockerin domain içeren anaerobik bakterilerin enzimleriyle karşılaştırıldığında fungus enzimleri, dockerin domainlerinin bir ile üç kopyasını ihtiva eder ve bu da, türlerarası spesifikliği gösterir. Dockerin miktarının enzimlerin iskele molekülüne olan afinitesini düzenlediğine inanılmaktadır (Fontes ve Gilbert, 2010). Son zamanlarda, anaerobik fungal selülozomun bir iskele omurgası da içerdiği ve katalitik bileşenlerin dockerin

domainleri yoluyla onunla etkileşime girdiği fikrini ortaya koyduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2014). Diğer çalışmalar, bazı bağlama domain tiplerinin, anaerobik fungal sellülozomlarda çeşitli farklı iskele proteinlerinin olabileceği sonucuna vararak, birkaç bağımsız proteine bağlandığını göstermiştir (Steenbakkers ve ark., 2001). Ek olarak her ikisi de bir fungus türüne ait olan glikosil hidrolaz ailesinden (GH 3) alınan bir çift dockerin domaini ve bir β -glukosidaz enzimatik alt biriminin birbirine bağlanabileceği gösterilebilir (Nagy ve ark., 2007; Haitjema ve ark., 2014). Bu, dockerinlerin farklı salgılanan enzimlerin birbirine bağlanmasına aracılık ettiği, yapısal molekül olarak iskelesi olmayan selülozomu oluşturduğu üçüncü teoriye yol açar.

Ayrıntılı yapı çözülmese de selülozomlar, anaerobik fungusların kendi selülozik enzimlerini, tek tek salgılanmış enzimlerle eşit olmayan sinerjik ve daha verimli bir şekilde kullanmalarına izin verir (Haitjema ve ark., 2014). Aynı zamanda celpin adlı bir serin proteaz inhibitörü şeklinde çevredeki ortamdan gelen proteazlara karşı koruma sağlar (Steenbakkers ve ark., 2008).

1.2.1.3. Rumen protozoaları

Rumen protozoaları evcil hayvanlarda on dokuzuncu yüzyıl başlarında saptanmıştır (Gruby ve Delafond., 1843). 1920'den sonra araştırmacılar, rumendeki protozoonların tanımlanması, morfolojisi ve biyokimyasal işlevleri konusunda daha fazla çalışmışlardır. Rumen siliyat protozoalar morfolojik özelliklerine bağlı olarak holotrich ve entodiniomorphid protozoa olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Hungate, 1966). Bu sınıflandırmanın alternatifi olarak çözünür şeker kullananlar, nişasta sindiricileri ve lignoselüloz hidrolizleyicileri olarak da sınıflandırılabilir. Holotrich protozoa, farklı hayvanların rumeninde 15 farklı cins tarafından temsil edilmektedir. Bu cinsler arasında Isotricha, Dasytricha, Buetschlia ve Charonina bulunmaktadır; evcil ve yabani ruminantlar ve (Eloff ve Van Hoven.,1980) deve ve su aygırı gibi ruminant olmayan bazı hayvanlarda çok sayıda holotrich protozoa barındırmaktadırlar (Dogiel., 1928; Thurston ve Grain., 1971). Holotrich protozoa'nın enzimatik profili, nişasta, pektin ve çözünür şekerlerin enerji kaynağı olarak kullanılması için yeterince büyük miktarlarda amilaz, invertaz, pektin esteraz ve poligalakturonaz bulunduğunu gösterir (Mould ve Thomas, 1958; Williams, 1979). Selüloz ve hemiselüloz yıkımından sorumlu enzimler holotrich protozoa'da da bildirilmiştir, ancak seviyeler entodiniomorphid protozoadaki proteinlere kıyasla çok düşüktür (Williams ve ark., 1985).

Rumen protozoanları $10^5 - 10^6 \text{ ml}^{-1}$ populasyon yoğunluğuna sahiptir. Büyük çoğunluğunu silli protozoanlar oluşturmakla beraber kamçılı protozoanlar da mevcuttur. Rumendeki protozoa grubunun çoğunluğu silli olarak belirtilmiştir. Bu silliler zorunlu anaerobdurlar ve patojen değildirler. Sağlıklı hayvanda sillilerin miktarı $10^5-10^6 \text{ ml}^{-1}$ 'dir (Williams, 1986), bununla beraber flagellat türler $10^3-10^4 \text{ ml}^{-1}$ 'dir. Silliler rumende 3 takım altında toplanmaktadır: Prostomatida, Trichostomatida ve Entodiniomorphida. Entodiniomorph'a bağlı silliler rumen sillilerin çoğunluğunu oluşturduklarından hem sayı hem de görülme sıklığı yüksektir (Ogimoto ve Imai, 1981). Silli protozoalar pek çok substrat çeşidini parçalayabilir ve fermente edebilirler. Bitkilere ait temel içerikler olan selüloz, hemiselüloz, pektin, nişasta, çözünebilir şekerler ve lipidleri kullanabildikleri gibi aynı zamanda proteolitik aktivite gösterirler. Bütün protozoalar büyük miktarlarda nişasta benzeri polisakkaritleri depolayabilirler ve dış ortamdaki enerji kaynakları tükendiği zaman kullanabilirler. Protozoaların rumen mikrobiyal populasyonunun bir parçası olması ve fermentasyona katkı sağlamasına rağmen (Chesson ve Forsberg, 1997) bu mikroorganizmaların ruminant hayvanlar beslenmesine ve verim performanslarına olan katkıları tartışmalıdır. Çünkü protozoaların defaunasyonu genellikle hayvanı olumsuz yönde etkilememektedir (Santra ve ark., 2007). Fizyolojik ve besinsel araştırmalara göre silliler iyi dengelenmiş amino asitleri ile bakterilere göre daha önemli bir azot kaynağı olarak konak hayvanın beslenmesinde önemli rol oynamaktadır. Silliler uygun koşullar altında mikrobiyal azotun %40'ını, toplam fermentasyon ürünlerinin %60'ını oluşturmaktadır.

1.2.1.4. Rumen arkeaları

Rumenin arkea grubu ökaryotlardan ve bakterilerden genetik, biyokimyasal ve yapısal özellikleri bakımından ayrılmaktadır (Eckburg ve ark., 2003). Şimdiye kadar ruminant hayvanların rumenlerinden arkea grubu içerisinde yer alan metanojenlere ait 5 cinse bağlı 7 farklı tür (*Methanobacterium formicium*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* ve *Methanoculleus olentangi*) izole edilmiştir (Joblin ve ark., 1990; Jarvis ve ark., 2000) Metanojenler rumende sayısal olarak önemli miktarlarda ($10^7 - 10^9$ hücre/ml) bulunurlar ve sayıları hayvanın besinine özellikle de besinin fibril içeriğine bağlı olarak değişmektedir. Metanojenler rumende fermentasyon sırasında açığa çıkan moleküler hidrojenin uzaklaştırılmasında önemli bir rol

oynamaktadır. Bu işlem rumen fermentasyonunu devamlı kılmaktadır. Fakat metan, ruminantlar tarafından kullanılabilen bir enerji kaynağı olmadığından hayvan tarafından kullanılacak enerjide büyük kayıplara neden olmaktadır (Kamra, 2005). Metan üretimi mikrobiyal proteini arttırsa da ruminant tarafından kullanılabilen substrat düzeyini düşürmektedir (Hungate, 1975).

1.2.1.5. Diğer rumen mikroorganizmaları

Rumendeki ana grupların dışında rumen ekosistemini oluşturan diğer mikroorganizmaların başında bakteriyofajlar gelmektedir. Bakteriyofajlar bakterilerin virüsleridir ve rumende çok sayıda bulunurlar. Rumende bulunan farklı bakteriler için spesifiktirler. Ayrıca, bakteriyofajların bakterileri parçalayabildikleri için bakteriler için zorunlu patojenler olarak da düşünülür. Bu fajlar, rumende bakterilerin kütle devrinin farklı beslenme çizelgelerindeki hayvanlar için o kadar faydalı olmadığı düşünülse de, bakteri hücrelerini parçalayarak, bakteri proteini kolaylıkla bir amino asit kaynağı olarak hayvanlara açık hale getirilir.

1.3. Rumen Ekosistemindeki Farklı Mikroorganizma Grupları Arasındaki İlişkiler

Rumen görünür simbiyozda bakterileri, protozoaları ve mantarları barındırır, ancak protozoa, önceden oluşturulmuş nükleotidler ve amino asitler için ihtiyaçlarını karşılamak üzere büyük miktarlarda bakteri barındırır, ancak yutulma oranı türler arasında değişir (Williams ve Coleman, 1992). İki ana protozoa grubundan entodiniyomorfiter, izotrichidlerden daha aktif bakteri predatörleridir (Dehority, 2003). Rumen mikroorganizmalarının bir kısmı, ihtiyaç duyulan besin maddelerinin temini için başkalarına bağımlı iken diğerleri antimikrobiyal bileşiklerin salgılarıyla antagonize olurlar. Bu nedenle, rumende optimum fermentasyon için bu mikroorganizmalar arasında çok hassas bir denge olmalıdır. Selüloz parçalayan bakterilerden *Ruminococcus albus* ve *R. flavefaciens*, çözünür bir protein üretirler ve bu rumen anaerobik fungusların (Stewart ve ark., 1992) selüloz parçalanmasını engeller iken kitinolitik bakterilerin bazı suşları da fungus büyümesini inhibe etmektedirler (Kopečný ve ark., 1996). *R. albus*, *R. flavefaciens*'in büyümesini engelleyen bir bakteriyosin sentezlemektedir (Odenyo ve ark., 1994).

Rumen mikroorganizmaları (bakteri, protozoa ve funguslar) arasında oluşan etkileşimler Wolin ve Miller (1988) tarafından gözden geçirilmiş ve lif parçalanmasına

katılan etkileşimler de Jouany (1989) tarafından gözden geçirilmiş olmasına rağmen, bakterilerin, protozoaların ve fungusların hücre duvarındaki bozulmaya nispi katkıları halen iyi anlaşılmamıştır. Onodera ve ark. (1988), karışık rumen protozoalarının endojen 1,4-b-glukanaz ile rumen ekosisteminde selüloz sindirimine katılımını göstermiştir. Coleman (1985; 1986) Newbold ve ark. (1989), ve Williams ve Withers (1991) rumendeki bitki materyali ile ilişkili selülitik aktivitenin% 62'sinin kaynakta protozoal olabileceğini ileri sürmüştür. Ayrıca, protozoadan hidrojen temini nedeniyle protozoa ve metanojenler arasında bilinen yakın bir ilişki vardır. *Entodinium longinucleatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Entodinium bursa* ve *Eremoplastron bovis* de dahil olmak üzere on bir protozoa türünün metanojenlere bağlı olduğu bulunmuştur (Kamra, 2005). Rumen, çok sayıda farklı mikrobik tür içeren ve mikroorganizmalar arası ilişkiler için büyük bir potansiyele sahip olan oldukça karmaşık bir ekosistemdir. Çeşitli çalışmalar, anaerobik fungusların hidrojen kullanan bakterilerle etkileşime girdiğini göstermiştir. (Irvine ve Stewart 1991; Joblin, ve ark., 1990; Joblin ve Williams 1991). Hidrojen kullanan bakterilerin varlığında, Metanojenler ve anaerobik funguslar gibi selülozun sindirimi daha etkili olduğu, bununla birlikte, anaerobik funguslarla rumen selülitik bakteriler arasındaki etkileşimler üzerine yapılan sonraki bir çalışmada, bakterilerin fungusların hidroliz kabiliyetlerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Bernalier ve ark.,1992; Bernalier ve ark.,1993).

Anaerobik funguslar (Neocallimastigomycota), rumen mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluşturur ve lif sindiriminde önemli bir rol oynar (Bauchop, 1979; Liggenstoffer ve ark., 2010; Gruninger ve ark., 2014). Bu anaerobik funguslar, bitkisel vejetatif yaşam döngüsü safhaları boyunca bitki materyalleri ile yakın ilişkilerinden dolayı, rumen sıvısında saptanabilen hareketli yaşam döngüsü fazının karakteristik özelliği olan erken rumen çalışmalarında göz ardı edilmiştir (Gruninger ve ark., 2014). *Neocallimastix frontalis* ve *Piromyces communis*, *Methanobrevibacter smithii* ile birlikte kültürlendikleri zaman, yonca ksilem silindirlerinin hücre duvarlarının etkili parçalayıcıları olmuşlardır (Bootten ve ark., 2011). Fungal aktivitenin engellenmesi, hücre dışı bir proteinin selülitik bakteriler tarafından salınmasına neden olmaktadır (Bernalier ve ark., 1993). Anaerobik fungusların protozoa ile birlikte kültürlenmesi, fungus popülasyonunu azaltır. Küçük boyutlu zoosporlar, fungusları yutan ve sindirebilen protozoalar tarafından yenilmektedirler

(Nagpal ve ark., 2010). Protozoal fraksiyon, hücre duvarı malzemesinin hem bakteriyel hem de fungal fraksiyonlar tarafından selülozini inhibe etmiştir. Bakteriler ve funguslar arasındaki kültürlerde sinerjik bir etkileşim tespit edildi. (SS. Lee ve ark. 2000). Ayrıca, Orpin (1984) anaerobik fungusların ve rumen protozoonlarının bir doğa sisteminde rekabetçi olmaktan ziyade tamamlayıcı olabileceğini bildirmiştir.

1.4. Rumen Ekosistemini Etkileyen Faktörler

Rumen mikrobiyotunun topluluk bileşimi potansiyel olarak diyet, konukçu genotipi, fizyolojik durum ve yaş gibi faktörlerden etkilenebilir. Aşırı karbonhidrat parçalanması ya da düşük pH'nın oluşmasında mikrobiyal büyüme üzerinde derin etkiye sahiptir. (Wells ve Russell, 1996; Dehority, 2003). Rumen mikrobiyotasına etki eden faktörler arasında en kapsamlı olarak beslenme araştırılmıştır (Popova, Martin ve ark., 2011, Carberry, Kenny ve ark., 2012, Zhang, Zhu ve ark., 2014). Düşük lifli bir diyetle beslenen hayvanlara kıyasla, yüksek lif / yem diyeti ile beslenen hayvanlarda, fibrolitik ve selüloolitik bakteriler olan *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* ve *Fibrobacteraceae* daha fazla bulunmaktadır (Mhuantong ve ark., 2013). Bununla birlikte, *Prevotellaceae* ailesinin üyeleri, yüksek nişasta içerikli bir diyetle beslenen hayvanlarda daha bol miktarda bulunmaktadır (Jisha ve ark., 2014). Farklı yem kaynakları, Zhang ve ark.'nın (2014) çalışmasıyla gösterildiği gibi farklı bakteri gruplarının büyümesini destekleyebilir, burada yonca samanı beslemesi *Prevotella* ve *Selenomonas* cinsi oranını mısır soya diyetine oranla arttırmıştır (Zhang, Zhu ve ark., 2014). Nötr deterjan lifi (NDF) yönünden zengin besinlerin tüketilmesi, rumen bakteri ve fungus topluluklarının çeşitliliğini ve selüloolitik mikroorganizmaların popülasyonunu artırabilmektedir (Belanche, Doreau ve ark., 2012). Diyet kompozisyonundaki değişiklikler sadece rumen içeriği ile ilişkili rumen mikrobiyal topluluk bileşimini değil, aynı zamanda keçilerde rumen epimural mikrobiyotasını da değiştirmektedir (Wetzels, Mann ve ark., 2015). Bunların yanı sıra, rumen mikrobiyotası üzerindeki diyet etkisi ile ilgili literatürde geniş kapsamlı kanıtlar bulunabilmektedir (de Menezes, Lewis ve ark., 2011, Stiverson, Morrison ve ark., 2011, Ellison, Conant ve ark., 2014). Bazı rumen bakterileri, doğumdan 1 gün sonra erken tespit edilebilir ve yaşla birlikte rumen mikrobiyotasının çeşitliliği ve grup içi benzerliği artar (Jami, Israel ve ark., 2013). Bu nedenle, rumen mikrobiyotasının erken yaşta beslenme manipülasyonu,

erişkin yaşantısında rumen gelişimi, üretkenlik ve bağışıklığı artırmak için olası bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Yanez-Ruiz ve ark., 2015). Buzağuların gelişmemiş rumen mikrobiyotasını karakterize etmek için metagenomik araçların kullanılması önerilmektedir (Li, Connor ve ark., 2012). Önceki gözlemler yaşın rumen mikrobiyal topluluğu etkileyen kritik bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Süt ineklerinin üç farklı ırkının sindirilebilirliği ve mikrobik popülasyonunu karşılaştıran bir çalışmada gözlemlendiği gibi, konukçu genotipi rumen mikrobik popülasyonunu şekillendirebilir. Jersey inekleri, daha büyük bir besin sindirimi ve *Ruminococcus flavefaciens*'in göreceli bolluğunu göstermişlerdir (Beecher, Buckley ve ark., 2014). Dahası, süt ineklerinin rumen mikrobiyotası, rumen içeriğini değiştirme sürecinde konakçı özgünlüğünü göstermiştir (Weimer ve ark., 2010; Piao ve ark., 2014). Bu, gelecekteki araştırmalarda hayvan deneylerinde rumen mikrobiyotasının konukçu özgünlüğünün dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Pitta ve ark. (2014), geçiş dönemi boyunca süt ineklerinde rumen mikrobiyal dinamik kaymalarını gözlemlemişlerdir (Pitta, Pinchak ve ark., 2010). Prepartum ve postpartum rumen mikrobiyomu arasındaki fark, konak fizyolojik evresinin rumen mikrobiyal dinamiklerini etkileyen kritik bir faktör olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte konakçının, fizyolojik aşamanın rumen mikrobiyal topluluğunun dinamikleri üzerindeki rolü için, ana sindirim parametrelerinin ve rumen mikrobiyal topluluğunun kombine analizi daha da gereklidir.

1.5. Rumen Mikroorganizmaları Tarafından Bitki Hücre Duvarı Parçalanması

Bakteriler, protozoa ve funguslar, rumendeki bitki hücre duvarı sindirimine karışan mikroorganizmalar olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte, rumendeki her bir mikrobik grubun ayrılmasının zorluğu, fungus biyokütlesinin ölçülmesindeki güçlükler ve rumen ekosisteminin karmaşık doğasına bağlı olarak, her bir mikrobiyal grubun bitki hücresinin parçalanması ve fermentasyonu için kesin rolü ve genel katkısı tam olarak anlaşılmamıştır. Rumen ekosistemindeki mikroorganizmalar (örneğin bakteri, protozoa ve funguslar) arasındaki karmaşık ilişkilere rağmen, bakterilerin sayısal baskınlığı ve metabolik çeşitliliği nedeniyle önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Cheng ve ark., 1991). Bununla birlikte, protozoaların toplam fiberin % 25-30'u kadar sindirimi olduğu gösterilmiştir ve fungusların tutulumunun kapsamı henüz tahmin edilmemiştir. Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim etkileri, sinerjiden antagonize kadar çeşitlilik

gösterebilir ve kullanılan mikrobik gruplara ve türlere ve kullanılan substratın türüne bağlıdır. Rumen mikrobik ekosisteminde bitki hücre duvarı sindiriminde bakterilerin, protozoaların ve fungusların oynadığı rolleri belirlemek için in vitro incelemeler denenmeye çalışılmıştır. Yine de, in vitro mikrobiyal süspansiyonların nasıl hazırlanacağı ve doğal çevrenin benzetimini nasıl yapacağı gibi birçok metodolojik problem devam etmektedir. Birçok çeşit yapay rumen ekosistemi yapılmıştır. Çalışmaların amacı, bakterilerin, protozoonların ve fungusların yapay koşullar altında bitki hücre duvar sindiriminde göreceli rollerini, belirli mikrobiyal grupların büyümesini veya önlenmesi için fiziksel ve kimyasal işlemler kullanarak tahmin etmektir. Bu sonuç, bakteriyel, protozoal ve fungus fraksiyonlarının ayrıştırılması için fraksiyonasyon yöntemlerinin deneyle devam etmesi için yeterli olduğuna dair fikrini desteklemektedir (Lee ve ark 2000).

1.5.1. Bitki hücre duvarlarının yapısı

Fibröz bitki hücre duvarı materyali pek çok ruminantın temel besinini oluşturmaktadır. Tipik otlaklarda bir kg kuru maddenin 400-700 gr'ını bitki hücre duvarı oluşturmaktadır (Akin, 1993). Dolayısı ile rumen, bitki hücre duvarlarının fermentasyonu için geniş ölçüde uyum sağlamıştır. Ruminantların besinini oluşturan yem bitkilerinin hücre duvarları, protein ve pek çok yapısal karbonhidrat içermesi nedeni ile temel olarak bilinen oduna ait hücre duvarlarından daha karmaşıktır. Bununla beraber bitki hücre duvarının yapısı bitki türlerine, bitki parçasına, doku tipine, bitkinin yaşına, ayrıca bitkinin içinde bulunduğu sıcaklık, fotoperiyot, nem ve toprak mineralleri gibi çevresel faktörlere bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir (Weimer, 1992).

Doğadaki temel depolanmış karbon kaynağını bitki hücre duvarları oluşturmaktadır. Bunlar selüloz (β -1,4-glukan'dan oluşan çözünmeyen fibriller), hemiselüloz (mannan ve ksilan gibi selülozik olmayan polisakkaritler) ve lignindir (kompleks polifenolik madde). Bu yapılar genel olarak lignoselüloz olarak isimlendirilmektedir (Thomson, 1993). Lignoselüloz, odunun kuru ağırlığının % 89-98 gibi büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Çeşitli yumuşak veya sert odun içeren ağaçların selüloz ve hemiselüloz içeren holoselüloz kısmı lignoselülozun % 63-78'ini oluştururken lignin %15-38'ini teşkil etmektedir (Colberg, 1988). Bitki lifi büyük

ölçüde selüloz ve hemiselülozdan oluşur.ss Selüloz, β -1,4 bağlı glikoz kalıntılarından oluşurken hemiselüloz esas olarak β -1,4 bağlantılı ksiloz kalıntılarından toplanan ksilandan oluşur. Ksilan; asetil, arabinosil ve glukuronil artıklarıyla ikame edilmektedir. Bu kompleks polimer matriksini indirgemek için, hidrolitik enzimlerin geniş bir senkron eylemi gerekmektedir (Barros ve Thomson, 1987; Kawai ve ark., 1987; Sipat ve ark., 1987; Ohmiya ve ark., 1988; Flint ve ark., 1989; McGavin ve ark., 1989). Matriks içerisinde yer alan selüloz mikrofibrillerinden meydana gelen temel bir yapıdan oluşmuştur. Bu matriks genellikle farklı yapılarda polisakkaritler, yapısal proteinler, glikoproteinler ve fenolik bileşenler içermektedir (Harris ve Smith, 2006). Selüloz yüksek bitki hücre duvarlarının ana yapısal bileşenidir ve bitki kuru ağırlığının yaklaşık % 35-50'sini temsil eder (Lynd ve ark., 1999). Bakterilerde, funguslarda ve deniz tunikatları gibi bazı hayvanlarda da bulunur (O'Sullivan 1997).

1.5.1.1. Selüloz

Bitki hücre duvarının ana bileşeni olan selüloz, dünyadaki en yaygın karbonhidrattır ve üretiminin yılda 100 milyar ton olduğu tahmin edilmektedir (Leschine, 1995). Ruminant hayvanlar, rumende mikroorganizmalar ile simbiyotik bir ilişki nedeniyle selülozu bir enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Ruminant hayvanlar tarafından selülozun kullanımını maksimize etmek için, rumen mikroorganizmalarının ekolojisi ve fonksiyonları ayrıntılı olarak anlaşılmalıdır. Temel olarak selüloz bitki materyalinin yaklaşık % 40'ını oluşturan polimerik bir bileşenidir ve dünya üzerindeki en bol polisakkarittir. Bitki hücre duvarı, enerji bakımından zengin bir yapısal polisakkarit olan yaklaşık% 40 selülozdan oluşur. (O'Sullivan, 1997). Selüloz, β 1-4 bağlı glikoz ünitelerinden oluşur. 15.000 glikozdan oluşabilen çözünür olmayan mikrofibrilleridir (Vogel, 2008). Bireysel mikrofibriller değişken selüloz zincir sayıları içerir ve ayrıca daha büyük bir tekli mikrofibril oluşturmak için diğer mikrofibriller ile ilişkilendirilebilir (Pizzi ve Eaton, 1985). Bu yapılar, birçok zincir içi ve zincir içi hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri vasıtasıyla birlikte tutulmaktadır (Ioelovich, 2008). Selülozun çeşitli selülozik olmayan hücre duvarı bileşenleri ile güçlü bağlar oluşturma kabiliyeti, bitki hücre duvarının yapısal dayanıklılık ve elastikliği açıklamaktadır (Baskin, 2001). Selülozun glikoza kadar yıkımı için başlıca 3 enzim sınıfı gerekmektedir; endoglukanazlar (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolaz) selüloz molekülü boyunca β -1,4-glikozil bağlarını rasgele kırar, sellobiyohidrolazları da içeren

ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolaz) poliglukan halkanın uçlarına saldırır ve bu uçlardan sellobiyoz ya da glikoz ünitelerini kopartır. β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21) ise sellobiyozu hidroliz ederler ve düşük moleküler ağırlıklı glikoz ortaya çıkartırlar (Beguin, 1990).

1.5.1.2. Ksilan

Selülozdan sonra hemiselülozlar bitkilerde bulunan ikinci en bol polisakkarittir. β -1,4-ksilan 1,4- β -D-ksilopiranoz ünitelerinden oluşan homopolimerik bir omurgaya sahip heteropolisakkarittir. Omurga, *O*-asetil, α -L-arabinofuranosil, α -1,2 glukuronik asit ya da 4-*O*-metil D-glukuronik asit bileşenlerinden meydana gelmiştir. Omurga üzerinde bulunan bileşenlere dayanarak ksilanlar doğrusal homoksilan, arabinoksilan, glukuronoksilan ve glukuronoarabinoksilan şeklinde karakterize edilebilirler (Kulkarni ve ark., 1999). β -1,4-ksilan genellikle bitkilerin ikincil hücre duvarında bulunmaktadır. Ksilan miktarı bitkiye göre değişiklik göstermektedir. Ksilan, selülozu enzimatik yıkıma karşı korumaktadır. Ksilan bitkiden uzaklaştırıldığı zaman selüloz selüloolitik hidrolize karşı daha açık olmaktadır (Thomson, 1993). Ksilanların yıkımı için, endo 1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8), ve β -ksilosidaz (EC 3.2.1.37) enzimleri ksilan tipine bağlı olmak kaydıyla ana şeker zincirine etki ederler. Ayrıca yan grupların yıkılması için α -glukuronidaz (EC 3.2.1.131) ve asetil ksilan esteraz (EC 3.1.1.72) enzimlerinin bileşimi gerekmektedir (Orpin ve Letcher, 1979).

1.5.1.3. Lignin

Lignin, hücre yapısının bütünlüğünün korunması, su taşınması ve bitki patojenlerine karşı korunmada önemli bir rol alan kompleks, oldukça dallanmış, aromatik alkollerin serbest radikallerinin rastgele meydana getirdiği hidrofobik polimerlerdir ve önemli bir sekonder hücre duvarı bileşenidir (Grabber, 2005). Lignin, rumen mikrobiyota tarafından enzimatik bozunmaya duyarlı değildir, ve dolayısıyla hücre duvarındaki varlığında yemlerin rumende parçalanmasının önleminde kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (Armstrong ve Gilbert, 1985; McAllister ve ark., 1994). Mekanik destek sağlayan kalın hücre duvarları genellikle lignin ile doymuş durumdadır. Bitki hücrelerinde ligninin depolanması orta lamelden başlar, birincil ve ikincil hücre duvarlarına doğru yayılır. Lignin içeren dokular, içermeyen dokulara göre daha mekanik ve biyolojik parçalanmaya göre daha dayanıklı ve serttir. Bu nedenle ligninler bitki yapısına öncelikle mekanik destek sağlar ve enzimatik yıkım ile

mikrobiyal parçalanmaya karşı bariyer görevi görürler (Loveless, 1983). Ligninin parçalanması oksijen gerektiren bir olaydır ve anaerobik olarak hızlı bir şekilde parçalanmadığı görülmektedir. Besi ortamında oksijen düzeyinin artması, lignini parçalayan enzim sistemlerinin de etkinliğini de arttırmaktadır. Bununla beraber hidrojen peroksit üretimi de artmaktadır. Ligninaz veya lignin peroksidaz lignin polimerinin parçalanması için gerekli enzimlerdir. Manganez peroksidaz, ligninin parçalanmasında görev alan diğer bir enzimdir. Bu enzimlerin fenol-oksiteleyen enzimler olarak görev aldığı ve hidrojen peroksit üretiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Lakkaz veya fenol oksidaz (EC 1.10.3.2) enzimleri fenollerin fenoksi radikallerine oksidasyonunda yer almaktadır (Kirk ve Farrel, 1987).

Otların hücre duvarlarında lignin öncülleri olan ferulik ve *p*-kumarik asitler genellikle lignine arabinoksilan ile birlikte ester ve eter bağlar ile bağlı olan fenolik bileşiklerdir (Wubah ve Kim, 1996). *p*-kumarik asit, ferulik asite göre mikrobiyal yıkıma daha dayanıklıdır. *p*-kumarik asitin daha az sindirilebilen fibrillerde ferulik asitten daha çok olduğu ve hücre duvarında daha farklı bir yapısal çevrede bulunduğu ayrıca *in vitro* koşullarda toksisitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Akin ve Benner, 1988). Fenolik bileşikler selüloolitik ve selüloolitik olmayan ruminal bakterilerin büyümesini ve bitki hücre duvarını parçalamasını engellemektedir (Borneman ve ark., 1986; Martin, 1990). Fenolik monomerler selüloolitik ruminal bakterilerin fibril partiküllerine tutunmasını azaltmaktadır (Akin ve ark., 1988). Fenolik bileşikler enzim aktivitesini de etkileyebilmektedir (Forsberg ve ark., 1981).

1.5.1.4. Pektin ve proteinler

Pektinler, genellikle α -1,4-D-poligalakturonat omurgasından meydana gelmektedir ve asidik polisakkaritler ile bağlantı kurmaktadır. Galakturonan omurgasında α -1,2-bağlantılarıyla bağlı L-ramnoz residüleri bulunmaktadır ve molekülün kıvrılmasını sağlayarak poligalakturonatın helikal yapısının oluşmasını sağlar (Nordkvist; 1987). Pektinolitik enzimler, pektin esteraz ve depolimerize edici enzimler olarak iki sınıf altında toplanmaktadır. Pektin esteraz (EC 3.1.1.11), pektini pektik asit ve metanole dönüştüren metil ester bağlarını hidrolize etmektedir. Depolimerazlar, endo-poligalakturonaz (EC 3.2.1.15), ekzo-poligalakturonaz (EC 3.2.1.67), endo ve ekzo metoksi pektinliyaz (EC 4.2.2.10) ve endo pektin liyaz olmak üzere beş sınıfta incelenmektedir (Orpin, 1984).

Bitki hücre duvarlarında polisakkaritler ile ilişkili olarak bulunan proteinler gelişen hücre duvarının yeniden şekillenmesinde görev alan enzimler olarak veya yapısal olarak rol almaktadır. Primer duvarlarında proteinler, kuru maddenin % 10'unu teşkil etmektedir. Hücre en son büyüklüğüne ulaştığında ve hücre duvarının genişlemesi tamamlandığında “ekstensin” (hidroksiprolince zengin glikoprotein) proteininin miktarı artmaktadır. Bu proteinin hücrenin son şeklinin verilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Cheng ve ark., 1991).

1.5.1.5. Likenan

Likenan, *Cetraria islandica*'nın temel bir polisakkariti olup β -D-glukopiranoz ünitelerinin 1,4 ve 1,3 glikozil bağlar ile doğrusal bir şekilde bir araya gelmesiyle meydana gelmektedir. Bu polisakkaritin bilinen diğer önemli kaynağı ise Gramineae ailesine ait olan yulaf ve arpadır. Yapılan kimyasal araştırmalar sonucunda farklı kaynaklardan izole edilen bu polimer arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Likenan içerisindeki 1,4 bağlarının oranı % 70, 1,3 bağlarının oranı ise % 30 olarak bulunmuştur (Perlin ve Suzuki, 1962). 1,3-1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolaz (β -glukanaz; likenaz) (EC 3.2.1.73) likenan içerisindeki β -1,4 bağlarına komşu olan β -1,3 bağlarını kırarak sellobiyosiltirioz ve sellotriosiltetraoz meydana getirmektedir (Chen ve ark., 1997).

1.5.2. Karbonhidratları parçalayan enzimler

Beslenmedeki karbonhidrat, lif (örn. NDF) ve lif içermeyen karbonhidratları (NFC) oluşturur. Bileşenlerin kimyasal yapısı beslemenin analitik yönlerini yansıtır. Bununla birlikte, sadece saf substratlar beslenmez ve bitkilerin karmaşık yapısı garanti altına alınır, substratı anlamak zorunlu iken, beslemeleri anlamak kadar önemlidir. Örneğin, farklı konsantre yemlerin fermentasyon üzerinde farklı etkileri vardır; tahılların bazıları çok benzer nişasta içeriğine sahip olmalarına rağmen fermentasyon oranları (Opatpatanakit ve ark., 1994) ve ruminal asidoz riski üzerinde farklı etkileri görülebilir (Lean ve ark., 2013). Bu taneler bağımsız bağlamda çalışmazlar ve konsantrasyonların fermentasyonunun sonuçları, diyetin lif ve protein içeriğinden etkilenir. Dahası, tanelerin işlenmesi, rumen işlevi üzerinde derin etkilere sahiptir. Rumen mikroorganizmalarının çoğu, bir enerji kaynağı olarak karbonhidratlara bağımlıdır. Optimal fermentasyon, mikrobik büyümeyi sürdürmek için fermente

edilebilir karbonhidratların ve kofaktörlerin kesintisiz bir şekilde tedarik edilmesini gerektirir. Böylece, değişen fermantasyon hızlarına ve kompozisyonlara sahip bir karbonhidrat karışımı, aşırı asit üretimi ile çok hızlı bir fermentasyonun veya hayvansal besin maddesi gereksinimlerini karşılamayan çok düşük bir fermantasyonun yapılmasını önler. Bitki polisakkaritleri (nişasta, selüloz, hemiselüloz ve pektinler), rumen bakterileri, fungusları ve bazı protozoaların ekstraselüler enzimleriyle monosakaritlere ve 3 ila 10 şekere (oligosakkarit) fermente edilir. Bu şekerler, hücre içi bakteri enzimleri ile piruvata dönüştürülür. Piruvat, ağırlıklı olarak asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere VFA'ya, ayrıca CO₂, H₂ ve CH₄'e indirgenir. Nişasta fermantasyonu, endojen enzimler tarafından glikoza dönüşümünden % 20 daha az enerji üretse de, yapısal karbonhidratların mikrobik fermantasyonu, yüksek lifli diyetlerde hayvanlara bir avantaj oluşturmaktadır (Baldwin ve ark.; 1995). Bununla birlikte, nişastayı ince bağırsağa baypas etmek için konsantreleri (örneğin, ince öğütülmüş mısır) işlemek ve böylece daha yüksek kullanım veriminden yararlanmak mümkündür. VFA üretim hızı, substrata bağlıdır: çözünebilir karbohidratların bu hızı (nişastalar ve şekerler) > pektin > selüloz şeklindedir. Bu düzen VFA nihai ürününü de belirler. Asetat ve bütirat üretimi, NDF, pektinler ve şeker sindiriminde tercih edilmektedir. Yüksek bütirat seviyeleri bazı silajlarda bulunur ve kullanılır. Propionat üretimi için şekerlerin, nişastanın ve çözünen karbonhidratın bozunması tercih edilir. Laktik asit üretimi, şekerlerin ve nişastaların bozulması tarafından seçilir. Doğumda tutarlılık, doğum şekli, sığırların seçici olabilme kapasitesi ve beslenmenin antinutritional özellikleri, bir diyetin etkili olup olmadığını etkiler. Ayrıca, diyet formülasyonu, maliyet-etkin çözümler için ihtiyaçtan etkilenir (Lean ve ark, 2014).

1.5.3. Selülozun mikroorganizmalar tarafından biyodegradasyonu

Selülozun glikoza kadar yıkımı için başlıca 3 enzim sınıfı gerekmektedir; endoglukanazlar (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolaz) selüloz molekülü boyunca β -1,4-glikozil bağlarını rastgele kırar, sellobiyohidrolazları da içeren ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolaz) poliglukan halkanın uçlarına saldırır ve bu uçlardan sellobiyoz ya da glikoz ünitelerini kopartır. β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21) ise sellobiyozu hidroliz ederler ve düşük moleküler ağırlıklı glikoz ortaya çıkartırlar (Beguin, 1990).

1.6. Rumen mikroorganizmalarının tanımlanmasında kullanılan bölgeler

1.6.1. Bakteriler için 16S

16S rRNA gen dizilimi ilk olarak filogenetik analizler için 1985 yılında kullanılmıştır (Lane ve ark., 1985). Primer tasarım için hem yüksek oranda korunan bölgeler hem de mikroorganizmaların filogenetik özelliklerini tanımlamak için hiperdeğişken bölgeler içerdiğinden, 16S rRNA gen dizisi, bakteri topluluklarının profilini çıkarmak için en yaygın olarak kullanılan marker geni haline gelmiştir (Tringe ve ark., 2008). Tam uzunluktaki 16S rRNA gen dizileri, dokuz yüksek oranda korunan bölge ve dokuz hiperdeğişken bölgeden oluşur (Baker ve ark., 2003; Wang ve ark., 2009). Birçok çalışmada kullanılan 16S rRNA gen dizileri, dizileme teknolojisi ile sınırlandırılan kısmi dizilerdir. Bu nedenle, uygun primerlerin seçimi, çeşitli ortamlarda bakteri filogenisini incelemek için kritik önem taşır. Bu genin değişken dizisi, kısa bilgilendirici bölgeleri parantezleyen evrensel primerler oluşturulmasına izin verir. Bununla birlikte, bakteri çalışmalarında 16S rRNA'nın dokuz değişken bölgesinin hangisinin hedef alınması konusunda herhangi bir görüş birliği bulunmamaktadır.

1.6.2. Funguslar için ITS (Internal transcribed spacer)

Yakından ilişkili taksonları birbirinden ayırmak için internal transkripsiyon spacer bölgesi (ITS) kullanılmıştır. ITS bölgeleri temelde yapısal rRNA arasında yer alan fonksiyonel olmayan bir RNA parçasıdır (Sahare, 2013). ITS bölgeleri AF sınıflamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. ITS primerlerini kullanmanın avantajları, yakından ilişkili olan anaerobik fungus taksonunu incelemek ve ekolojik davranışlarını bilmektir. Bu tekniği kullanarak, Koetschan ve ark. (2014) anaerobik fungus'a özgü ITS1 bölgesinin ortak bir ikincil yapısını önermekle anaerobik Fungus taksonomisini revize edebilmiştir. Ayrıca, bu teknik birçok yeni anaerobic fungus neslinin keşfedilmesinde yardımcı olacaktır.

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır (Şekil 1.3). ITS bölgesi içerdiği yoğun farklılıktan dolayı funguslarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır (White ve ark., 1990, Bruns ve ark., 1991, Lee ve Taylor, 1992).



Şekil. 1.3. Anaerobik funguslardaki ITS bölgesi ve rRNA bölgeleri

1.7. Rumen Mikrobiyal Popülasyonun Belirlenmesi

1.7.1. Manuel olarak belirleme

Şimdiye kadar fungal populasyon büyüklüğünün belirlenmesi için zoospor sayımı (birimi tallus oluşturma ünitesi; TFU) ve fungusların dilusyon serileri (birimi en muhtemel sayı; MPN) olmak üzere iki klasik metot geliştirilmiştir (Orpin, 1975; Theodorou ve ark., 1990). Ancak bu metotlar fungal populasyonun büyüklüğünü tam yansıtmamaktadır çünkü polisentrik funguslar nadir olarak zoospor oluşturdıkları için bu cinslere bağlı kültürlerin tam olarak sayılması oldukça zordur. Bununla beraber sahip oldukları oldukça dallanmış rizoidal sistemleri nedeniyle homojen bir fungal kültürü elde edilemeyeceği için seri olarak dilüsyonlarını da hazırlamak mümkün değildir. Orpin ve Joblin (1988) tarafından kitinaz kullanılarak fungal biyokütlenin ortaya çıkartılması yönteminin ise aerobik fungal kontaminasyondan dolayı oldukça hataya açık olduğu yine yazarlar tarafından bildirilmiştir. Bu noktada moleküler teknikler kullanılarak 18S rDNA ve 5.8 rDNA genleri arasında yer alan ve yüksek varyasyon gösteren ITS1 bölgesine özel primerler ile Real-time PZR yardımıyla fungal populasyonları izlemek mümkündür. Bu metot rumen funguslarının izolasyonunu gerektirmeden doğrudan rumen sıvısındaki fungal populasyonun değişimleri hakkında bilgi vermektedir (Denman ve McSweeney, 2006).

1.7.2. Moleküler tekniklerle belirleme (Real-Time PZR)

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) veya kinetik polimeraz zincir reaksiyonu olarak da adlandırılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, hedeflenen bir DNA molekülünü amplifiye etmek ve aynı anda ölçmek için kullanılmaktadır. Bir DNA örneğindeki bir veya daha fazla spesifik sekans için, RT-PZR hem saptama hem de nicelleştirmeyi mümkün kılmaktadır. DNA girişi veya ek normalleştirici genlere normalize edildiğinde miktar, mutlak sayıda kopya veya göreceli bir değer olabilir. Gerçek zamanlı PCR, hibritleşmenin dezavantajlarının

birçoğunun üstesinden gelerek DNA'yı tek bir işlemde hızla ölçmek için geliştirilmiştir (Holland et al., 1991; Higuchi et al., 1993).

Mikroorganizmaların uzun yıllar sayımında kullanılmalarına rağmen mikroskopik sayım ve/veya mpn (most probable number) teknikleri gibi geleneksel yöntemler, özellikle ölü hücreler ile canlı fakat kültüre alınamayan (ör. Bazı protozoa cinsleri, bazı gram-negatif bakteriler...) hücrelerin sayımında yetersiz kalmaktadır (khan ve ark., 2010). Diğer taraftan moleküler yöntemler duyarlı ve kesin sonuçlar vermesi, gerek ölü hücreler gerekse kültüre alınamayan mikroorganizmaların sayımlarının başarılı bir şekilde yapılabilmesi gibi özellikleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır (de la cruz ve ark., 2011). Günümüzde mikrobiyal yapının ve dinamiğinin belirlenmesinde yaygınlaşmaya başlayan real time PZR teknolojisi, konvensiyonel PZR'ın kinetik kazanmış bir teknolojisidir. Bu teknolojinin PZR'dan en önemli farkı hedef bölgenin lineer olarak logaritmik artışının gözlenebilmesi ve buna bağlı olarak kantitatif analiz yapabilme imkanı sunmasıdır. PZR' cihazına optik bir modül eklenerek işaretlenmiş PZR ürünlerinin oluşturduğu floresans ışımlar bu modül ile tutulmaktadır. PZR'ın her bir döngüsü sırasında oluşan floresans sinyalin yoğunluğu cihaz tarafından algılanarak bilgisayardaki yazılım ile kaydedilmektedir. Yazılım verileri grafik olarak eş zamanlı görüntülemekte ve kantitatif analiz için hesaplamaları yapmaktadır. Böylece PZR sonrası boyama görüntüleme gibi işlemlere gerek kalmamaktadır (hanna ve ark., 2005).

Rumen mikroorganizmalarının PZR bazlı metotlar ile tanımlanabilmesi için ise hedef gen bölgesinin seçimi özellikle önem taşımaktadır. Genellikle prokaryotik 16S veya ökaryotik 18S rRNA geni tanımlamada hedef gen bölgesi olarak kullanılmaktadır. Yüksek derecede korunmuş olması, bütün organizmalarda çok sayıda kopyasının bulunması sebebi ile hedef gen bölgesi olmasının nedenidir (Beneduce ve ark., 2007). Tür altı seviyede ayırım yapabilmek için kullanılan hedef gen bölgesi ise intergenik RNA boşluk bölgeleri olarak seçilebilmektedir. Bu kodlanmayan bölgeler evrilme sürecinde daha az baskıya maruz kaldıklarından dolayı değişkenlik göstermekte ve tür altı seviyede sınıflandırmada yapabilmek imkânı sunmaktadır (Rijpens ve Herman, 2002). Real-time PZR farklı çevrelerden (toprak, fermente ürünler, bitkisel material, dışkı vb) toplanmış olan örneklerden toplam DNA yardımıyla mikrobiyal populasyonların kantitatif olarak tayin edilmesinde son yıllarda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Yu ve ark., 2005; Selma ve ark., 2008; Kok ve ark., 2013).

Rumen mikrobiyolojisine yönelik olarak yapılan çalışmalarda ise en fazla ilgiyi özellikle mikrobiyal protein miktarına ve çevreye olan negatif etkilerine ek olarak rumende yüksek oranda (%15 lere kadar) enerji kaybına neden olmasından dolayı rumenin arkea grubu almaktadır (Yu ve ark, 2005; Guo ve ark., Zhou ve ark. 2011; Tan ve ark., 2011; Han ve Gu, 2013).

Diğer taraftan rumende bitkisel biyokütlenin biyodegradasyonunda ana görevi üstlenen fibrolitik popülasyonun dinamiği ve yapısının belirlenmesi özellikle hayvan besleme açısından son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Rumenin fungal grubunun yapısının belirlenmesi amacıyla yapılan PZR temelli çalışmalarda ise Denman ve McSweeney (2006) dönüm noktası niteliğindedir. RT-PZR kullanılarak yapılan çalışmaların en hassas noktasını primer setlerinin hedef organizma grubunu ne kadar kapsadığı konusu oluşturmaktadır. Özellikle funguslarda kullanılmış ve literatürde yer almış bazı primer setlerinin hedef organizmayı kapsamada kısıtlı kaldığı bilinmektedir (Edwards ve ark., 2008). Rumen mikrobiyal dinamiğinin besleme rejimiyle ilişkisini ortaya konulması amacıyla Kok ve ark., (2013), yüksek oranlarda kondanse tanin içeren *Leucaena leucocephala* ile beslenen keçilerde rumen fungus içeriğinin ilk 10 gün değişmediğini, beslemenin 15 inci gününde mikrobiyal popülasyonun kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat arttığını 30. gün itibariyle ise sayının kontrol grubuyla aynı olduğunu RT-PZR sayımıyla ortaya koymuşlardır.

Rumen mikrobik ekosistemi karmaşıktır ve lignoselülozik beslemelerin uçucu yağ asitlerine biyolojik olarak dönüştürülmesinden sorumludur. Bu nedenle, bireysel rumen mikrobunun spesifik rolü, ekosistemin hayatta kalması için diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek zorunda olduğu için önemlidir. Ekosistemdeki belirli bir bakteri türünün numaralandırılması, gerçekleştirilecek çok sayıdaki biyokimyasal testler ve tekniğin, ekosistemde mevcut olan en baskın mikroorganizma için bile hatalı olması nedeniyle konvansiyonel tekniklerle zordur. Bu belki de, bu mikroorganizmaların göreceli sayıları, ekosistemde metabolik olarak aktif olana kıyasla bir petri tabağında yetiştirildiğinde değişeceğinden, numaralandırma için kullanılan aracın seçim basıncından kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, rumen mikroorganizmalarının (diğer eko-sistemdeki gibi) çok büyük kısmı kültürlenemez, ancak rumen fermentasyonunda aktiftir. Bu nedenle, bu ekosistemde, rumen mikrobik ekolojisini inceleyen konvansiyonel tekniklerin bu sakıncalarına dikkat edebilecek

belirli mikroorganizmaların nicelleştirilmesi için daha iyi bir teknik aramak önemlidir. Rumende bulunan çok sayıda bakteri kültüre alınabilir değildir, çünkü belirli bir ortamdaki toplam canlı bakteri sayısı mikroskobik bakteri sayısından çok daha düşüktür. Rumen'in kültürlenebilir bakterilerinin çoğalmasını destekleyen tek bir kültür ortamı yoktur. Bu nedenle, rumenin kültürlenebilir bakterileri hakkında mevcut bilgiler eksiktir. Rumen bakterilerinin fenotipik özelliklere ve biyokimyasal testlere göre sınıflandırılması, kültürlenebilir organizmalar arasındaki çeşitliliği incelemek için yeterli değildir. Rumen bakteri moleküler biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* ve *Ruminococcus*'un, bu cinslerin türlerinin fenotipik ve biyokimyasal olarak benzer olduğu gerçeğine rağmen, filogenetik olarak farklı bakteri gruplarını temsil ettiğini göstermiştir (Forster, R. J. 1996). Diyet değişikliğine bağlı olarak farklı mikroorganizma gruplarındaki değişim, kültürlenebilir mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu için geleneksel yöntemlerle incelemek zordur. Bu nedenle, rumen bakteri sayısındaki bu tür değişiklikler bakteri 16S rRNA'nın bazı bölgelerine homolog olan farklı oligonükleotid DNA problemlerini kullanarak kolayca incelenebilir (Stahl, 1988). Toplam mikrobik kütlenin tahmin edilmesi için evrensel bir prob ve belirli bir bakterinin bir türünün toplam rRNA'sının nispi oranını belirlemek için bir türe özgü prob kullanılabilir. 16S rRNA oranı: toplam hücre RNA'sı büyüme eğrisi boyunca değişmediğinden, 16S rRNA, rumende toplam bakteri popülasyonunun bir ölçüsü olarak kullanılabilir (Briesacher, 1992). Belli bir bakterinin konsantrasyonu, rumen içeriğinin ml'si başına 10 milyon hücreyi aşarsa, karışık bir popülasyonda tek bir bakteri suşunu numaralandırmak için spesifik DNA problemleri de kullanılabilir (Attwood, 1988). Tajima ve ark. (2001) tarafından rumen bakterilerinin 13 türünün tespiti için tasarlanmış ve tekrar validasyona tabi tutulmuş PZR primerleri ve bu primerler, rumen mikrobik ekosistemdeki bu bakterilerin miktarının tespiti için gerçek zamanlı PZR ile kullanılmıştır. Illinois, ABD'de rumen mikrobik ekolojisinde ilk defa gerçek zamanlı PZR kullanmıştır ve diyetdeki değişikliğe bağlı olarak göreceli mikrobik sayıların varyasyonlarını incelemek ve rumende belirli bir bakterinin geliştirilmiş bir suşunun kurulmasını incelemek için en önemli tekniklerden biri gibi görünmektedir. Buna ek olarak, bu primer setleri, yeni bakteri izolatlarının evcil ve vahşi hayvanların rumeninde ön tanımlama için de kullanılabilir.

Bu yeni teknikler aynı zamanda rumende yem kullanımının mekanizmasını anlamada yardımcı olabilir. Yakın zamana kadar nişasta bakımından zengin diyetle beslenen hayvanların rumende nişastayı kullanan baskın bakterilerin *Streptococcus bovis* olduğu düşünülmüştür (Mackie, R. I.1979), Ancak gerçek zamanlı PZR ile yapılan çalışmalar, hayvanların çoğunun kaba yemden kesif yeme geçildiğinde *S.bovis* sayılarının etkilenmediğini göstermiştir, *S.bovis* yerine laktat kullanan bir bakteri olan *Megasphaera elsdenii* belirlenmiş ve daha düşük laktat ve daha yüksek propiyonat içeriği ile sonuçlanmıştır.

Nişasta hidrolizi için bazı diğer mikroorganizmalar aktif olabilir. Bu nedenle, daha yeni moleküler biyoloji teknikleriyle, farklı bakteri gruplarına verilen metabolik rollerin yeniden tesis edilmesi gerekebileceği ve rumen mikrobiyolojisinin senaryosunun önümüzdeki on yıllarda tamamen farklı olacağı görülmektedir.

Bitki hücre duvarı bozulmasında kilit rolleri nedeniyle, beslenme değişikliklerine yanıt olarak selülitik bakteri popülasyonlarının dinamikleri, ya 16S rRNA ya da 16S rDNA genini hedef alan çeşitli moleküler yaklaşımlar kullanılarak özellikle iyi çalışılmıştır (Stahl ve ark. 1988; Krause ve ark., 1999; Koike ve Kobayashi 2001; Tajima ve ark., 2001; Koike ve ark., 2003; Krause ve ark., 2004; Denman ve McSweeney 2006; Stevenson ve Weimer 2007). Fakat, selülitik bakteri türlerini nicelleştirmek için 16S rRNA hedefleme problemleri veya rekabetçi PZR kullanımı, yüksek enerjili diyetlerin selülitik bakteri popülasyonlarında bir düşüş ile sonuçlanabileceğini açıkça göstermemiştir (Weimer ve ark., 1999; Koike ve Kobayashi 2001; Martin ve ark., 2001). Martin ve ark. (2002) Bu diyet tipinin, fibrolitik enzim aktivitelerini selülitik bakterilerin sayısından daha fazla etkilediğini savunmuşlardır. Böyle bir diyetin *F. succinogenes* ve *R. flavefaciens*'in popülasyon büyüklükleri üzerindeki etkisini gösteren tek çalışmada gerçek zamanlı PZR kullanmış ve sığırlarda yürütülmüştür (Tajima ve ark., 2001).

Mosoni ve ark., (2007) gerçek zamanlı PZR kullanarak koyun rumeninde bulunan üç ana selülitik bakteri türü sayısı üzerine bir yem diyetine konsantre desteğinin etkisini yeniden incelemişlerdir ve bu çalışma, ilk defa, koyun rumen ekosisteminde gerçek zamanlı PZR ile selülitik bakterilerin miktarının belirlenmesini rapor etmiştir. Ayrıca, bir mikrobik yem katkı maddesinin etkisi de değerlendirilmiştir. . Bugüne

kadar, yüksek konsantre yemle beslenen hayvanların rumende hedeflenmiş selülitik türlerin sayısına bir maya katkısı besleme etkisi hakkında veri mevcut değildir. Canlı *S. cerevisiae* hücreleri içeren mikrobiyal ürünlerle direk beslenen Rumen kolonizasyonu; selülitik bakteri ve yem temelli diyetlerle beslenen genç konvansiyonel ve gonotoksik kuzulardaki fibrolitik aktivitelerin vasıtasıyla ve aynı zamanda in vitro bazı selülitik bakteri türlerinin büyümesini teşvik etmek için geliştiğini göstermiştir (Girard ve Dawson 1995).

Bunlara ek olarak, hayvanlar yüksek konsantre diyetlerle beslendiğinde rumen pH'sını stabilize ederek ve artırarak rumen fermantasyonu üzerinde faydalı bir etkiye sahiptirler (Williams ve ark., 1991; Michalet-Doreau ve Morand 1997; Bach ve ark., 2006) ve sonuç olarak selülozik bakteri popülasyonlarını ve / veya bu tür diyet koşullarındaki aktiviteleri olumlu bir şekilde etkileyebilirler.

1.8. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Hayvan besleme açısında son yıllarda en fazla üzerinde yoğunlaşılın konulardan birini de rumen mikrobiyal popülasyonunun yapısı ve dinamiği oluşturmaktadır. Bu değerlerin elde edilmesi amacıyla konvansiyonel yöntemlerin yanısıra son yıllarda moleküler teknikler ön plana çıkmaya başlamıştır. Rumen mikrobiyal dinamiğinin belirlenmesine yönelik moleküler yaklaşımlardan AFLP analizi, DGGE analizi gibi metodlar 2000 li yılların başından beri kullanılmasına ve değerli bilgiler vermesine karşın son dönemde uygulama alanı bulan qRT-PZR daha kısa sürede yüksek kalite ve kantitede veri elde etmede avantaj sağlamaktadır. Rumen mikrobiyal fauna/florasındaki bakteri ve fungus popülasyonunu ortaya çıkaracaktır. Çalışmamızda literatürde yer alan ve rumen mikrobiyal türleri için tasarlanmış RT-PZR primer-prob setleri kullanılacağı gibi tez kapsamında dizayn edilecek olan ve spesifiklikten ödün vermeden daha geniş spektrumlu yeni primer/prob setleri ile özellikle cins/tür düzeyinde tanımlama ve bakteri ve fungus miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalara yeni boyut kazandıracaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Anaerobik selülozik bakterilerin yetiştirilmesi için petri tabakları kullanılmadığından ve agar tüplerindeki selüloz izlerini ("shake tüpleri") görmede zorluk çeken Dr. Hungate, test tüplerinde ince agar tabakaları elde etmek için selüloz sindirimi ve koloni morfolojisi daha kolay görülebilen "roll tüpler" geliştirmiştir. Bugün bile, "rolltube tekniği" çeşitli anaerobik habitatlardan zorunlu anaerobların kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hungate bir bakteriyel ekosistemin üyelerini izole etmek ve büyütmek için bir habitat veya çevresel nişin en doğru simülasyonunu geliştirmeye odaklanmıştır. Anaerobik bakteri üreterek Hungate tekniği adı verilen bu yöntem, bir kültür tüpündeki doğal ortamın koşullarını taklit etmek için yaratıcı konseptte öncülük eden Winogradsky kolonunun (fotosentez bakterilerini incelemek için kullanılır) geliştirilmesine dayanmaktadır (Brock et al., 1994).

Bakterilerin ayrılması ve tanımlanması için geleneksel kültürleme yöntemlerine dayanan rumen ekolojisini tanımlayan sınırlı sayıda rapor bulunmaktadır. Minato ve ark. (1989) amonyak işleminden geçirilmiş samanın rumen bakteri florası üzerine beslenme etkisini açıklamış ve *Eubacterium ruminantium*'un büyümesini uyardığı görülmüştür. Orpin ve ark. (1985), kışın şiddetli diyet koşulları altında selüloolitik *Butyrivibrio fibrisolvens* sayısının arttığını ortaya koyarak yabani geyiklerde rumen bakterilerinin mevsimsel değişimini tanımlamıştır. Her iki çalışma, bakteri sayımı verilerini elde etmek için zahmetli işlem gerektiren geleneksel kültürleme yöntemlerine dayanmaktadır. Rumen bakterilerinin 16S rDNA sekanslarına dayalı analizi, Whitford ve ark. tarafından başlatılmıştır (1998), ardından Tajima ve ark. (1999) tarafından sığır rumen sindirimi kullanılmıştır. O zamandan beri, diğer kütüphaneler, rumen bakteriyel ekolojisi anlayışını derinleştirmek için farklı kaynaklardan (hayvan türleri, ırklar, yem türleri, bağırsak örnekleme alanları vb.) gelen örneklerle yapılandırılmış ve analiz edilmiştir.

DGGE ve real time PZR (Sylvester ve ark., 2004) gibi SSU rDNA'yı hedefleyen kültürden bağımsız teknikler, ilgilenilen mikroorganizmaların doğrudan analiz edilmesini ve nicelenmesini sağlamaktadır. Çeşitli diyet koşulları altında (Tajima ve ark., 1999; Kocherginskaya ve ark., 2001; Tajima ve ark., 2001) ruminal bakteri popülasyonlarındaki değişiklikleri incelemek için veya farklı diyetler arasında geçiş

sırasında, SSU rDNA ile ilgili çok sayıda çalışma yürütülmüştür (Tajima ve ark., 2000). Diğer çalışmalarda, rumendeki parçacık ve sıvıya bağlı bakterileri (Larue ve ark., 2005) veya rumen içine yerleştirilen in situ torbalar içinde ayırmak için moleküler teknikler kullanılmıştır (Koike ve ark., 2003b).

Fungal biyokütlenin büyüme durumunun ve filogenetik sınıflamasının genel olarak belirlenmesi için mikroskopi halen en basit yöntemdir. Bununla birlikte, tanımlama yapabilmek için belirli bir beceri ve tecrübe seviyesi gerektirir ve bulunan kimlik anahtarlarının yardımı ile bile yapılabilir Ho ve BarrH (1995) ve Orpin (1994). Anaerobik fungusların monosentrik veya polisentrik gruba daha doğru bir şekilde bağlanması için, rhizoidal veya halkasal cinslerle sınıflandırma nispeten kolaydır; DNA bağlayıcı flüoresan boyalar DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) veya Hoechst grubunun (bisbenzimidides) boyaları kullanılmaktadır. Mikroskopik yaklaşımda, *Piromyces* ve *Neocallimastix* arasındaki farklar yada *Orpinomyces* ve *Anaeromyces* gerektiğinde sınırına ulaşır ve genellikle monoflagellat veya poliflagellat zoosporların kontrol edilmesi için zoospor salımına tanık olunamaz. Diğer bir dezavantaj, özellikle bitki artıklarını içeren çevresel numunelerin mikroskopisinde, fungus ve bitki biyokütlesinin açıkça farklılaşmasıdır. Floresan mikroskopi sırasında bitki materyalinin otofloresansı, geniş bir dalga boyu aralığında açıkça fungus yapılarının belirgin tanımlanmasını engeller. Calcofluor White veya Solofenil Flavine 7GFE 500 ve Pontamine Fast Scarlet 4B (99) gibi daha yakın zamanlarda önerilen boyalarla boyama; Hücre duvarları, septa ve tomurcuk yara izleri gibi fungus biyokütlenin kitinöz yapılarını vurgulamasına yardımcı olur, ancak bu boyaların selüloz ve diğer şeker polimerleri için benzerlik sorunu olabilir. Bu sorunu atlamak için özel boyama protokolleri uygulanabilir. Bir olasılık, Leis ve arkadaşları (Leis ve ark., 2014) tarafından anlatıldığı gibi Başlangıçta bitki kökü funguslarını ortaya çıkarmak için kullanılan bir yaklaşım olan laktofuksin lekelenmesidir., ör. Arbusküler mycorrhizas. Kültüre bağımlı teknikler, örneğin Tallus oluşturma üniteleri (TFU) ile fungus miktarının ölçülmesi genel olarak en muhtemel numara (MPN) yöntemi vasıtasıyla ve Joblin tarafından tarif edilen silindir tüpü yöntemi kullanılarak gerçekleştirilir (Joblin 1981). Rulo tüp yaklaşımı, izolasyon işlemi sırasında saf fungus kültürleri elde etmek için daha da uygundur. Fungal biyokütle / büyümeyi belirlemek için dolaylı bir yol, bir

basınç dönüştürücü kullanarak izlenebilen ve daha sonra biyokütle miktarıyla ilişkilendirilebilen gaz üretimi ile ilgilidir (Theodorou ve ark., 1995).

Kültürden bağımsız, moleküler teknikler ve DNA'ya dayalı yaklaşımlar son 20 yılda mikrobiyal ekolojiyi geliştirmiş ve Neocallimastigomycota'nın monofizini teyit etmesine yardım etmiştir. Sadece Anaerobik fungus belirleme ve topluluk analizine değil, aynı zamanda qPZR aracılığıyla nicelleştirmeye izin veren en sık kullanılan hedef genler küçük ribozomal altbirim (18S rRNA geni) ve dahili spacer (ITS) bölgesidir (McSweeney ve Denman 2006, Koetschan ve ark., 2014). Yakın tarihli bir araştırma, çevresel örneklerdeki fungus çeşitliliğinin daha doğru bir gösterimi için üç DNA bölgesini (18S, 28S ve ITS) birleştirmeyi önermiştir (Tan ve Cao, 2014) ve seçilen her DNA bölgesinin farklı bir sonuca neden olduğunu belirtilmiştir. Anaerobik fungusların qPZR vasıtasıyla miktar belirtmesi fungus bolluğuna iyi bir fikir verdiğini ancak Neocallimastigomycota üyeleri içindeki DNA / biyokütle içeriğinin değişken oranlarından dolayı ve her kültürün spesifik büyüme evresine bağlı olarak kültüre bağımlı numaralandırma sonuçları (TFU) veya gerçek biyokütle ile ilişkilendirilmesi zor olduğu bildirilmiştir.

Varel ve Dehority (1989) *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un sığır rumeninde toplam selülozik bakterilerdeki oranlarının sırasıyla % 33.0, % 2.6 ve % 46.0 olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak, bu üç türün selülozu sindirme kabiliyeti, diğer selülozik ruminal türe ait olanlardan çok daha yüksektir. Bu nedenle, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*, rumende selüloolitik bakteri türlerinin temsilcisi olarak kabul edilmiştir.

Bakteriler ve funguslar toplam NDF (nötral detergent fiber) sindirilme aktivitesinin oranı açısından oldukça aktif bitki lifi sindirici enzimler üretirken, protozoaların bitki lifi sindirime katkısının, daha az önemli olduğu tahmin edilmektedir (Dijkstra ve Tamminga, 1995). Rumen fungusları, bitki hücre duvarına nüfuz etme ve lignini çözünür hale getirme konusunda daha üstün özelliklere sahip olmalarına rağmen, küçük biyokütlesi nedeniyle lif sindirime katkısı düşük olabilmektedir (toplam mikrobiyal biyokütlenin %8'i, Orpin ve Joblin, 1997). Rumen bakterileri, çok daha büyük biyokütle ve yüksek aktivite nedeniyle, bitki lifinin sindiriminde özellikle önemli bir rol oynamaktadır.

Theorodou (1990), En muhtemel numara (MPN) tekniğine dayanan bir son nokta seyreltme prosedürünü, anaerobik chytridiomycetes'leri tallus oluşturan birimler olarak numaralandırmak için geliştirmiştir. Yöntem zoosporlar ve Thallus arasında ayırım yapmaz, ancak bitki hücresi duvarlarını sindirebilme yetenekleri bakımından fungal popülasyonların sayımına izin vermektedir. Toplu kültür, rumen içeriği ve dışkılarıdaki fibrolitik popülasyonlar, sayılan örneklerin kuru madde içeriğini canlı sayımlarla ilişkilendirilerek karşılaştırmıştır (her kuru madde gramı için tallus oluşturan birimler).. Sayım işlemi, taze ve havayla kurutulmuş dışkılarda önemli miktarda fibrolitik anaerobik fungus popülasyonu ortaya çıkarmıştır. Taze dışkılarıdaki popülasyon rumen içeriği ile eşdeğer bulunmuş ancak kuru dışkılarda popülasyon zamanla katlanarak azalmıştır. Minimum değerler kurutmadan 90 gün sonra kuru dışkılarından elde edilmiş ve anaerobik funguslar daha sonra 210 gün boyunca saptanabilmiştir.

Obispo ve Dehority (1992), En muhtemel sayı (MPN) yöntemini, bakteri gelişimini inhibe etmek için ortama penisilin ve streptomisin antibiyotiklerini ekleyerek rumen funguslarının sayımı için uyarlamışlardır. Rumen fungus konsantrasyonlarında her gram rumen içeriği başına 1.5×10^3 ila 1.5×10^6 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu konsantrasyonlar, daha önce bildirilen aralıklardan önemli derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Beslenme sıklığının, sığırlarda rumen fungus konsantrasyonu üzerinde çok az veya hiç etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir.

Briesacher ve ark. (1992) Rumende prokaryotik popülasyonun beslenme etkilerini incelemek, rumenden izole etmek ve miktar belirlemek için DNA problemleri kullanmışlardır. Çalışmalarında Üç ruminal fistüllü inek ot-saman ile beslenmiş ve beslemeden 0, 3 ve 9 saat sonra nominal digesta toplanmıştır. Nominal digesta örnekleri digestanın orta kısmından alınmıştır. Dondurma (-65°C) ve numunelerin karıştırılması işlemleri nominal digestadan 16S rRNA verimini artmıştır ($P < .07$). Prokaryotik rRNA'nın ekstraksiyonu; sodyum asetat ile tamponlanmış fenol kullanıldığında ($P < .04$), hidroksetil-amino metan ile tamponlandıklarından daha fazladır. Sıvı fazının prokaryotik 16S rRNA konsantrasyonu, saman verildikten sonra 0, 3 ve 9. saatlerde benzerdi ($P > .10$). Altlık fazın prokaryotik 16S rRNA konsantrasyonu beslemeden sonraki 9 saate kadar yükselmiştir. *Fibrobacter succinogenes* oranı her iki sindirim aşamasında daima ölçülmüştür. Bu verilerden yola çıkarak, rumende bakteri

popülasyonu kaymalarını izlemek için DNA problemlerinin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Raskin (1994b), Filogenetik olarak tanımlanan metanojenler grubundan korunan 16S rRNA bölgelerini tamamlayıcı sekiz oligonükleotid, çevresel ve belirleyici mikrobiyoloji çalışmalarında hibridizasyon problemleri olarak kullanım için dizayn ve karakterize edilmiştir. Sekiz prob saf kültürde temsil edilen metanojenleri sınırlamıştır (Methanothermaceae ailesinin üyeleri hariç). Üç prob takım spesifiktir; İkiisi Methanobacterial takımında üyeleri tanımlarken, biri Methanococcales takımına özgüdür. Dördüncü prob, mevcut sınıflandırma içindeki üçüncü takım olan Methanomicrobiales takımına ait üç aileyi kapsamaktadır. Beşinci prob bu takımda kalan aileye özgüdür (Methanosarcinaceae). Üç ilave prob, Methanosarcinaceae içinde farklı cinsleri kapsamakta olduğu belirlenmiştir.

Dehority ve Orpin (1997) Genç ruminantlarda mikroorganizmaların oluşurulması öncelikle yetişkin bir hayvana maruz kalışına ve mikroorganizmaların büyümesi ile uyumlu bir rumen ortamına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Rumen mikrobiyal popülasyonunun büyük kısmı, bu organdaki fermantatif aktivitenin çoğunu oluşturan katı anaerobik bakteri ve siliat protozoasından oluşmaktadır. Mikrobiyal sayılar ve popülasyonun kompozisyonu bir dizi faktörden etkilenmektedir, beslenme de en önemlilerinden biridir. Faktöryel olarak anaerobik bakterilerin, aerobik bakterilerin, flagellat protozoalar ve mikoplazmalar daha az sayıda da mevcuttur; Bununla birlikte, genel fermantasyona yaptıkları katkılar minimal kabul edilmiştir.

Özköse (2001) Anaerobik rumen funguslarının yeni bir türü olan *Cyllamyces aberensis*'i küresel rizoidleri, tek kamçılı zoospor, birden fazla spor kesesi ve polisentrik yaşam döngüsü sınırlı polifentrik talus gelişimi ile tanımlanmaktadır. fungus taze sığır dışkılarından izole edilmiştir. ITS bölgesinin sekansı ve PZR-RFLP yöntemleri ile de *Cyllamyces*'in yeni bir cins olduğu ortaya çıkmıştır.

Mcsweeney (2001) *Calliandra calothyrsus* (calliandra) 'da yoğunlaşmış tanenlerin rumen mikrobiyal fonksiyonuna etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Mikrobiyal popülasyonlar, ruminal protein sentezi ve fermantasyon son ürünleri, tanen etkisine karşı koymak için koyunlarda polietilen glikol (PEG) içeren veya içermeyen calliandra (% 30) ile desteklenmiş kaba yemle besleme ile ölçülmüştür.

Fibrobacter succinogenes ve *Ruminococcus spp.* Popülasyonları da dahil olmak üzere selülitik bakterilerin toplam sayısı, Calliandra takviyeli koyunlarda önemli ölçüde daha düşüktür ve hayvanlara PEG ile muamele edildiğinde bu popülasyonlar artmıştır. Buna karşılık, protozoa ve fungusların ve Bacteroides Porphyromonas-Prevotella bakterilerini içeren mikrobiyal grubun daha az etkilenmiş olduğu görülmüştür. Rumende mikrobiyal protein sentezinin etkinliği önemli derecede değiştirilmemiştir. Calliandra, rumen mikrobiyal popülasyonlarında protein sentezinin etkinliğini değiştirmeden önemli değişimlere neden olmuştur. Calliandra tanenlerinin rumen sistemi üzerine besinlerle kompleksleşmesi, mikroorganizmaların direkt inhibisyonundan daha çok sonuç doğurabileceği belirtilmiştir.

Tajima ve ark. (2001) bazı rumen bakterilerinin spesifik olarak belirlenmesi ve kuantifikasyonu için bir dizi PZR primeri tasarlamış ve doğrulanmıştır. Bu primerler ve Real-Time PZR tekniği kullanılarak, inek rumeninde yerini alan türler, beslenmenin samandan taneye çevrilmesine kadar kantitatif olarak izlenmiştir. İki fibrolitik bakteri, *F. succinogenes* ve *R. flavefaciens*'in dinamiği daha önceki kültür temelli deneylerinki ile uyumlu olarak bulunmuştur. Saman diyetinde hayvanlarda baskın olan *F. succinogenes* DNA miktarı, tahıl diyetine geçişin üçüncü gününde 20 kat azalmış ve 28. günde DNA'da 57 kat azalma ile daha da gerilemiştir. *R. flavefaciens* DNA konsantrasyonu 3. günde, saman diyetindeki hayvanlarda başlangıç değerinin yaklaşık % 10'una gerilemiş ve 28. günde bu seviyede kalmıştır. Geçiş dönemi boyunca (3 gün) iki rumen prevotella DNA'sının miktarı önemli derecede artmıştır: *P. ruminicola*'nın miktarı 7 kat artmış ve *P. bryantii*'nin miktarı 263 kat artmıştır. 28. gün, *P. bryantii* DNA'sı, ilk saman diyetinde hayvanlarda bulunan seviyeye kıyasla hala 10 kat artmış iken, *P. ruminicola* DNA miktarı 3 kat azalmıştır. Başka bir ksilanolitik bakteri için spesifik olan *E. ruminantium* DNA sı, diyet değişimi sırasında 14 kat düşmüş ve 28. günde bu seviyede tutulmuştur. Bir rumen spiroketi olan *T. Bryantii* konsantrasyonu daha az azalmış ve 28. güne kadar kadar yedi kat gerileme ile stabilize edilmiştir. *A. lipolytica* DNA'sının varyasyonları istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemiştir. *S. dextrinosolvens* DNA'sı 3. günde başlangıçtaki hafif bir artıştan sonra, deneyin sonunda tespit edilmemiştir. *S. bovis* DNA, 3. günde geçiş döneminde 67 kat artış göstermiştir; bununla birlikte 28. günde, saman rasyonundaki hayvanlardaki seviyeyle karşılaştırıldığında aslında gerilemiştir. *S. ruminantium*-*M. multiacida* DNA miktarları

diyet değişimini takiben sekiz kat artmış, ancak 28. günde sadece iki kat artışla stabilize olmuştur. Real-time PZR tekniği aynı zamanda rumen bakteri kalıplarının, evrensel bakteriyel primer setleriyle diferansiyel amplifikasyonunu ortaya çıkarmıştır. Bu gözlemin, PZR ile üretilen 16S ribozomal DNA kütüphanelerinde bazı baskın rumen bakterilerinin neden tespit edilmediğini açıklayabileceğini belirtmişlerdir.

Ouwerkerk D, Klieve AV ve Forster RJ (2002) *Megasphaera elsdenii* 'nın in vivo sayımını sağlamak için gerçek zamanlı bir Taq nükleaz deneyi (TNA) geliştirmeyi amaçlamışlardır. *Megasphaera elsdenii* YE34, türlerin fenotipik olarak karakteristik özelliklerini taşır ve daha önce tarif edilen izolatların % 98'lik 16S rDNA sekansı benzerliği göstermiştir. *Megasphaera elsdenii*, meralarda beslenen bir sığırın rumen içeriğinde bulunmamıştır ancak probiyotik bakterinin rumene girmesinden 2 ve 50 saat sonra kolaylıkla tespit edilmiştir. Real-time TNA ile, *M. elsdenii* popülasyonunu rumen içeriklerinde saymaya duyarlı ve spesifik bir yöntem sağlanmıştır.

Koike ve ark. (2003b), Temsilci rumen bakterilerinin lif bağlanma kinetiğini araştırmıştır ve samana bağlı *Fibrobacter succinogen*'lerin, *ruminococ*'lara kıyasla en hızlı ve en kapsamlı biçimde ortaya çıktıklarını ve kök inkübasyondan 24 saat sonra maksimum biyokütleyi gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır. *Ruminococcus flavefaciens* ikinci en yüksek biyokütleyi gösterirken, *Ruminococcus albus* oldukça küçük bir biyoküttele kendini göstermiştir ve bu üç temsilci türün lif sindirimine katkılarının arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sylvester JT (2004) Ruminal sıvı ve duodenal digesta'daki protozoa biyokütle miktarını ölçmek için 18S rDNA kodlayan geni hedef alan Real-Time PZR analizinin geliştirildiği bildirmiştir. Protozoal hücreler, rumen sıvısından toplanmış ve rumen ve duodenumdan alınan örneklerde rDNA'nın geri kazanımının değerlendirilmesi için konsantre edilmiştir. Konsantre edilmiş hücrelerden alınan DNA, arıtmadan önce ve sonra hemen hemen % 100 verimle ekstre edilmiştir. Protozoal hücrelerin, miktar tayini tüm aralığında duodenal seri olarak yayılmasından sonra, geri kazanımın oldukça doğrusal ve % 81'de sabit olduğu belirtilmiştir.

Youngseob Yu ve ark. (2005) TaqMan sistemi ile eş-zamanlı PZR kullanarak metanojenlerin tespiti için primer ve prob setleri tasarlamak için bir çalışma yürütölmüştür. Altı gruba özgü metanojenik primer ve prob setleri tasarlanmıştır. Bu

setler, Methanosarcinales sınıfının iki ailesi (Methanosarcinaceae and Methanosaetaceae) ile birlikte dört ayrı sınıfı (Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales ve Methano sarcinales) ayrı olarak tespit etmiştir. Ayrıca prokaryotların 16S rDNA'sını ve Bakteri ve Arkea alanını belirleyen TaqMan gerçek zamanlı PZR sistemi ile tam uyumlu olan evrensel primer ve prob setlerini de tasarlamışlardır. Her bir primerin ve prob setinin hedef grup spesifikliği, 28 arkeal kültürden izole edilen DNA'nın test edilmesiyle ve olası yanlış sonuçları analiz edilerek deneysel olarak doğrulamışlardır. Genel olarak, her bir primer ve prob seti hedef gruba çok özeldir. Bu çalışmada tasarlanan primer ve prob setleri, anaerobik biyolojik süreçlerde ve çeşitli ortamlarda metanojenik grupların sınıf düzeyini (Methanosarcinales durumunda aile seviyesi) tespit etmek ve ölçmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yu, Lee Hwang (2005) Dört farklı anaerobik süreçte metanojenik topluluk yapılarını; 16S rRNA genini hedefleyen gruba spesifik primer ve prob setleri ile kantitatif bir gerçek zamanlı PZR kullanılarak karakterize etmişlerdir (rDNA). Gruba spesifik primer ve prob setleri geliştirilmiş ve *Methanosarcinales* ve *Methanosarcinaceae* ve *Methanosaetaceae* ailelerinin saptamasında kullanmışlardır. Arkea ve bakteri alanlarını hedef alan iki ayrı takım da kullanmışlardır. Farklı anaerobik işlemlerdeki her mikrobiyal popülasyonu belirlemişlerdir ve sistemdeki göreceli bolluğu birbiriyle karşılaştırmışlardır. Basamaklı metanojenik popülasyonlar ve süreçlerdeki topluluk yapıları, hidrolik tutulma süresi ve asetat konsantrasyonu ile değiştirmişlerdir. Bu, primer ve prob setleri ile gerçek zamanlı PZR yönteminin, anaerobik süreçlerdeki topluluk yapılarını analiz etmek için umut verici bir araç olduğunu göstermişlerdir.

Tuckwell DS, (2005) Karmaşık çevresel örneklerde mikrobiyal topluluk üyelerinin tanımlanması zaman alıcı ve tekrarlayıcılığını belirtmiştir. Çalışmalarında ribozomal diziler ve gizli Markov modelleri fungusların muhtemel cinslerini hızlı bir şekilde belirlemek için yeni bir yöntem olarak kullanılmıştır. Çeşitli tipteki suşlar dahil olmak üzere bir dizi aksenik, anaerobik bağırsak fungal kültüründen alınan ITS1 ve ITS2 parçaları izole edilmiş ve bu diziler için öngörülen RNA ikincil yapıları bir parmak izi programı oluşturmak için kullanılmıştır. Metodoloji daha sonra test edilmiş ve algoritmalar, çevresel olarak türetilmiş dizilerin bir koleksiyonunu kullanarak

geliştirilmiştir. Metodoloji, rumen ekosistemi ile ilgili araştırmalara yardımcı olmak için geliştirilmiş olmakla birlikte, diğer mikrobik ekosistemlerde çeşitlilik ve popülasyon dinamikleri üzerinde çalışılabilmesi için genel bir uygulama potansiyeline sahiptir.

Denman ve McSweeney (2006) toplam rumen funguslarını ve selülitik bakteriler *Ruminococcus flavefaciens* ve *Fibrobacter succinogenes*'i hedeflemek için PZR primerleri kullanılan bir gerçek zamanlı PZR SYBR Green testi tarif edilmiştir. Hem polisentrik hem de monosentrik fungus izolatlarının fungus biyokütlesine göre DNA ve ham protein içeriği, standart eğri oluşumuna yardımcı olmak için fungus gelişme aşamaları boyunca araştırılmıştır. Kullanılan primer setlerinde, çapraz reaktivite saptanamayan hedeflerin spesifik olduğu bulunmuştur. Ardından, gerçek zamanlı PZR testi, bu popülasyonları sığır rumininde algılamak için bir çalışmada kullanılmıştır. Anaerobik fungus hedefinin, beslemeden 0 ila 12 saat sonra 3.6 kat arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar aynı zamanda beslenmeden 0 ila 12 saat sonra *F. succinogenes* hedefinde 5.4 kat artış olduğunu göstermiştir, aksine *R. flavefaciens*'in az ya da çok tutarlı seviyelerde tutulduğu gözlenmiştir. Bu raporun, rumen anaerobik fungus popülasyonunu tahmin etmek için bir gerçek zamanlı PZR testinin ilk çalışmasıdır.

Mosoni (2007) Konsantre ve maya katkı maddesinin koyunların rumenindeki selülozik bakteri sayısına etkisini incelemişlerdir. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*, kültür teknikleri ile selülitik flora numaralamasına paralel olarak gerçek zamanlı PZR (16S rDNA'yı hedefleyen) kullanılarak miktarı belirlenmiştir. Her koşulda, *R. flavefaciens* *F. succinogenes*'den biraz daha fazla bulunmuştur; her iki tür de *R. albus*'dan daha yüksek bulunmuştur. Konsantre katkılı diyet ile beslenmeden sonra, rumen asitlenmesi ile birlikte üç türün sayısının azalmasına neden olmuş iken, beslenmeden önce diyetin samandan saman ve konsantre diyete kayması, rumen pH'sı ve üç tür sayısı üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Genel olarak canlı mayanın varlığı, Ruminokokların önemli bir artışıyla (iki dört kat daha fazla) sonuçlanmıştır.

Kok ve ark. (2013) tarafından yoğunlaştırılmış tanenlerin yüksek konsantrasyonunu içeren *Leucaena leucocephala* hybrid-Bahru (LLB) 'nin, keçiler

üzerindeki selülitik rumen fungus popülasyonuna etkisini, gerçek zamanlı PZR kullanılarak araştırmışlardır. LLB ile beslenen keçilerde fungus popülasyonu, beslenmenin ilk 10 gününde engellendiği, ancak 15 günlük beslenmeden sonra fungus popülasyonunda (157.0 µg / ml) muazzam bir artış meydana geldiği ve bu artışın kontrolden yaklaşık dört kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (kontrol Keçi:39.7 µg / ml). Bununla birlikte, bu süreden sonra fungal popülasyon sürekli olarak azalmış ve 30 günlük beslenmede fungus popülasyonu (50.6 µg / ml) ile kontrol keçilerin fungus popülasyonu (55.4 µg / ml) arasında anlamlı bir fark görülmediği belirtilmiştir.

Xue ve ark. (1992), *N. patriciarum*'a ait olan *celA*, *celB* ve *celC* genlerini *E. coli*' ye klonlamış ve ekspresyonunu incelemişlerdir. CelA mikrokristal selüloza karşı yüksek aktivite gösterirken, CelB ve CelC karboksimetilselüloza karşı aktif olduğunu belirlemişlerdir. CelA'nın meydana getirdiği son ürün sellobiyozdur. CelB ve CelC ise β-glikosidik bağları kırarak selodekstrinler meydana getirmektedir. Buna göre CelA sellobiyohidrolaz, CelB ve CelC ise endoglukanaz olarak karakterize edilmiştir. Her üç gende *N. patriciarum*'da selüloz tarafından uyarıldığını belirtmişlerdir.

Borneman ve ark. (1992), lignoselüloz sindiriminde hemiselülozdan ligninin ayrılmasında anaerobik funguslar tarafından önemli oranda üretilen esterazın kullanıldığını bildirmişlerdir.

Tsai ve Calza (1993), *N. frontalis*'in protein ve selülaz enzimini salgılamasını optimize etmek için besi ortamında çeşitli değişiklikler yapmışlardır. Karbon kaynağı olarak pamuk selülozu içeren ve yüksek miktarda zoospor (2000/ml) bulunan besi ortamında salgılama artmıştır. Jel elektroforezi sonucunda fungusun 11 adet selülaz enzimine sahip olduğu görülmüştür. Bu enzimlerden 2 tanesi sadece durağan fazda salgılandığını belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (1994), avisel eklenmiş besiyerinde geliştirdikleri *Orpinomyces* sp. PC-2'nin kültür ortamından β-glukosidaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı 84.4 kDa, pI değeri ise 3.95 olarak bulunmuşlardır. Ayrıca enzimin optimum aktivite pH'sı 6.2 ve sıcaklığı da 50 °C olarak belirlemişlerdir.

Dijkerman ve ark. (1996a), *Piromyces* sp. E2 suşunda bulunan selülaz enzimlerinin mikrokristalin selülaz üzerine adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Selülaz enzimlerinin adsorpsiyonunun yavaş fakat oldukça etkili olduğu bildirilmiştir.

Selülitik kompleks üzerinden aviselaz, endoglukanaz ve β -glukosidaz enzimleri avisel tarafından tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu çalışma ile rumen funguslarında bir multiprotein enzim kompleksinin varlığı açıkça desteklenmiştir.

Gerbi ve ark. (1996), *C. communis*'i Lowe besi ortamı içeren bir fermentörde geliştirmişlerdir. Fungusun erken ve son gelişim safhalarında glikozid ve polisakkarit hidrolaz aktivitelerini incelemişlerdir. Gelişim aşamalarına bağlı olarak üç enzimin hücresel aktivitesinde farklılık bulmuşlardır. Endoselülaz ve β -D-fukosidaz erken safhalarda sentezlenirken gelişimin ileriki safhalarında aktivite düşmüştür. β -D-glukosidaz, β -D-ksilosidaz ve ksilanaz aktiviteleri zamanla artmıştır. Tallusa bağlı aviselaz ve KMSaz aktiviteleri artmış, bu enzimlerin ekstrasellüler aktiviteleri azalmıştır.

Ho ve ark. (1996), *N. variabilis*, *P. spiralis*, *P. minutus* ve *C. communis* izolatlarının buğday ve filtre kağıdı (FP) içeren besi ortamlarında fermentasyon aktivitelerini incelemişlerdir. *N. variabilis*, *P. spiralis* ve *P. minutus* her iki ortamda da KMSaz, FPaz ve ksilanaz üretmiş *C. communis* sadece ksilanaz üretmiştir. Bütün enzimler 72 saatte en üst düzeyde üretilmişlerdir. Bu çalışmada rumen funguslarının laktat üretmedikleri ilk defa bildirilmiştir.

Lee ve ark. (2000), rumen sıvısında bulunan mikrobiyal grupların bitki hücre duvarının parçalanmasındaki rollerini araştırmıştır. Buna göre hücre duvarları funguslar tarafından en etkili bir şekilde parçalanırken daha sonra sırasıyla bakteri ve protozoalar gelmektedir. Genellikle karışık kültürlerde selülitik aktivite monokültürlere göre daha düşük olmuştur. Protozoa içeren kokültürlerde selülitik aktivite inhibe olurken fungus ve bakteri kokültürlerinde sinerjistik bir ilişki görülmüştür.

Ye ve ark. (2001), *Orpinomyces jayonii*'den elde edilen CelB2 genini *E.coli*'ye klonlamışlar ve bu enzimin β -glukanaz, likenaz, KSMaz ve ksilenaz aktivitesinin yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca optimum pH'sını 5.5, sıcaklığının 40 °C olarak belirlemişlerdir.

Rezaeian ve ark. (2005), rumen funguslarını sodyum hidroksit ile muamele edilmiş ve edilmemiş saman ile kültüre alarak fibrolitik enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Bu kültürlerde rumen fungusları oldukça yoğun bir rizoidal sistem oluşturmuşlardır. İnkübasyondan sonra sodyum hidroksit ile muamele edilmiş samandaki kuru madde kaybı

% 38 iken sodyum hidroksit ile muamele edilmemiş samandaki kuru madde kaybı % 35 olarak bulunmuştur. Muamale edilmiş kültürde fungal biyokütle daha fazla çıkarken enzim aktivitesi de biyokütle ile doğru orantılı olarak artmış ve selüloz ve hemiselüloz degradasyonu daha yüksek bulunmuştur.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Tez çalışması K.S.Ü. Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği (BİGEM) laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın kimyasalları farklı firma belirtilmedikçe Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan, moleküler biyoloji sarf malzemeleri Vivantis (Malezya), Fermentas (USA), Promega (UK), Favorgen (Taiwan) ve Thermo Scientific (Massachusetts, ABD) grubundan temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan temel alet ve ekipmanlar

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve temin edilen firmalar

Cihaz	Firma
Konvensiyonel PZR cihazı	Favorgen FAPZR 96G
Real-Time PZR cihazı	Esco spectrum 48
İnkübatör,	Nüve EN110
Otoklav	Nüve OT 4060
Otomatik dispenser	Ismatec; MCP
Işık mikroskobu	Olympus
Spektrofotometre	Spectra Max
Elektroforez	Biolab; PS 503
NanoDrop	Thermo
Santrifüj	Nüve NF 800

3.1.3. Bakteri ve fungus suşları

Tez çalışmasında, standart olarak kullanılan tanımlanmış bakteri ve funguslar BİGEM Laboratuvarı Anaerobik Kültür Koleksiyonundan temin edilmiş ve çizelgede (3.2) belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan standartlar ve alındığı yerler

Bakteri	Kaynak
<i>Escherichia coli</i>	BİGEM
<i>Ruminococcus albus</i>	BİGEM
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	BİGEM
Fungus	
<i>Neocallimastix sp.</i> (GMLF 3)	BİGEM
<i>Orpinomyces sp.</i> (GMLF 19)	BİGEM

Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler, kimyasallar ve miktarları

Çözelti	Kimyasal	Miktar
T.E. tamponu	Tris	10 gr
	EDTA (0.5 M)	5 gr
	dH ₂ O	1 lt
T.B.E. (10X)	Tris	108 gr
	Boric acid	55 gr
	EDTA	40 ml
	dH ₂ O	1 lt
dNTP solution	dATP (100mM)	10µl
	dCTP (100mM)	10µl
	dGTP (100mM)	10µl
	dTTP (100mM)	10µl
	ddH ₂ O	400µl
0.5 M EDTA		
PBS buffer	NaCl	150 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	Toplam hacim dH ₂ O ile 100 ml e tamamlanır	

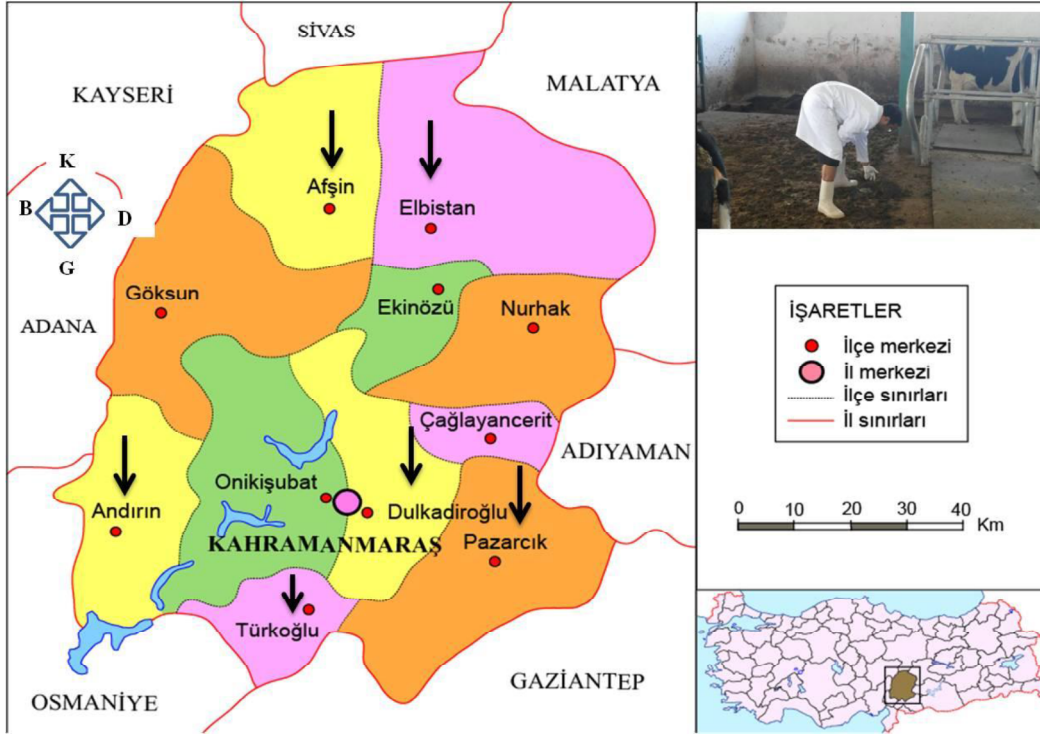
Kloroform/ İsoamil alkol		24:1 (v/v)
Polyformaldehyde		%4 (v/v)
CTAB	Tris-HCl	100 mm
	NaCl	2 M
	EDTA	20mm
	CTAB	%2
	Toplam hacim dH ₂ O ile 100 ml'e tamamlanır	
PVP (polivinilpyrrolidone)		%1
β- merkoptoetanol		%28
DNS (dinitrosalisilikasit)	NaOH	1.6 gr
	Sodyum pot. Tart.	30 gr
	DNS	1 gr
	ddH ₂ O	60 ml
Potasyum fosfat		50 Mm
	dH ₂ O	1 lt
Mineral solusyon 1	K ₂ HPO ₄	3 gr
	ddH ₂ O	1 lt
Mineral solusyon 2	KH ₂ PO ₄	3 gr
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6 gr
	MgSo ₄ 7H ₂ O	0.6 gr
	CaCl ₂	0.6 gr
	NaCl	6 gr
	dH ₂ O	1 lt

3.2. Metot

3.2.1. Dışkı örnekleri toplanması

Dışkı örnekleri Kahramanmaraş ve çevre ilçelerden (Şekil 3.1) merada olan hayvanlar dikkate alınarak toplanmıştır (Çizelge 3.4). Çevre ilçelerin seçilmesindeki en önemli faktör, bu bölgenin Akdeniz geçiş iklim bölgesinde oluşu ve iklimin bitki örtüsü üzerine etkileri hayvanların beslenme şekillerini etkilemekte ve böylelikle rumen mikrobiyal popülasyonunda değişimlere neden olmaktadır. Şekil (3.1) üzerinde de görüldüğü gibi örnekler Elbistan, Afşin, Andırın, Türkoğlu, Pazarcık ve Dulkadiroğlu ilçelerinden toplanmıştır. Afşin ve Elbistan ilçelerinde genellikle karasal iklim hakim

iken Türkoğlu, Andırın, Pazarcık ve Dulkadiroğlu ilçelerinde Akdeniz iklimi hakimdir (Şekil 3.1).



Şekil.3.1. Örneklerin toplandığı ilçeleri gösteren Kahramanmaraş haritası (örneklerin toplandığı ilçeler ↓ olarak işaretlenmiştir).

Çeşitli ruminant (inek, koyun, keçi) hayvanlardan toplanan taze dışkı örnekleri öncelikle kese kağıtları içerisinde muamele edilmiştir. Kayıtları alınarak naylon torbalar içerisinde mümkün olan en kısa sürede laboratuvara getirilip bir kısmı hemen fungus izolasyonuna tabi tutulmuş ve geri kalan kısmı DNA izolasyonu için -20°C de saklanmıştır. Örnek toplamada mümkün olduğunca taze dışkının alınmasına özen gösterilmiştir. Örneklerin laboratuara getirilmesi ve analiz için geçen süre bölgenin uzaklığına göre 2-5 saatlik bir zaman almıştır. Toplanan dışkı örnekleri farklı kodlar verilerek numaralandırılmış ve diğer çalışmalar için -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. Toplanan dışkı örneklerine ait bilgiler.

İlçe	Hayvan türü	Hayvan sayısı	Koordinat E(enlem) B(boylam)
Andırın	Sığır	3	E:37,6447-B:36,3773
	Koyun	3	E:37,6311-B:36,3503
	Keçi	3	E:37,5734-B:36,5113
Elbistan	Sığır	3	E:38,1773-B:37,0683
	Koyun	3	E:38,1575-B:37,0574
	Keçi	3	E:38,1368-B:37,1171
Afşin	Sığır	3	E:38,1692-B:36,9787
	Koyun	3	E:38,2023-B:36,9634
	Keçi	3	E:38,2339-B:36,9435
Türkoğlu	Sığır	3	E:37,4226-B:36,8701
	Koyun	3	E:37,4142-B:36,8741
	Keçi	3	E:37,4065-B:36,8563
Pazarcık	Sığır	2	E:37,4592-B:37,2579
	Koyun	2	E:37,4592-B:37,2579
	Keçi	2	E:37,4592-B:37,2579
Dulkadiroğlu	Sığır	2	E:37,6060-B:37,0220
	Koyun	2	E:37,5807-B:36,9935
	Keçi	2	E:37,6039-B:37,0035

3.2.2. Funguslar için anaerobik besi ortamının hazırlanması ve kullanılan antibiyotikler

Bu çalışmada kullanılan bazal anaerobik fungus besi ortamı Orpin (1976) metodu esas alınarak hazırlanmıştır. Anaerobik fungusların yetiştirildiği bazal besi ortamının kimyasal içeriği Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Anaerobik fungal ve bakteriyel kültürler için kullanılan sıvı ve katı besi ortamlarının kompozisyonu

Kimyasal	Birimi	Sıvı Besi Ortamı (1000 ml)	Katı Besi Ortamı (1000 ml)
Mineral Solusyon 1	ml	150	150
Mineral Solusyon 2	ml	150	150
Rumen Sıvısı	ml	150	150
NaHCO ₃	gr	6	6
Maya Özütü	gr	2.5	2.5
Pepton	gr	10	10
Resazurin (% 0,1)	ml	1	1
Sistein HCl	gr	1	1
Enerji Kaynağı	gr	5	5
Agar	gr	-	15
Saf su	ml	550	550

Besi ortamının bütün bileşenleri (Sistein-HCl hariç) bir erlen içerisinde saf su ile kaynatılarak çözülmüştür. Besi yeri kaynamaya başlayınca Sistein-HCl ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edilirken, ortama CO₂ gazı verilerek çözülmüş oksijenin uzaklaşması sağlanmıştır. Besi ortamı içerisinde bulunan O₂ indikatörü resazurin etkisi ile oluşan pembe mavi-mor renk kaybolup, besi ortamının rengi solgun sarıya döndüğünde, besi ortamı ihtiyaca göre Hungate tüplerine veya serum şişelerine dispenser (Isimatec; MCP) yardımı ile dağıtılmıştır (Şekil 3.2). Tüplere besi ortamı dökülmeden önce tüpler CO₂ ile doldurulmuştur. Besi ortamı koyulduktan sonra kapakları kapatılmış ve hemen otoklav ile sterilize edilmiştir.



Şekil 3.2. Anaerobik rumen besi ortamı hazırlanması için kullanılan düzeneğin genel görüntüsü

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan anaerobik besi yeri son konsantrasyonda enerji kaynağı 5 mg/ml olacak şekilde (örn. artutan, farmaton, kızılçam artutan veya buğday samanı) hazırlanan besiyeri Hungate tüplerine (16 x 125 mm, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ. U.S.A.) dağıtılarak hazırlanmıştır. Buğday (*Triticum aestivum*) samanı değirmende (Ika; MF10) parçalanmış ve 2 mm'lik elekten geçirilerek ayrıştırılmıştır. Suda çözünmeyen substratlar (örn: saman, artutan vs.) içeren besi ortamı kullanıldığı için 121 °C'de 15 dk. otoklav edilmiştir (Orpin, 1976).

3.2.3. Rumen bakterilerinin gelişme ortamı hazırlanması

Çizelge 3.5'te gösterilen anaerobik besi ortamına enerji kaynağı olarak %0.3 glikoz, %0.2 selüloz içeren besi yeri hazırlanarak 110°C'de 10 dakika otoklavlanmıştır. Besiyerine eklenen karbon kaynağının içeriği ve miktarı bakterinin türüne göre değiştirilmiştir. Anaerobik şartlarda saf kültür olarak kullanılan bakteri suşları BİGEM kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2.3.1. LB besi ortamının hazırlanması

Standart olarak kullanılmak üzere *E.coli* suşları için LB besiyeri hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). Çizelge 1’ de belirtilen kimyasallar 1 lt dH₂O içerisinde çözülerek, pH ayarlanmış ve 10 ml’lik deney tüplerine 5’er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Katı besiyeri için 100 ml’lik besi ortamına 1,5 gr agar eklenmiştir. Her iki besi ortamı da 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. LB besiyeri

LB besiyeri (pH: 7.5)	Kimyasallar	Miktar (g/lt)
	Pepton	10
	Sodyum klorid	10
	Maya ekstraktı	5

3.2.3.2. Anaerobik Besi Ortamında Kullanılan Antibiyotikler

Anaerobik besi ortamında oluşabilecek bakteri gelişimini engellemek amacıyla antibiyotik karışımı kullanılmıştır. Antibiyotik karışımı besi ortamına fungus inokulasyonundan hemen sonra enjekte edilmiştir. Antibiyotik mix izolasyon ve saflaştırma safhalarında kullanılmıştır. Anaerobik besi ortamında kullanılan antibiyotik karışımı içeriği, antibiyotik miktarları ve besi ortamlarındaki son konsantrasyonları Çizelge 3.7’de gösterilmiştir. Antibiyotik karışımı verilen antibiyotik miktarları %25’lik etanolde çözündürülmüş ve 0,22 µm enjektör filtresi ile steril edilmiştir.

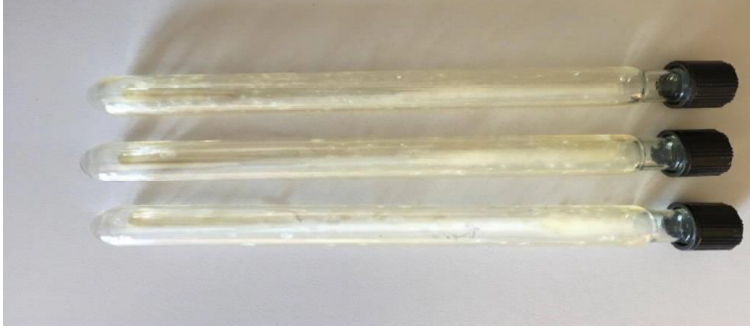
Çizelge 3.7. Anaerobik fungus ortamında bakteri gelişiminin engellenmesi için kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik	Stok solusyon içindeki miktarları (mg/ml) (100 ml için %25 etil alkol)	Son konsantrasyon (µg/ml)
Kloramfenikol	500	100
Ampisilin	500	100
Streptomisin	700	140
Eritromisin	1000	200

3.2.4. Fungus izolasyonu

3.2.4.1. Anaerobik fungusların saflaştırılması

Enzim çalışmalarında kullanılmak üzere toplanan dışkı örneklerinden fungus saflaştırılması yapılmıştır. Rumen funguslarının saflaştırma işlemleri Joblin (1981) 'in "Roll Tüp" metodolojisi kullanılarak yapılmıştır. Bu metot %0.5 (w/v) sellebiyoz ve %1.5 (w/v) agar içeren anaerobik besi ortamı kullanılarak yapılmıştır. Bu besi ortamı Hungate tüplerine 2 ml olacak şekilde koyulmuş ve 110 °C'de 15 dk steril edilmiştir. Bu besi ortamı kullanılacağı zaman 85 °C'lik su banyosunda eritilmiş ve yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğuması için bekletilmiştir. Bu besi ortamının içerisine daha önceden üretilmiş fungus kültüründen 0.5 ml enjekte edilmiş ve bekletmeden buzlu köpük içerisinde hızlıca yuvarlanarak agarlı besi ortamının tüpün iç yüzeyinde katılaşarak bir tabaka oluşturması sağlanmıştır. Saflaştırma safhalarında oluşabilecek bakteri kontaminasyonunun önüne geçmek için 0.1 ml antibiyotik mix eklenmiştir. Rolling yapılmış olan tüpler fungusların gelişmesi için 39°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır (şekil 3.3).

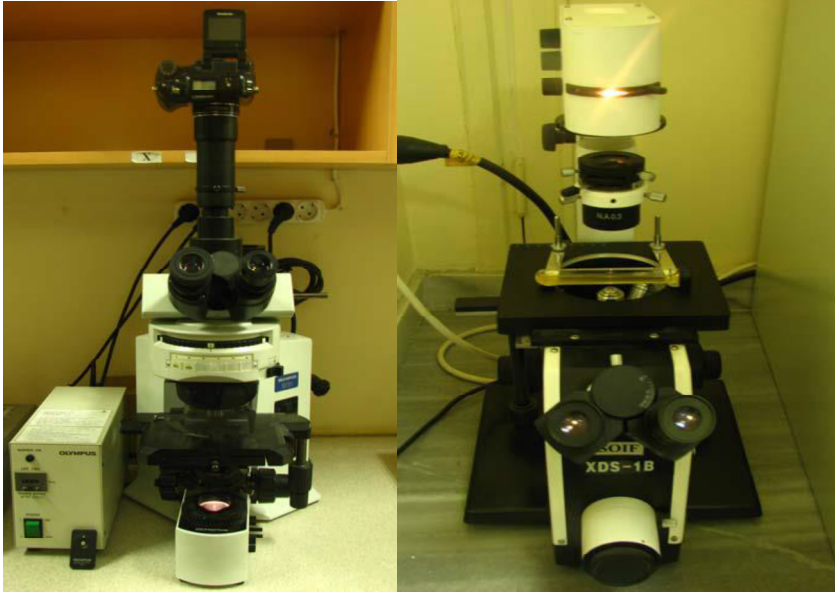


Şekil 3.3. Saflaştırma işlemi yapılan agarlı Hungate tüpü

Gelişme gösteren tüplerde mikroskopta morfolojilerine göre belirlenen koloniler sellebiyozlu besi ortamına aktarılmıştır. Saflaştırılan funguslar enzim çalışmalarında kullanılmak üzere stoklanmıştır.

3.2.4.2. Morfolojik tanımlama

Anaerobik kültürlerde bulunan rumen funguslarının varlıklarının ve gelişimlerinin gözlemlenmesi Soif XDS-1B Inverted mikroskop sistemi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Rumen fungusları ile ilgili çalışmalarda kullanılan florasan mikroskobu (A) ve inverted mikroskop (B).

3.2.4.3. Anaerobik fungusların tanımlanması

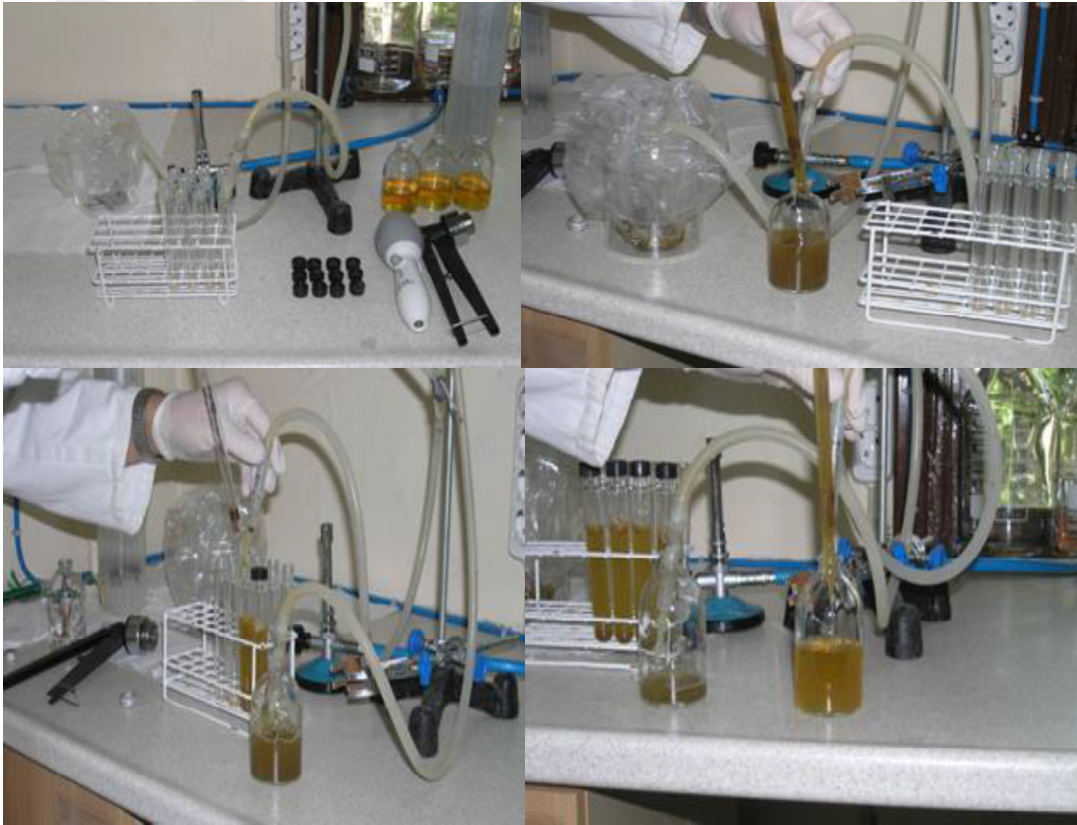
Saflaştırma işlemini takiben anaerobik funguslar ışık mikroskobu vasıtasıyla tanımlanmıştır. Bu tanımlama işlemi çizelge 3.8’de bulunan tanımlama anahtarına göre yapılmıştır. Orpin (1994) tarafından geliştirilen tanımlama anahtarına Ozkose ve ark. (2001), Callaghan ve ark (2015), Dagar ve ark. (2015) ve Hanafy ve ark. (2017) tarafından bildirilen *Cyllumyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontonomyces*, *Pecaromyces* ve *Feramyces* eklenmiştir.

Çizelge 3.8. Anaerobik fungusları cins düzeyinde tanımlama anahtarı.

1	Vejetatif safha	Monosentrik	2 numaradan devam
		Polisentrik	5 numaradan devam
2	Zoosporları >4 kamçıya sahip olanlar		<i>Neocallimastix</i>
			<i>Feromyces</i>
	Zoosporları ≤4 kamçıya sahip olanlar		3 numaradan devam
3	Vejetatif safhada küresel rizoidlere sahip olanlar		4 numaradan devam
	Vejetatif safhada filamentli rizoidlere sahip olanlar		<i>Piromyces</i>
	Kese boyunlarının spor keselerinden bir septum ile ayrılması		<i>Buwchfawromyces</i>
	Rhizodyal yapı içerisinde spor kesesi benzeri yapıların görülmesi		<i>Oontomyces</i>
4	Vejetatif safhada monosentrik büyüme		<i>Caecomyces</i>
	Vejetatif safhada polisentrik büyüme		<i>Cyllamyces</i>
5	Zoosporları tek kamçıya sahip olanlar		<i>Anaeromyces</i>
			<i>Pecaromyces</i>
	Zoosporları çok kamçıya sahip olanlar		<i>Orpinomyces</i>

3.2.4.4. Anaerobik fungusların alt kültürlere alınması

Anaerobik fungusların kültüre alınması metodunda Hungate (1969) ve Orpin (1976)'a temel alınmıştır (Şekil 3.5). İzole edilen rumen funguslarının alt kültüre alınması, fungusların laboratuvar koşullarında yaşatılabilmesi için gerekmektedir. Bunun için fungusların duyduğu ihtiyaca göre değişen enerji kaynağı içeren anaerobik besi ortamları kullanılmıştır. Bu besi ortamlarından fungal tallus ve zoosporlar istenilen besi ortamına enjekte edilmiştir. Samanlı kültürler alt kültürlere alınırken tüplere CO₂ gazı verilmiştir. Hungate tüplerinde yetişmiş olan fungal biyokütlenin diğer Hungate tüpüne aktarılması öze yardımı ile gerçekleşmiştir. Oksijen kontaminasyonu en aza indirmek için bu işlemi mümkün olan en çabuk sürede gerçekleştirmek gerekmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Rumen funguslarının izolasyonunda kullanılan düzenek (A). Dışkı örneği anaerobik besi ortamında çözüldükten sonra 10-1 dilüsyonu hazırlanmıştır (B). Dışkı örneğini içeren anaerobik besi ortamı Hungate tüplerine aktarılmıştır (C). Hungate tüplerine ilk seri aktarıldıktan sonra 10-2 ve diğer dilüsyonlar hazırlanmıştır (D). Bütün işlemler anaerobik şartlar altında yapılmıştır.

3.2.4.5. Fungus stoklarının oluşturulması

Saflaştırılma işlemi tamamlanan kültürler samanlı besiyerine ekilmiştir. Gelişen kültürlerde funguslar tutundukları saman ile birlikte alınarak, steril karyovial tüplerine CO₂ eşliğinde aktarılmıştır. Fungusların ardından Karyoviallere 1 ml %15'lik (v/v) steril gliserol eklendikten sonra ağzı kapatılarak önce -20°C'de dondurulmuş daha sonra uzun süreli stoklarının oluşturulması amacıyla sıvı azot tankına bırakılmıştır (şekil 3.6). Stokta saklanan kültürler yeniden canlandırılması için sıvı azottan çıkarılarak oda sıcaklığında eritilmiş, ardından daha önceden 39 °C'de ısıtılmış samanlı besi ortamlarına aktarılarak 39 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

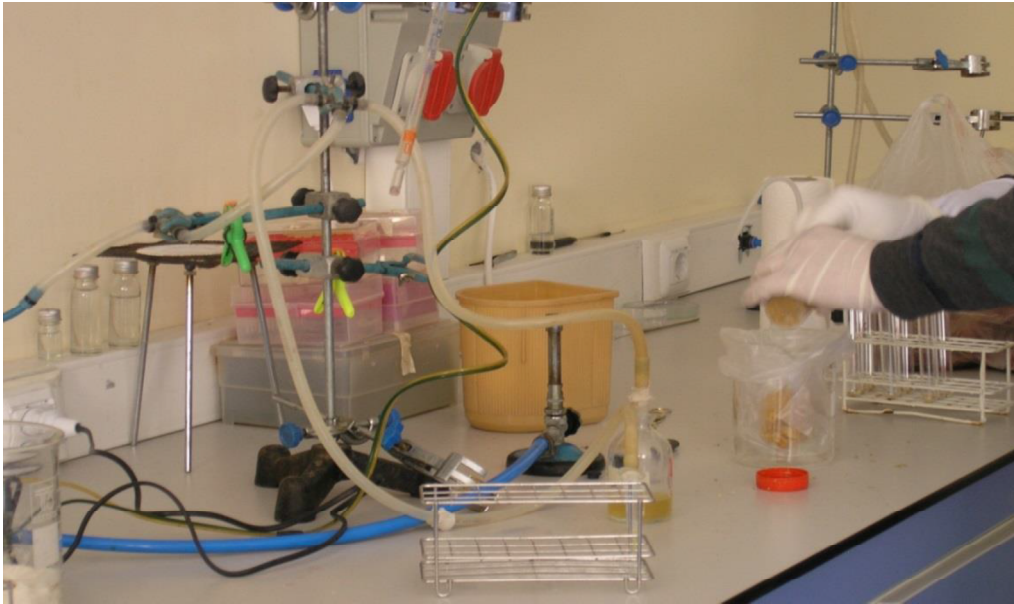


şekil 3.6. Rumen fungus kültürleri karyovialler içerisinde alüminyum kamışlara sabitlenerek sıvı azot içerisine bırakılmıştır.

Standart olarak kullanılmak üzere fungus ve bakteriler 1 ml seçici antibiyotik içeren besiyerinde bir gece geliştirilmiştir. Kültür 4500 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet, %30 gliserol içeren 100 µl sıvı besiyeri ile çözülmüş ve daha önceden steril edilmiş boncuk içeren karyotpler içerisine aktarılarak – 86 °C'de uygun kayıtlar tutularak saklanmıştır. Hazırlanan bu stoktan inokulasyon yapılacağı zaman hücrelerin çözülmesi beklenmeden boncuklar steril pens yardımı ile alınarak besi ortamlarına eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4.6. Fungal populasyonun manuel olarak belirlenmesi

Anaerobik fungus izolasyonu Sutton (2010)'un seyreltme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre yaklaşık 1.6 gr taze dışkı örneği 50 ml bazal besiyeri içerisinde, CO₂ gazı altında çözülmüş ve buradan 10 ml alınarak içinde buğday samanı olan boş Hungate tüplerine aktarılmıştır. İlk seyreltilen örnekten 10 ml alınarak yeni 40 ml besiyeri içerisinde seyreltilmiş ve buğday samanı içeren boş Hungate tüplerine aktarılmıştır (Şekil. 3). Bu şekilde 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e kadar seyreltilerek samanlı Hungate tüplerine aktarılan dışkı örneği 1-15 gün süre ile 39°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 15 gün boyunca takip edilen örnekler (+) ve (-) olarak değerlendirilerek, fungal populasyon miktarı belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.7. Fungus izolasyonu yapılan dışkı örnekleri

3.2.4.7. Rumen bakteri populasyon büyüklüğünün manuel olarak belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *E.coli*, *Fibrobacter succinogenes*, *Rumimococcus albus* referans bakteri suşları Şekil 3'te gösterilen besi ortamlarında geliştirilmiş ve referans kültürlerin DNA miktarlarıyla izole edildiği besiyeri ortamında bulunan mikroorganizma sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek için gelişmiş olan kültürlerden 1 ml alınarak DNA izolasyonları yapılmıştır. Aynı kültürden 1 ml alınarak kültürün içerdiği mikroorganizma yoğunluğu spektrofotometrede (OD₆₀₀) de belirlenmiştir. Elde edilen bu DNA konsantrasyonu standart olarak kullanılmıştır ve regresyon denklemleri bu standarta göre oluşturulmuştur.

3.2.5. DNA izolasyonu

3.2.5.1. Dışkıdan toplam dna izolasyonunu

Yeni dışkı örneklerinden gerçekleştirilen DNA izolasyonu Jun-ni Tang ve ark. (2008) uyarlanarak yapılmıştır. Bu işlem iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta dışkı örnekleri ön muamele işlemi yapılarak katı partiküller ve mikrobiyal materyalin bulunduğu kısım birbirinden ayrılmıştır. Bunun için ön hazırlık olarak dışkıdan DNA izolasyonu aşağıda belirtilen manuel protokol kullanılarak taze örnekler üzerinde yapılmıştır. Herhangi bir problem ile karşılaşıldığında ve/veya zamanlama açısından oluşacak kısıtlama durumlarında -20 °C de saklanmış olan örnekler (hayvanlardan toplanan dışkılar -20 °C saklanmıştır) kullanılmıştır.

Ön hazırlık aşaması 1.6 gr. dışkı örneği alınarak 50 ml'lik steril falkon tüplerine koyulmuş, üzerine ve 10 ml 0.05M PBS buffer eklenmiş ve 10 adet steril cam bilye koyularak 3 dk. süreyle vortekslenerek 400 g'de 3dk. santrifüj yapılmıştır. Üst kısım alınarak 3 ml soğuk PBS buffer eklenmiş ve 400 g 3 dk. süreyle santrifüj edilmiştir. Üst kısımdan alınan miktarın 3 katı %4 lük polyformaldehit eklenmiştir. Buzda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Fiksasyon sonrasında 8000 g de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılıp hücre peletine 4 ml PBS buffer ile 4 ml absolute ethanol eklenerek -20°C de 20 dk. bekletilmiştir. Bekletilen örnek 8000 g de 3 dk. santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılarak 4 ml T.E. buffer eklendikten sonra ve -20°C'de saklanmıştır.

Ön muamele işleminden sonra bu örnekten 500 ml alınır. Önceden 65 °C'de ısıtılmış 1 ml sıcak CTAB ekstraksiyon buffer eklenmiştir ve tamamı vortekslenmiştir. % 1 PVP eklenmiş ve vortexlenmiştir. Sonra her tüp %2 olacak şekilde β -mercaptoethanol eklenip vortexlenmiştir. 1-2 saat 65 °C su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve 15 dakikalık periyotlar halinde çalkalanmıştır. Vorteks işleminden sonra 16,000 g 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatantı 2.0 ml lik reaksiyon tüplerine transfer edilmiş ve 1 vol kloroform-isoamil-alkol (24:1, v/v) eklenerek 16,000 g 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant 2.0 ml reaksiyon tüpüne transfer edilmiş ve 1 vol süpernatant 1 vol kloroform eklenerek 16000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı 2.0 ml reaksiyon tüpüne transfer edilmiş ve buz soğukluğunda absolute ethanol'den 2 vol eklenmiştir. -20°C de 30 dakika beklenmiştir. Inkübasyonun ardından 16,000 g 10 dakika santrifüj edilmiştir ve pipet yardımıyla süpernatant kaldırılmıştır. % 70'lik soğuk etanolle DNA peletleri

yıkılmış ve 16000 g 10 dakika santrifüj edilmiştir. DNA pelletleri kurutulduktan sonra 50 µl steril ultra saf suda çözülmüş ve RNase ile yeniden muamele edilmiştir (20 µg/ml). 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmasının ardından -20 °C de stoğa alınmıştır.

3.2.5.2. Bakteri örneklerinden dna izolasyonu

BİGEM koleksiyonunda bulunan saf kültürlerden alınan *Ruminococcus albus* ve *Fibrobacter succinogenes* bakterileri enerji kaynağı olarak glikoz ve sellobiyoz içeren besiyerlerinde geliştirilmiş ve her petriye 100 µl alınarak dragaski çubuğu ile ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriyer karbondioksit doyurulmuş, anaerobik jar içerisinde yerleştirilmiş ve kapsülleri vasıtasıyla ortamdaki oksijen bağlanarak inkübasyona bırakılmıştır. Ekim yapılan kültürlerden aynı zamanda 1 ml alınarak spektrofotometrede (OD₆₀₀) ölçülmüştür.

3.2.5.3. Anaerobik funguslardan genomik dna izolasyonu

Anaerobik fungusların genomik DNA’sının izolasyonu için iki farklı metot kullanılmıştır. Bu metotlardan birincisi, orijinal olarak bitki DNA’sını çıkartmak için Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metoduna ve fungal DNA’yı izole etmek için bazı değişiklikler gerçekleştirilerek uygulanmıştır. Öncelikle funguslar DNA izolasyonu için enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi ortamında 2 gün süre ile geliştirilmişlerdir. Fungal hücreler 400 g’de 10 dk santrifüj (Nüve; NF800) edilmiştir. Hücreler 2 defa saf su ile yıkandıktan sonra 2 ml tüpler içerisinde sıvı azot ile dondurulmuştur. Dondurulan hücreler membran kırıcı (Retsch; MM301) kullanılarak parçalanmıştır. Bu şekilde hücre duvarları kırılan hücrelerin üzerine 700 µl CTAB izolasyon tamponu (0.1 M Tris HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 0.02 M EDTA; % 2 CTAB) eklenmiştir. Örnekler 60 dk. boyunca 65-70 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 500 µl kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir. Kısa süreli ısıtma işlemi (70 °C’de 5 dk) gerçekleştirildikten sonra 12000 g’de 10 dk santrifüj (Hettich; Micro200) edilmiştir. Üst sıvıdan 500 µl alınarak yeni bir 2 ml tüpüne aktarılmış ve üzerine 300 µl isopropanol eklenmiştir. Tekrar 12000 g’de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Örnekler 1 ml % 70 etanol ile 70 °C’de 20 dk bekletilerek yıkılmış ve tuzların uzaklaşması sağlanmıştır. DNA pelleti 12000 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir ve üst sıvı atılmıştır. Etanolün tümüyle uçması için tüplerin kapakları bir süre açık olarak

bekletilmiştir. Elde edilen DNA 50 µl TE tamponu (1 mM TrisHCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) veya dH₂O içerisinde çözülerek ileriki çalışmalar için – 20 °C’de saklanmıştır.

Fungal DNA’nın izolasyonunda kullanılan diğer bir yöntem de ticari olarak satın alınan genomik DNA izolasyon kitinin (Favorgen; Tayvan) kullanılmasıdır. Bu yöntemde de hücrelerin büyütülmesi ve sıvı azot ile parçalanması CTAB metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra Favorgen plant DNA izolasyon kiti ile genomik DNA izolasyonu üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır.

3.2.6. Moleküler biyoloji metodları

Rumen bakteri ve funguslarının miktar belirlenmesi için kullanılan moleküler yöntemler sırasıyla DNA izolasyonu prob ve primerlerin tasarlanması, PZR amplifikasyonu ve Real Time PZR uygulaması gibi işlemler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.6.1. Konvensiyonel PZR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu işlemi 32 µl dH₂O, 4 µl buffer (10X) [500 mM Tris-HCl (25°C’de pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1’er µl (20 pmol), 0,5 µl DNA polimeraz (5 u/µl) [25 Mm Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], 1 µl kalıp DNA (~400 ng/ml) ile karıştırılarak toplam 40 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonunda, 94 °C’de 4 dk ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 35 döngü olarak 94 °C de 1 dak DNA’ nın denatürasyonu, 55 °C de 30 sn primerlerin yapışması, 72°C de 1 dak uzama sıcaklığı olarak ayarlanarak yapılmıştır.

Agaroz jel için; %1 oranında agaroz, 1X Tris, Borik asit, EDTA (TBE) tampon çözeltisinde [1000 mL TBE (1X) tampon çözeltisi hazırlamak için; 5,5 g Borik asit, 10,8 g Trizma base ve EDTA (500 mM) çözeltisinden 4 mL eklenerek 1000 mL saf su ile karıştırılır] çözdürülmüştür.

DNA örneklerinden 5 ml loading buffer 1 ml olarak [10 mL DNA loading buffer için; 0,025 mg bromophenol blue, %40 süktroz ve 2,5 mL EDTA (100 mM) (pH 8,0)] yüklemeye hazırlanmıştır. DNA kontrolü için 1000 baz çiftlik PZR ürünleri için 100 baz çiftlik DNA markerleri kullanılmıştır. Elektroforez tankında, jel 130 volt ve 65 mA’da yürütülmüştür. Bu işlem sonunda agaroz jel içindeki DNA Et-Br (0,5 µg/mL) ile 10 dakika

boyanmıştır. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve daha sonra fotoğraflanmıştır.

3.2.6.2. Eş zamanlı PZR protokolü (Real-Time PZR)

Konvansiyonel PZR ile teyit edilen bakteri ve fungus DNA'ları Real Time PZR işlemi ile miktar tayini yapılmıştır. TaqMan problemleri kullanılarak uygulanan bu işlemde ileri ve geri primerlerine ilave olarak floresan özelliğe sahip olan ve spesifik bölge komplementeri olarak kullanılan problemler tasarlanmıştır. Bu problemlerin 5' ve 3' uçlarına reporter ve quencher boya vardır. Kullanılan primer ve problemler Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Real-Time PZR analizlerinde kontrol amaçlı negatif referans kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 20.5 µl, 12 µl dH₂O 3 µl buffer (10X), 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1'er µl (20 pmol), 1 µl prob, 0,5 µl DNA polimeraz (5 u/µl), 1 µl kalıp DNA ile 95°C'de 5 dakika 95°C de 30 saniye ve 55°C de 1 dakika olarak yapılmıştır.

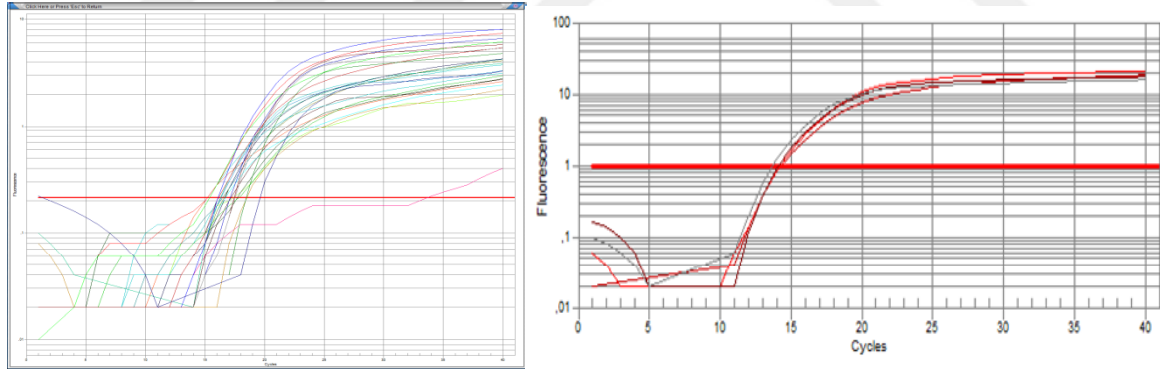
3.2.6.3. Real-Time PZR için fungus ve bakteri dna standartlarının oluşturulması

Standartlardaki DNA miktarları ilk olarak Nanodrop veya spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Konsantrasyon A₂₆₀ ile ölçmüş ve DNA moleküler ağırlığı kullanılarak kopya sayısına dönüştürülmüştür. Bakteri ve fungus örneklerinden, DNA iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. DNA miktarları UV absorbansı kullanılarak belirlenmiştir. Her preparattan DNA alınmış ve sonrasında her bir DNA stokundan bir dizi seyreltme şeklinde hazırlanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Bakteri ve Fungus Standart DNA dilüsyonları

Dilüsyon	Bakteri DNA için örnek kütlesi 1 (µg)
#1	1.0
#2	0.25
#3	0.063
#4	0.016
#5	0.0039
#6	0.00098
#7	0.00024

Standart eğri hesaplaması; Seri seyreltmelerden kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Konsantrasyonların logaritması (Taban 10) kesişme noktalarına karşı çizilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Real Time PZR standartına ait Ct görüntüleri.

3.2.6.4. Real Time PZR çalışması için primerler ve problemlerin tasarlanması

Rumen mikrobiyal popülasyonunun belirlenmesi amacıyla 2 adet fungus cinsi (*Neocallimastix* ve *Orpinomyces*) ve 2 adet rumen bakteri örneğine (*Fibrobacter succinogenes* *Ruminococcus albus*) ait ITS ve 16S bölgelerine özgün primer ve problemler kullanılmıştır. Primerler ITS ve 16S rRNA bölgesinden tasarlanmıştır. Her bir gen için

kullanılan primerler ve problemler Diagen (İstanbul) den temin edilmiştir. Primerler üretici firmaların protokollerine uygun olarak sulandırılmıştır.

Rumen funguslarında ITS bölgesi tanımlamada kullanılan bir gen bölgesidir. Bunlar alt birim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki yada tür içi (intraspesifik) populasyonlar arasındaki çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır. Kodlanmayan bölge (ITS) hızlı evrim geçirir ve bir tür içindeki suşların yada bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanılmaktadır (Tuckwell ve ark., 2005, Nicholson ve ark., 2009). 16S bölgesi Rumen bakterilerinin yanı sıra bakteri türlerinin moleküler tanımlanmasında kullanılan bir gen bölgesidir. Cins ve tür düzeyinde tanımlamada kullanılan 16S bölgesi korunumlu oluşu bu bölgeyi bakterilerde moleküler tanımlamada kullanmak için uygun hale getirmiştir (Joan E. Edwards ve ark. 2004).

Çizelge 3.10. Konvensiyonel PZR ve Real-Time PZR için tasarlanan primer ve problemler

	Tür	Gen bölgesi	Primer / Probe 5' → 3'	Uzunluk (bp)
Fungus	<i>Neocallimastix spp</i>	ITS	F TGAATCCTTCGGATTGGCTATT	107
			R ACGGAAACCTTGTTACGACTT	
			P FAM-TGGGCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGT-Q1	
	<i>Orpinomyces spp</i>	ITS	F AGTATTTATAGCCTTGTGCCTCT	87
			R AACTTAGCACAAATGTATCTAACCC	
			P HEX - TGCAGACCTCAATCTCTCCGATTGC- Q2	
Bakteri	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	16S rRNA	F CCACATTGGGACTGAGATACG	128
			R CAGTGGTTTACACACCGAAATG	
			P TEXAS RED- TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATA- Q1	
	<i>Ruminococcus albus</i>	16S rRNA	F GAGCGCAACCCTTACTGTTA	121
			R GTGTGTAGCCCAGGTCATAAG	
			P TAMRA- TCTAGCAGGACTGCCGTTGACAAA- Q2	

3.2.6.5. İstatistiksel analizler

İzole edilen ve konsantrasyonları ölçülen kromozomal DNA'ların 8 kat seyreltilmesi ile standart DNA dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu DNA standartlarının 3 tekrarlı Real Time PZR analizi gerçekleştirilmiş ve Ct değerleri elde edilmiştir. DNA standartlarının DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının kalibrasyon eğrisi oluşturmak için logaritmik değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrileri basit regresyon analizi ile ortalama Ct değerine karşı logaritmik DNA konsantrasyonu (ng/μl) kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca basit regresyon analizi ile korelasyon katsayı (r^2) değerleri ve regresyon denklemleri de ($y=ax+b$) hesaplanmıştır. Korelasyon denklemi ise dışkı numunelerinin analizinde elde edilen Ct değerlerine (y) karşılık gelen DNA konsantrasyonu belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Data analizleri Esco spectrum 48 Real-Time PZR System software ve Microsoft Excel kullanılarak yapılmıştır.

3.2.7. Enzim çalışmaları

Sığır dışkısından izole edilen ve tanımlanan rumen funguslarının tanen içeriği yüksek substratlar üzerine enzim aktivitelerini belirlemek için yapılan çalışmaları kapsayan bu çalışmanın önemli bir kısmını da enzim üretimi ve aktivite denemeleri oluşturmaktadır. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan metodoloji aşağıda verilmiştir.

3.2.7.1. Protein tayini

Protein tayini için Lowry (1951) metodu Favorgen'in hazır kiti kullanılarak yapılmıştır. Protein analizi spektrofotometrede mikropilka ile yapılmıştır. Bu nedenle favorgen protokolüne uygun olarak 10 μl örnek üzerine 200 μl Favorgen'in solusyonu ilave edilmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon karışımı spektrofotometrede 590 nm'de okunmuştur. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA)'nin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu amaçla 10, 25, 50, 75, 100, 250 mg/ml'lik BSA solusyonları hazırlanmıştır. Bu standart solusyonlar her protein tayini sırasında örnekler ile beraber okunarak kalibrasyon denklemi ortaya çıkartılmıştır.

3.2.7.2. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim ekstraktı hücre dışı veya hücreli olmak üzere iki ayrı fraksiyondan hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi belirlenecek olan kültür 4500 g'de 10 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant ile hücre birbirinden ayrılmıştır. Hücre dışı enzimler için süpernatant, hücre içi enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi için ise elde edilen pelet temiz bir tüpe alınmıştır. Pelet 1 ml saf su ile yıkandıktan sonra sıvı azot ile muamele edilerek dondurulmuştur ve hücreler membran kırıcı (Retsch; MM301) kullanılarak parçalanmıştır. Hücreli materyal 1 ml 0.05 M potasyum fosfat (pH 6.5) tamponu ile çözülmüştür. Hücre parçaları 4500 g'de 3 dk santrifüj ile çöktürülmüş ve üst sıvı temiz bir ependorfa alınarak hücre içi enzim aktivitesi için kullanılmak üzere – 20°C'de saklanmıştır.

3.2.7.3. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için Miller (1959)'e ait yöntem kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 25 µl enzim ekstraktı ve 225 µl substrattan (% 0.5 substrat, 25 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.5) oluşmaktadır. Karışım 50°C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışım üzerine 250 µl 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solusyonu (%30 sodyum potasyum tartarat, 2 N NaOH, %1 DNS) eklenmiş ve 5 dk. 100°C su banyosunda bekletilerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Kontrol grubu sırasıyla 225 µl substrat üzerine 250 µl DNS ilave edilmiş ve 25 µl enzim ekstraktından eklenerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletilmek suretiyle hazırlanmıştır. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile 1 ml'ye tamamlanarak 540 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Standart çözeltisinde karboksimetilselüloz ve likenaz için glikoz, ksilanaz için ksiloz kullanılmıştır. Bütün enzim çalışmaları n = 3 şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 1 dk içerisinde salınan 1 µmol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.7.4. Enzimlerin çalıştığı optimum pH değerlerinin belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH değerinin belirlenmesi için farklı pH'larda hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmıştır. Bu amaçla pH 3.5 – 5.0 için asetat tamponu, pH 5.5 – 7.0 için sodyum fosfat tamponu ve pH 7.5 – 9.0 için Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Bütün tamponlar 50 mM konsantrasyonundadır. Bu tampon çözeltiler kullanılarak % 0.5 substrat solusyonları hazırlanmıştır. Böylelikle pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 substrat solusyonları elde edilmiştir.

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde aynı prosedür uygulanırken substrat olarak farklı pH'larda hazırlanan substrat kullanılmıştır.

3.2.7.5. Enzimlerin çalıştığı optimum sıcaklığın belirlenmesi

Enzim aktivitesinin çalıştığı optimum sıcaklığın ortaya çıkartılması için farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. Bu amaçla enzim çalışmalarında aynı prosedür izlenirken, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklıklar değiştirilmiştir. Enzim substratı ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir.

3.2.7.6. Enzimlerin termal stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin farklı sıcaklıklarda dayanma gücünün belirlenmesi için enzim 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca enzimin bu sıcaklıklara dayanma süresinin belirlenmesi için her sıcaklıkta 5, 10, 15, 20 dk. ön inkübasyon uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda enzim buz içerisine alınmış ve substrat ilave edildikten sonra kalan enzim aktivitesini belirlemek amacıyla optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Dışkı Örneklerinin Tanımlanması ve Anaerobik Fungus İzolasyonu

Anaerobik funguslar ilk olarak geçtiğimiz yüzyılın başlarında Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından gözlemlenmiş fakat bu organizmaların kamçılı protozoa oldukları düşünülmüştür. Orpin (1974; 1975) yaptığı çalışmalar sonucunda bu organizmaların anaerobik fungus olduklarını ve rumen sıvısında geçirdikleri hareketli bir zoospor evresi ile bitki parçalarını kolonize ettikleri bir vejetatif evre olmak üzere iki temel kısımdan oluşan yaşam döngüleri olduğunu bildirmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda rumen fungusları rumen, omasum, abomasum, ince barsak, sekum ve kalın barsaktan başarı ile izole edilebilmiştir (Davies ve ark., 1993a). Theodorou ve ark. (1990)'nın anaerobik fungusları dışkıdan izole etmeleri bu fungusların yaşam döngüsünde oksijene ve farklı sıcaklıklara dayanıklı üçüncü bir aşamanın da olduğunu göstermiştir. Anaerobik fungusların rumenden rektuma geçişi sırasında oksijen ve kurumaya direnç kazandıkları düşünülmektedir (Davies ve ark., 1993a). Ayrıca rumen funguslarının dışkıda oksijen ve kurumaya dirençli yapılarını haftalarca hatta aylarca korudukları gösterilmiştir (Milne ve ark., 1989).

Herbivor hayvanların dışkı örneklerinin kolayca toplanabilmesi, taşınabilmesi ve saklanabilmesi bu organizmaların dışkıdan daha kolay izole edilebilmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılmak üzere Kahramanmaraş'ın değişik bölgelerinden farklı hayvanlara ait dışkı örnekleri kese kağıt paketlerine alınarak toplanmış, laboratuvara ulaşınca direk izolasyon çalışmasına başlanmış ve daha sonraki çalışmalar için laboratuvarında – 20 °C'de saklanmıştır. Alınan dışkıların yeni olmasına ve hangi tür hayvana ait olduğuna dikkat edilmiştir. Çalışmada 48 farklı dışkı örneği toplanarak bunlardan fungus izolasyonu yapılmıştır ve MPN (Most Probable Number: En Muhtemel Sayı) metodu uygulanmıştır. Çalışmada toplanan dışkı örneklerine ait tanımlayıcı bilgiler Çizelge 4. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Dışkı örneklerinin alındığı yerler ve fungus üremesi gösteren örnek sayısı

Lokasyon	Toplanan örnek sayısı	Fungus elde edilen örnek sayısı	İzolasyon oranı (%)
Andırın	9	7	77,77
Elbistan	9	3	33,33
Afşin	9	6	66,66
Türkoğlu	9	9	100
Pazarcık	6	5	83,33
Dulkadiroğlu	6	4	66,66

Kurumuş dışkı örneklerinde rumen fungusu daha uzun süre direnç sağlamaktadır (Milne ve ark., 1989). Dışkıdaki anaerobik fungusların populasyon büyüklüğü rumen sıvısı ile denk olduğu (104-105 tfu/g kuru dışkı maddesi) ve dışkı kurumaya başladıkça bu sayının azaldığı anlaşılmıştır (Theodorou ve ark., 1990). Dışkı örneklerinin alındığı hayvan türlerine göre canlı fungus elde edilen hayvan sayıları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Dışkı örneklerinin ait olduğu hayvanlar ve fungus üremesi

Hayvan türü	Örnek sayısı	Fungus elde edilen örnek sayısı
İnek	16	16
Koyun	16	11
Keçi	16	7
Toplam	48	32

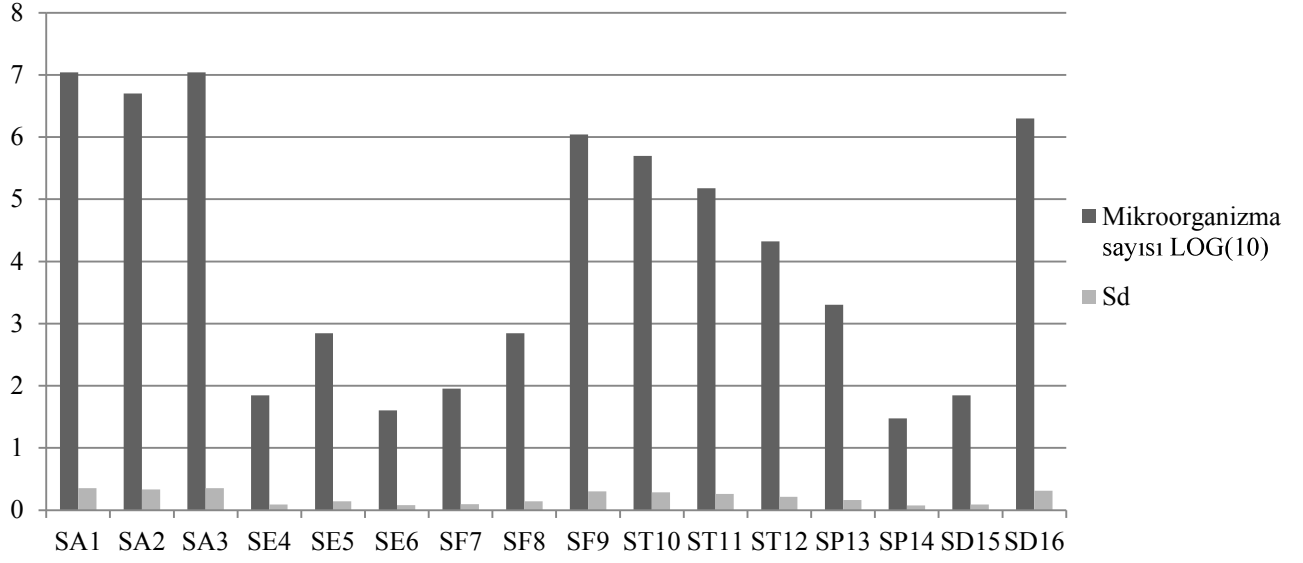
Aneorobik fungus izolasyonunda ve MPN sayımlarında bakteri kontaminasyonu karşılaşılan en önemli problem olmuştur. Bakteriler laboratuvar şartlarında rumen funguslarının gelişimini inhibe etmektedirler (Dehority ve Tirabasso, 2000). Bakteri gelişimini engellemek amacıyla antibiyotik karışım Çizelge 3.7 uygulanmıştır. Rumen funguslarının saflaştırılması çalışmalarında streptomisin ve penisilin antibiyotiği kullanılması bakteri popülasyonunu inhibe etmektedir (Akin ve Rigsby, 1987).

4.1.2. Toplanan örneklerdeki anaerobik fungus miktarının manuel sayım yöntemiyle belirlenmesi

Manuel anaerobik fungus sayım işlemi son nokta dilüsyon prosedürünü temel alan MPN metodu kullanılarak yapılmıştır. Tallus oluşturan üniteler (TFU) olarak anaerobik fungusların sayımı, koloni oluşturan üniteler (CFU) olarak bakterilerin sayılmasına benzetilmektedir. Aynı şekilde, bir CFU, bir bakteri koloni kültürü üretme yeteneği ile bir

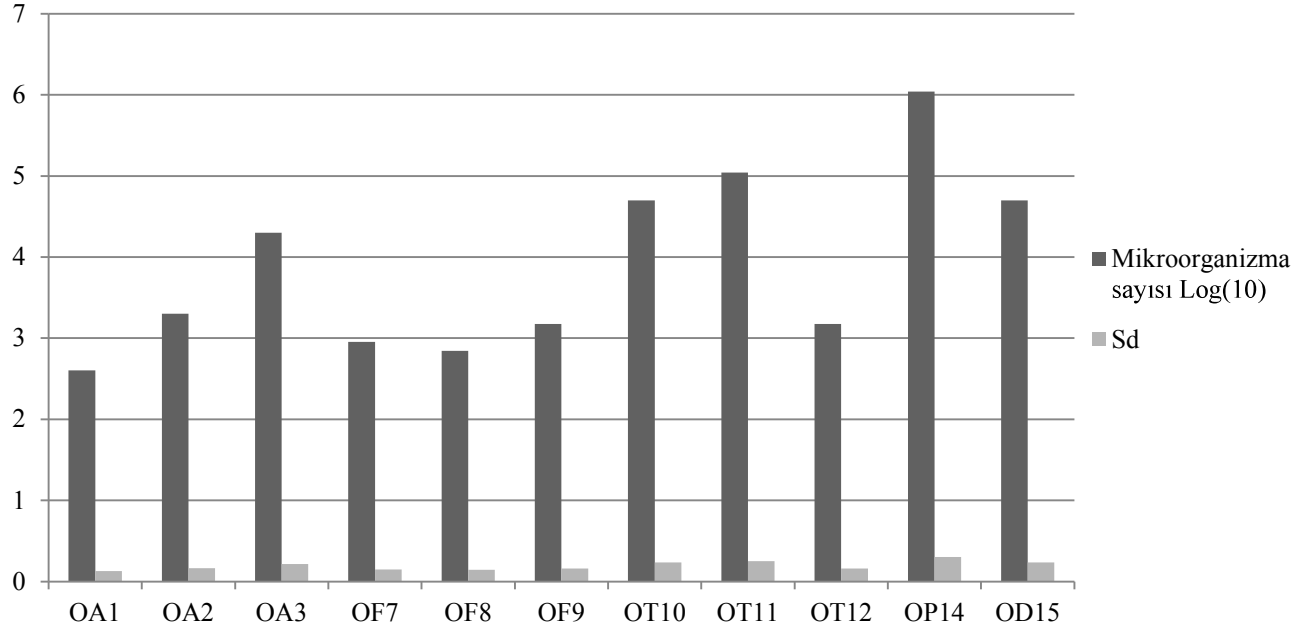
bakteri veya bakteri toplanması (zincirlerde çubuklar veya dörtgenler, kümeler veya zincirler halinde koklar) olarak tanımlanabilir, bir TFU bir zoospor veya zoosporların (bir zoosporangium içinde) kültürde bir fungus tallusu üretme yeteneği ile birlikte toplanması olarak tanımlanabilir. CFU veya TFU değerleri, bir popülasyondaki canlı hücrelerin toplam sayısına göre mutlak olmamasına rağmen, sayım, yaşayabilir hücrelerin popülasyonunun minimum boyutunu (etkili büyüklüğü) temsil etmesi bakımından pratik yarar sağlamaktadır. Bu çalışmada gerçekleştirilen sayım yöntemi, fungal yaşam döngüsünün aşamaları arasında veya her bir kolonize parçacıkla ilişkili tallus sayısı arasında ayırım yapmamaktadır. Bununla birlikte, popülasyonlar bitki hücre duvarlarını bozma yeteneklerine göre numaralandırıldıkları için, değerler fibrolitik anaerobik fungusların fonksiyonel popülasyonunu temsil etmektedir. Ayrıca, kuru madde içeriğini örneklemek için canlı sayımları ilişkilendirerek, MPN prosedürü, rumen ve dışkıları gibi farklı konumlardan anaerobik fungusların karşılaştırmalı sayımını mümkün kılmıştır. Bu, fungal sayım, ruminal sıvıdaki serbest yüzen zoosporların doğrudan sayımına (Orpin, 1977) veya sellobiyoz içeren silindir tüplerdeki zoosporlardan fungus kolonilerinin gelişimine dayanan diğer araştırmalardan farklıdır (Joblin, 1981). MPN ve diğer numaralandırma prosedürleri arasında karşılaştırmalar yapılmamıştır ve Theodorou ve ark. (1990), bir mililitre ruminal sıvı başına TFU değerleri (0.38×10^4 ile 4.40×10^4 TFU ml^{-1} arasında) ile, literatürde bildirilen, koyundan alınan mililitre ruminal sıvı başına zoosporların konsantrasyonu için verilen aralık ($10^3 - 10^5 \text{ ml}^{-1}$) dahilindedir (Joblin, 1981, Orpin, 1977, Orpin ve Joblin, 1988). Sayım işlemi için gereken zamana bakıldığında, anaerobik funguslar içeren sayım tüplerinin çoğu, 3 ila 4 günlük inkübasyonda pozitif olmuştur. Bununla birlikte, 10 günlük bir inkübasyon periyodu, dışkılarda anaerobik funguslar ararken, uykuda kalan kistlerin veya sporların çimlenme için zamana ihtiyaç duyabileceği bir önlem olarak kabul edilmektedir (Theodorou ve ark., 1990).

Sığırlarda rumen hacmi koyun ve keçilere göre daha geniş olduğu için mikroorganizma yoğunluğu da daha fazla olmaktadır. Bu nedenle Toplanan dışkı örneklerinden inekler için 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} koyun ve keçiler için 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dilüsyonları ile fungus izolasyonu yapılmış ve 10 günlük takip ile muhtemel fungus sayıları belirlenmiştir. Farklı hayvan türlerinde toplanan örneklerdeki fungus sayıları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.



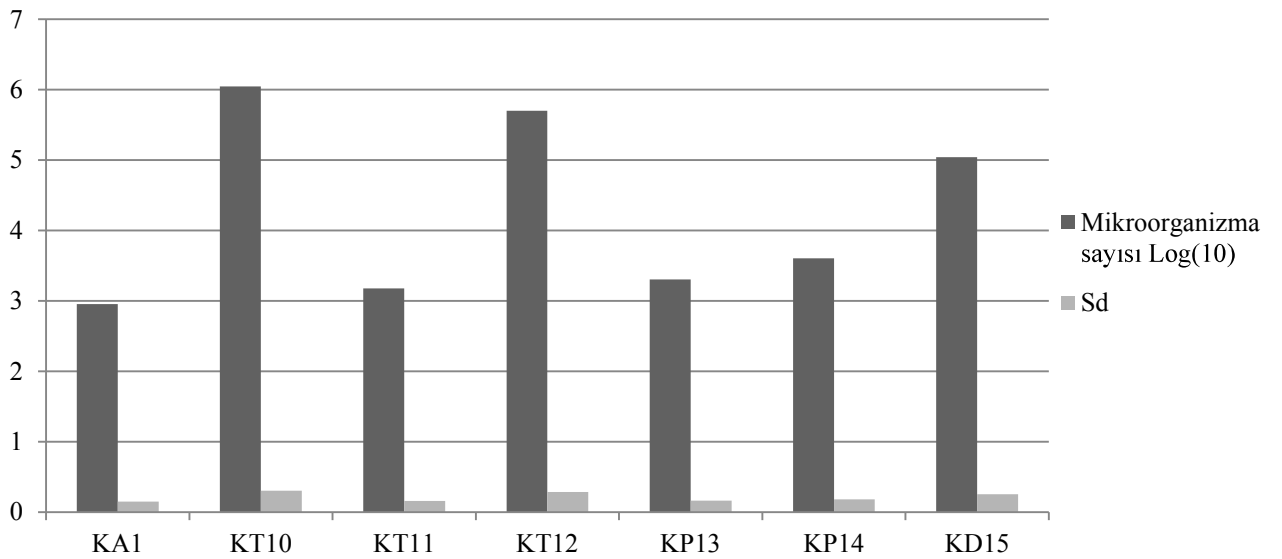
Şekil 4.1. İneklerden toplanan dışkı örneklerinde fungus sayıları (TFU) (Sd: Standart hata).

Toplanan inek dışkı örneklerinde tespit edilen fungus sayısı 10^3 ile 10^7 arasında değişmektedir. Bu miktarın altında (10^3) bulunan örneklerde ise kuru madde miktarındaki farklılıklar, hayvanın beslenmesi, rumenin büyüklüğü ve dışkıdaki fungusların sıcak ortamda vejetasyona uğramasından dolayı TFU sayılarında azalma olduğu düşünülmektedir. Andırın ilçesinden alınan SA1 ve SA3 numaralı örnekler en yüksek fungus canlılığı gösteren örnekler olurken SP14 numaralı Pazarcık örneği en az canlılık gösteren örnek olmuştur.



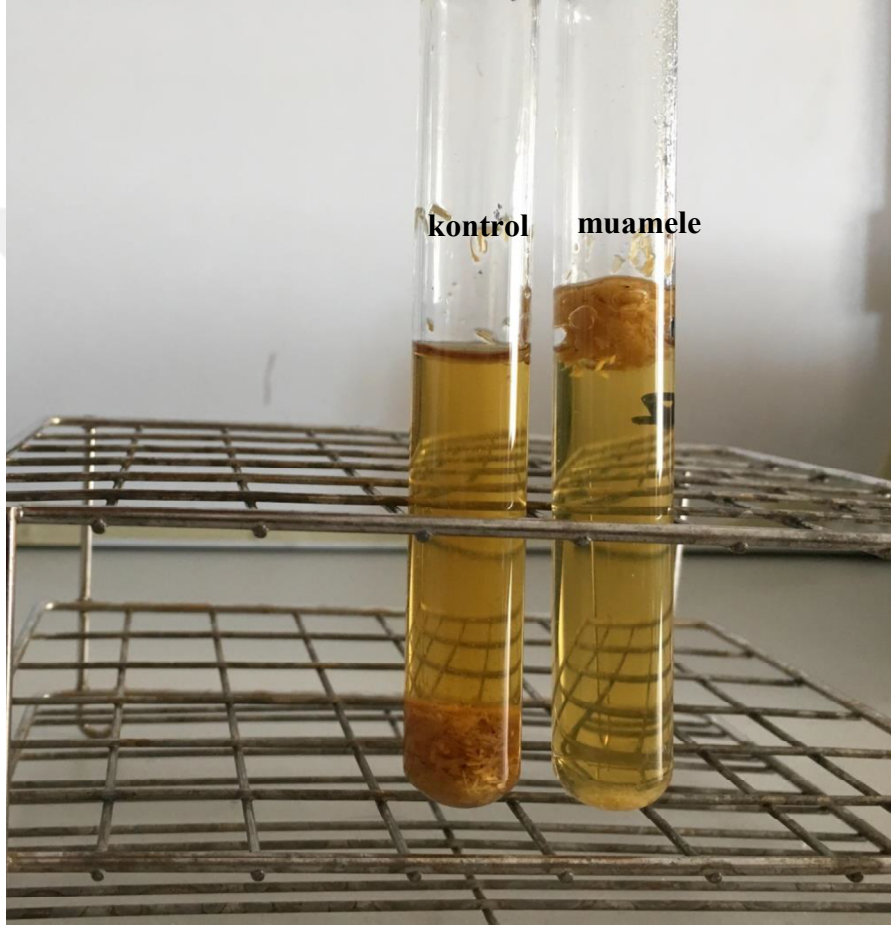
Şekil 4.2. Koyunlardan toplanan dışkı örneklerinde fungus sayıları (TFU) (Sd: Standart hata).

Koyunlardan toplanan örneklerde fungus sayıları 10^2 ile 10^6 arasında değişken çıkmıştır. 14 numaralı Pazarcık ilçesinden almış olduğumuz örnek 1.1×10^6 TFU olarak en yüksek sayıda fungus içerdiği bulunmuştur ve OA1 numaralı andırın ilçesinden alınmış olan örnek 4×10^2 TFU sayısı ile en az fungus barındıran koyun örneğimiz olmuştur. OD15 ile OT10 ve OF9 ile OT12 örnekleri ise birbirlerine yakın değerler göstermiştir.



Şekil 4.3. Keçilerden toplanan dışkı örneklerinde fungus sayımı (TFU) (Sd: Standart hata).

Keçilerden alınan dışkı örneklerinin 7 tanesinde manuel sayım işlemi yapılmıştır diğer 9 örneğimizde fungus tespit edilmemiştir. Canlanan örnekler 10^3 - 10^6 arasında TFU sayıları vermiştir. Türkoğlu ilçesinden alınan K10 numaralı keçi örneği 1.1×10^6 TFU sayısı ile en fazla fungus barındıran örnek olurken yine Türkoğlu ilçesinden alınan K11 numaralı keçi örneği ise 1.5×10^3 TFU sayısı ile en az fungus bulunan örnek olmuştur. Keçi örneklerinde canlılık gösteren tüp sayısı sığır ve koyun örneklerine göre daha az sayıda kalmıştır.



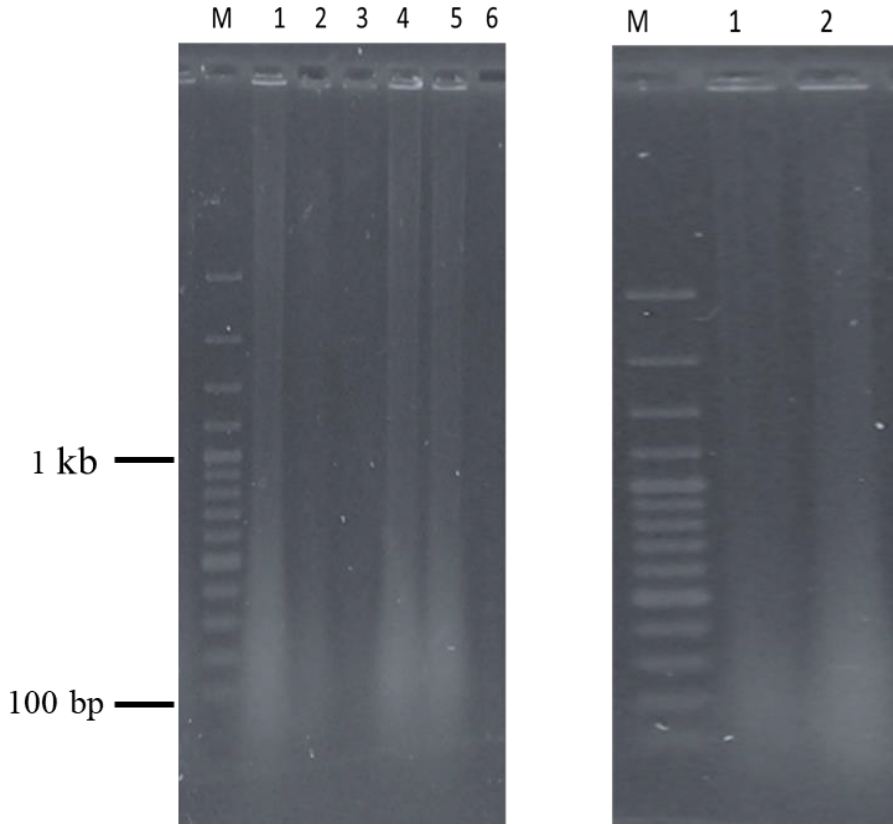
Şekil 4.4. Enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren anaerobik besi ortamında gelişen funguslar.

Rumen fungusları fermentasyon sırasında saman parçacıklarını bir araya toplamakta ve ürettikleri gaz neticesinde saman kütlesi besi ortamı içerisinde yüzmektedir.

4.2. Konvansiyonel PZR Yaklaşımı ile Örneklerde Hedef Mikroorganizma Varlığının Belirlenmesi

Toplanan örneklerde rumen bakteri ve fungus varlığını belirlemek amacıyla konvansiyonel PZR metodu kullanılmıştır. Toplanan örnekler toplam DNA izolasyonu yapılarak -20°C de saklanmıştır.

DNA izolasyonunun ileriki çalışmaları da etkilemesi nedeniyle elde edilen DNA'nın miktarı, saflığı, kullanılan çözücülerin kalıntısı PZR işlemlerinde kullanılacak DNA polimeraz enziminin çalışmasını etkileyebilmektedir. Bu bakımdan rumen bakteri ve funguslarının DNA izolasyonu için klasik metot olan CTAB (Doyle ve Doyle, 1987) temel alınarak 3.2.5.1. de belirtilen DNA izolasyon protokolüne göre kullanılmıştır. DNA izolasyon sonucu Şekil 4.5 da gösterilmiştir.



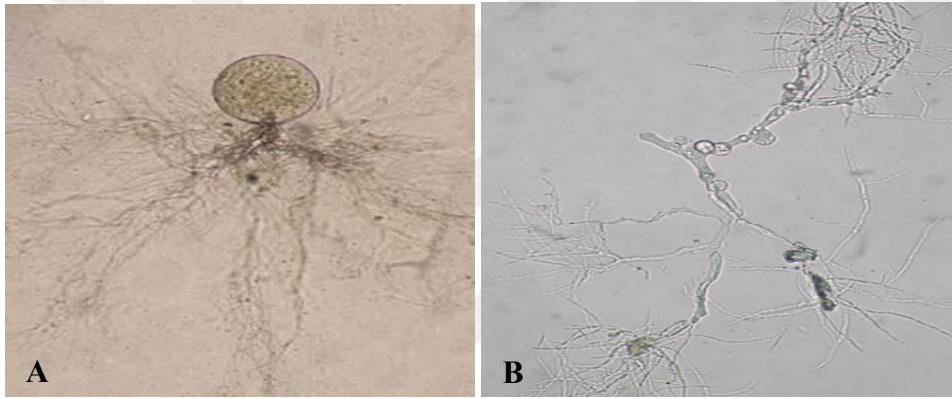
Şekil 4.5. CTAB metodu ile dışkı örneğinden elde edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü (M: 1 kb DNA standardı).

DNA'lar aynı miktar örnekten izole edilmiş ve aynı son hacimde çözüldürülmüştür. Dolayısı ile konsantrasyon farkı mikroorganizma yükü ile ilişkilidir.

Elde edilen standart DNA'lar öncelikle tasarlanan primerlerin kontrolü amacıyla PZR işlemine tabi tutulmuştur ve primerler pozitif sonuç vermiştir.

4.2.1. Anaerobik fungusların konvansiyonel pzs ile belirlenmesi

Referans anaerobik fungus morfolojik tanımlaması yapılarak (Şekil 4.6) konvansiyonel PZR yöntemi ile tanımlanabilmesi için Çizelge 3.10.'da belirtildiği gibi hedef gen bölgeleri seçilmiş ve o bölgelere özgü primerler ile amplifikasyon yapılmıştır. PZR amplifikasyonları Materyal ve Metot bölümünde belirtilen PZR koşullarında gerçekleştirilmiş ve her mikroorganizma için tekli amplifikasyonların %1'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.10 ile 4.11'de gösterilmiştir.



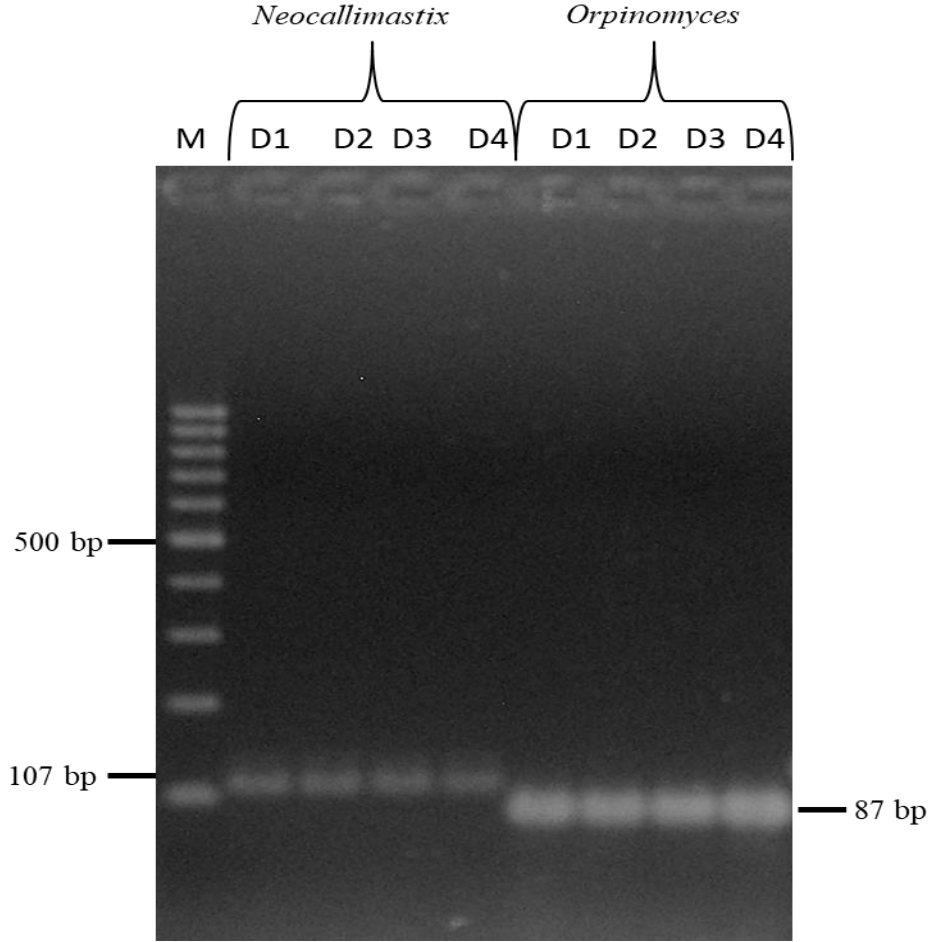
Şekil 4.6. *Neocallimastix* (monosentrik) (A) ve *Orpinomyces* (polisentrik) (B) fungusları

Primerler ile pozitif sonuç alınmasının ardından rastgele seçilen dışkıdan örneklerinden izole edilmiş olan DNA örnekleri ile PZR yapılarak hem primerler hemde DNA izolasyon yöntemi kontrol edilmiş ve herhangi bir olumsuz sonuç olmadığı görülmüştür.

Bu teknoloji ile taksonomik seviyede ayırım yapabilmek için takson içerisindeki heterojenite ve filogenetik mesafe amplifiye edilecek hedef bölge seçiminde önem taşımaktadır. Çalışmamızda ITS bölgesi ile referans anaerobik fungusların moleküler tanımlaması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).

Bu teknolojinin en önemli özelliklerinden biri hedef mikroorganizmaya özgü DNA veya RNA'nın varlığı ile taksonomik seviyede aynı türe ait iki bakteri suşunu bile ayırt edebilecek hassasiyete sahip olmasıdır (Nannapaneni, 2012). Ayrıca hızı, tekrarlanabilirliği, spesifikliğı ve ucuz olması gibi avantajlarından dolayı diğer metotlara

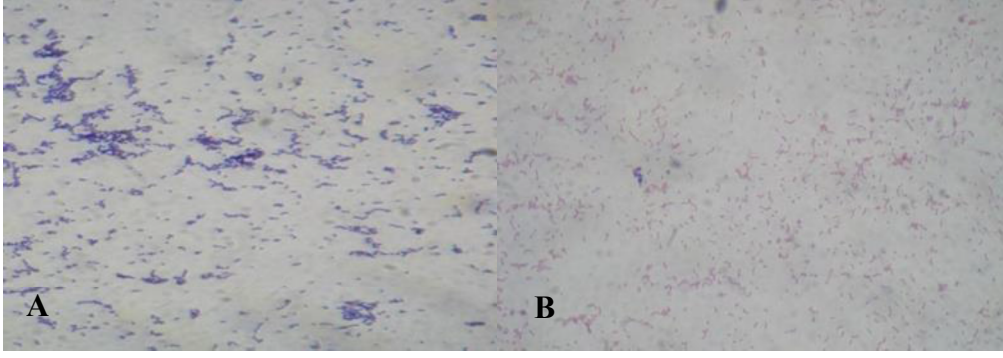
(kültür ve koloni bazlı metotlar, immünolojik metotlar gibi) göre daha avantajlı bir tekniktir. Ancak çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olması, primer kaynaklı sorunlar ve en önemlisi ise miktar ile ilgili tam anlamıyla bilgi vermemesi gibi sınırlamalara sahiptir.



Şekil 4.7. Funguslar için tasarlanan primer setlerinin kontrolü amacıyla yapılan PZR.

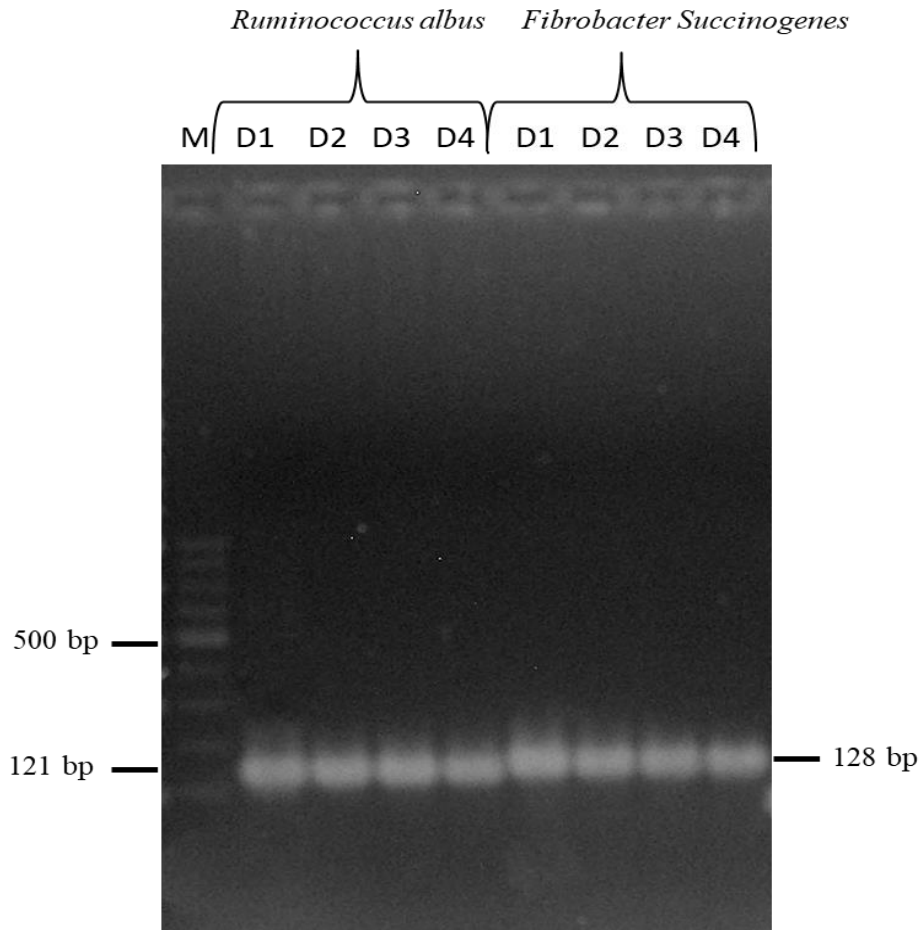
4.2.2. Anaerobik bakterilerin konvensiyonel PZR ile belirlenmesi

Anaerobik rumen referans bakteri suşlarının morfolojik tanımlaması yapılmıştır (Şekil 4.8). bu mikroorganizmaların konvensiyonel PZR yöntemi ile tanımlanabilmesi için Materyal ve Metot bölümünde belirtildiği gibi hedef gen bölgeleri seçilmiş ve o bölgelere özgü primerler (Çizelge 3.10) ile amplifikasyon yapılmıştır. PZR amplifikasyonları Materyal ve Metot bölümünde belirtilen PZR koşullarında gerçekleştirilmiş ve her mikroorganizma için tekli amplifikasyonların %1'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *Ruminococcus albus* (A) ve *Fibrobacter succinogenes* (B) mikroskop görüntüsü

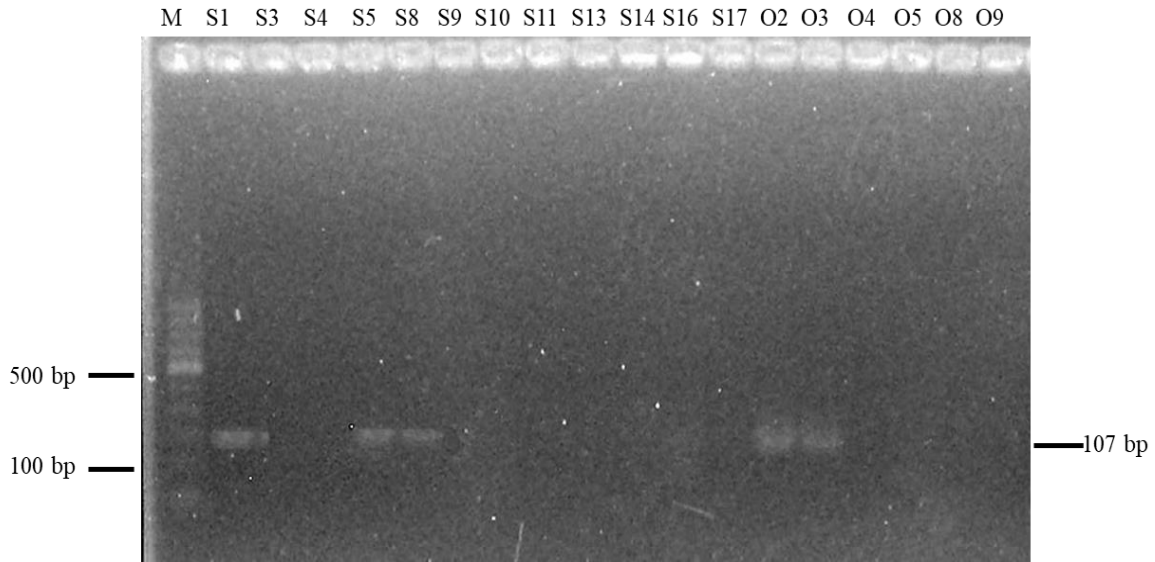
Yüksek derecede korunmuş 16S rRNA bölgesi taksonlar arasındaki ilişkiyi belirlemek ve cins ve tür bazında ayırım yapabilmek için tercih edilen gen bölgeleri arasında yer almaktadır (Rijpens ve Herman, 2002). Bu çalışmada da referans suşların tür bazında tanımlanması için 16S rRNA bölgesi seçilmiş ve bu bölgenin amplifikasyonu ile mikrobiyal tanımlama yapılmıştır.



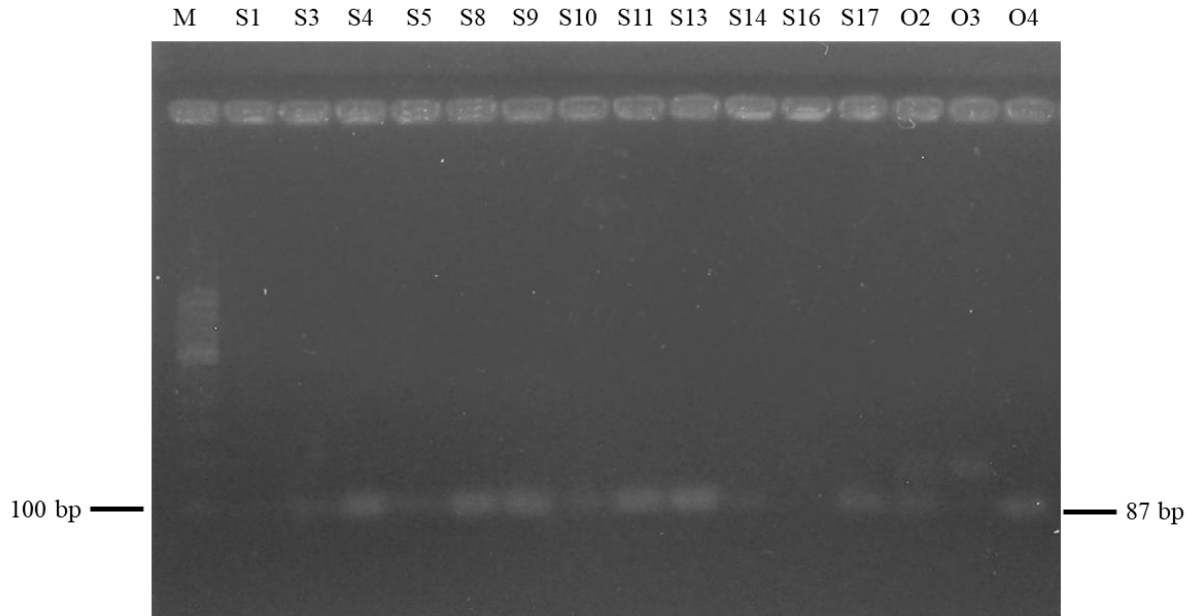
Şekil 4.9. Bakteriler için tasarlanan primer setlerinin kontrolü amacıyla yapılan PZR.

4.2.3. Toplanan örneklerde anaerobik rumen fungus varlığının moleküler belirlenmesi

PZR amplifikasyonu *Neocallimastix* ve *Orpinomyces* anaerobik fungusları için yapışma sıcaklığı 45 °C olarak test edilmiştir. Amplifikasyonda *Neocallimastix* (107 bç) ve *Orpinomyces* (87 bç)'e özgü PZR amplifikasyonu görölmüştür (Şekil 4.10, 4.11).



Şekil 4.10. *Neocallimastix* spp. anaerobik fungusunun jel görüntüsü (primerler 107 bp uzunlukta bir bölgeyi çoğaltmaktadır).

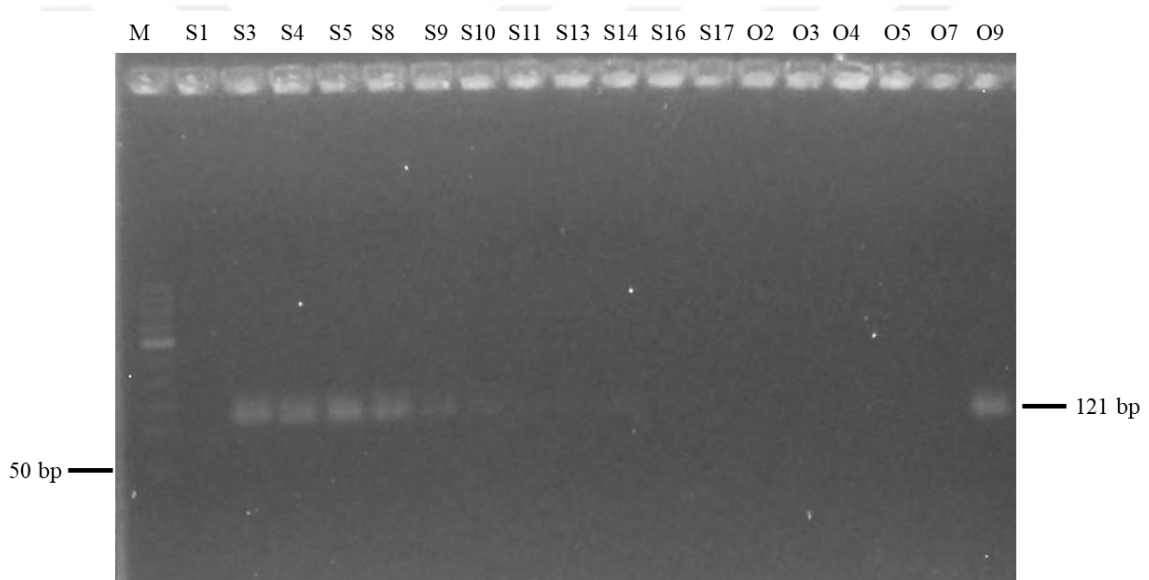


Şekil 4.11. *Orpinomyces* spp. anaerobik fungusunun jel görüntüsü (primerler 87 bp uzunlukta bir bölgeyi çoğaltmaktadır).

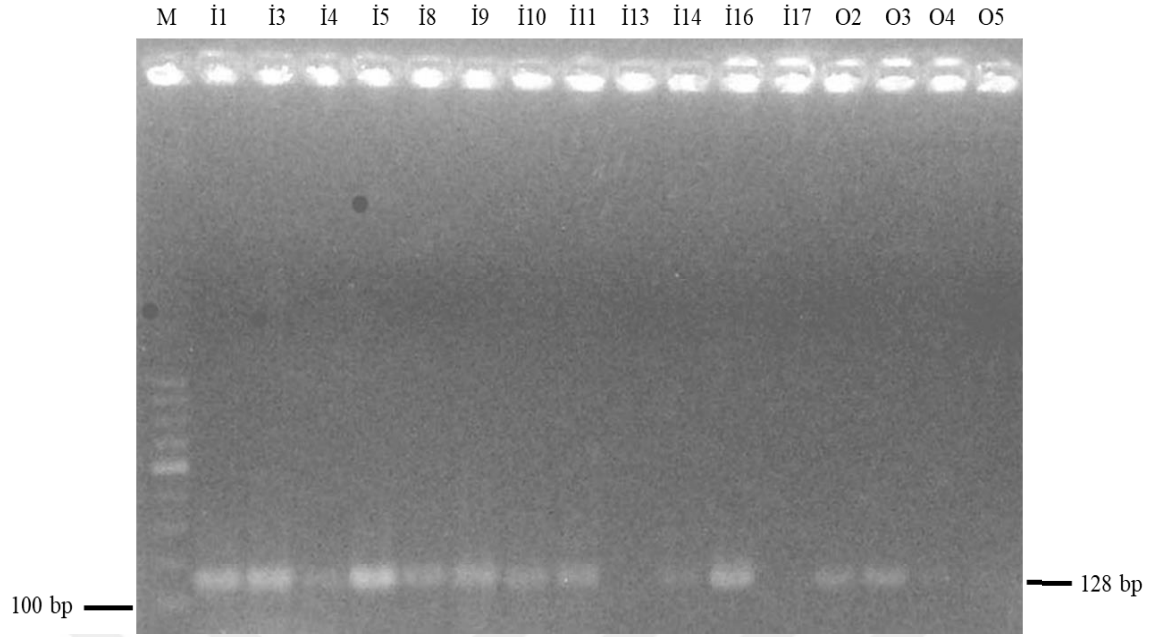
Seçilen dışkı örneklerine uygulanan konvansiyonel PZR işleminde *Neocallimastix* ve *Orpinomyces* fungusları taranmış ve hedeflenen bölgeler jel elektroforezinde istenilen bant boyları elde edilmiştir. Böylece anaerobik rumen funguslarını tanımlamak amacıyla yapılan işlemlerin (DNA izolasyonu, primer tasarlama, PZR koşulları) doğruluğu onaylanmıştır.

4.2.4. toplanan örneklerde anaerobik rumen bakteri varlığının moleküler belirlenmesi

Ruminococcus albus ve *Fibrobacter succinogenes* için 45°C 'de 30 saniye yapışma sıcaklığında yeni PZR amplifikasyonu ile 2 rumen mikroorganizmasının (121 bp ve 128 bp) %1'lik jel görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.12. *Ruminococcus albus* anaerobik rumen bakterisinin jel görüntüsü (kullanılan primerler 121 bp uzunlukta bir bölgeyi çoğaltmaktadır).



Şekil 4.13. *Fibrobacter succinogenes* anaerobik rumen bakterisinin jel görüntüsü (kullanılan primerler 121 bp uzunlukta bir bölgeyi çoğaltmaktadır).

Dışkı örnekleri DNA izolasyonuna tabi tutulduktan sonra elde edilen DNA örneklerine konvansiyonel PZR işlemi yapılmıştır. Jel görüntülerinde de görüldüğü üzere (Şekil 4.12, 4.13) *Ruminococcus albus* ve *Fibrobacter succinogenes* bakterileri hedeflenen bant boylarında belirlenmiştir. Bu sonuçlar hedef mikroorganizmaların örneklerimizde mevcut olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda moleküler tanımlama işlemlerinin doğruluğunu kanıtlamış ve RT-PZR işlemlerinde kullanılacak olan DNA'ların uygunluğu da görülmektedir.

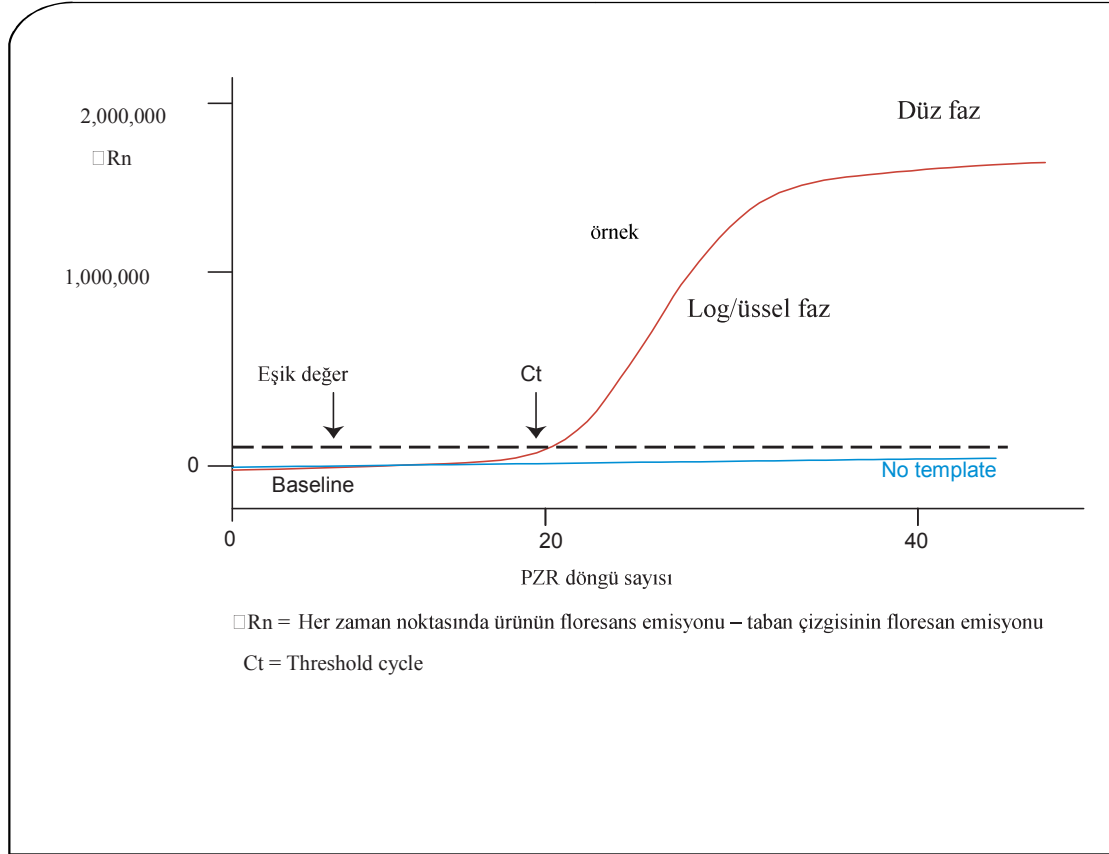
4.3. Eş zamanlı PZR İle Mikroorganizmaların Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Rumen mikrobiyal dinamiğinin belirlenmesinde Real Time PZR teknolojisi kullanımı önemli bir yaklaşımdır. Real Time PZR tekniğinin mikrobiyal yük ile ilgili bilgi vermesi, düşük miktarların bile tespit edilebilmesi, hızlı bir şekilde tanımlayabilme gibi özellikleri ile rumen mikroorganizmalarının kantifikasyonunda önemli faydalar sağlamaktadır. Real Time PZR teknolojisi ile birçok mikroorganizma tanımlanmış ve özellikle diyet değişikliklerine göre potansiyelleri tespit edilmiştir. *R.albus*, *F.succinogenes*, *R.flavefaciens*, *Megasphaera eldenii* gibi rumen mikroorganizmaları sıklıkla çalışılmış ve rumendeki sorumlu oldukları fonksiyonları belirlenmiştir. Real Time PZR teknolojisi hedef DNA dizisine özgü (Taqman teknolojisi gibi) veya amplifiye olmuş DNA fragmentlerini belirleyebilen (SYBR-Green gibi) teknikleri içeren güncel metotlar

arasında yer almaktadır. Bu teknolojiye PZR ile amplifiye edilen hedef DNA fragmentleri floresan işaretleyiciler ile eş zamanlı olarak izlenebilmekte ve bu hedef diziler ile çok düşük miktarlarda bile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Floresan özellikte boya veya problemlerin oluşturduğu floresan ışımaya, PZR amplifikasyonu sırasında oluşan amplifikasyon ürünü ile doğru orantılıdır ve kantitatif analiz yapabilmeye imkan tanımaktadır. Real Time PZR ile mikroorganizmaları tanımlamada en yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar SYBR-Green ve Taqman belirleme teknikleridir (Chon ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Ueda ve ark., 2013). Ayrıca FRET, moleküler boncuk, LNA (Locked Nucleic Acid) prob, akrep primerleri kullanılarak hedef mikroorganizma identifikasyonları yapılmıştır (O'Grady ve ark., 2008; Omiccioli ve ark., 2009; Kotzekidou, 2013). Real Time PZR teknolojisi özellikle mikroorganizma dinamiğinin ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi gibi biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Real Time PZR teknolojisi ile oluşan amplifikasyon grafiği; i-) doğrusal zemin faz, ii-) erken üssel faz, iii-) üssel faz ve iv-) düz faz olarak tanımlanan dört aşamadan oluşmaktadır (Şekil 4.14). PZR amplifikasyonunun henüz başladığı, dolayısı ile floresan ışımının henüz ölçülebilir seviyede olmadığı aşama doğrusal zemin fazıdır. Real Time PZR analizlerinde önemli parametrelerden biri olan temel çizgi (baseline) amplifikasyonun başlangıç aşamasında (doğrusal zemin fazında) hesaplanmaktadır. PZR amplifikasyonunun üssel olarak artış gösterdiği ve bunu bağlı olarak floresan ışımının anlamlı bir değere ulaştığı aşama erken üssel faz olarak tanımlanmaktadır. Erken üssel faz aşamasında amplifikasyonun eşik değeri (threshold) belirlenmektedir. Aynı zamanda eşik değere karşılık gelen PZR döngü sayısı eşik değer döngüsü olarak ifade edilmekte ve Ct ile gösterilmektedir. Ct değeri (eşik döngü değeri) kantitatif analizlerde referans bir parametre olup amplifikasyonun gerçekleşmeye başladığı döngü sayısı ve kalıp DNA miktarı ile ilgili bilgi vermektedir. Amplifikasyonun ölçülebilir seviyeye ulaşması (Ct değeri) kalıp DNA miktarının yüksek olduğu zaman daha önceki döngülerde gözlenmektedir. Dolayısı ile küçük Ct değerleri PZR amplifikasyonunun yüksek DNA miktarından dolayı erken başladığını ifade etmektedir (Schmittgen ve Livak, 2008). Başka bir ifade ile Ct değeri ile DNA miktarı arasında ters ilişki bulunmakta ve regresyon grafikleri azalan yönde bir eğilim göstermektedir. PZR amplifikasyonu devam ederken her döngü sonunda amplifikasyon ürünleri üssel olarak artmakta ve takiben optimum amplifikasyon

periyoduna ulaşmakta ve bu faz üssel faz olarak tanımlanmaktadır. Amplifikasyon grafiğinin son aşaması olan düz faz aşamasında ise reaksiyon bileşenleri tükenme noktasına gelmiştir ve bu aşamada artan floresan yoğunluğu verilerini hesaplamak mümkün olmamaktadır (Wong ve Medrano, 2005).



Şekil 4.14. Real Time PZR amplifikasyon grafiğinin şematik gösterimi

Eşik değeri döngü sayısı 'Ct' olarak, tanımlanmaktadır. Bu çalışmada ESCO SPEKTRUM 48 cihazı kullanılmış ve amplifikasyonlar Ct değeri olarak ifade edilmiştir. Amplifikasyonlar Taqman probolar kullanılarak Unipleks ve Multipleks olarak yapılmıştır.

Real Time PZR Taqman teknolojisi gibi hedef DNA dizilerine özgü teknikleri bulunan güncel bir metottur. Tanımlanmış rumen mikroorganizmalarından izole edilen DNA miktarı (ng/μL) ile Ct değeri arasındaki ilişki (r^2) Real Time PZR analizlerinde mikroorganizma konsantrasyonlarını belirlemede kullanılmıştır. Dört farklı rumen mikroorganizması için planlanan Real Time PZR amplifikasyonunda kullanılan primerler ile Taqman probolar Çizelge 3.4'de ve Unipleks Real Time PZR bileşenleri ve koşulları ise Materyal ve Metot 3.5'de belirtilmiştir.

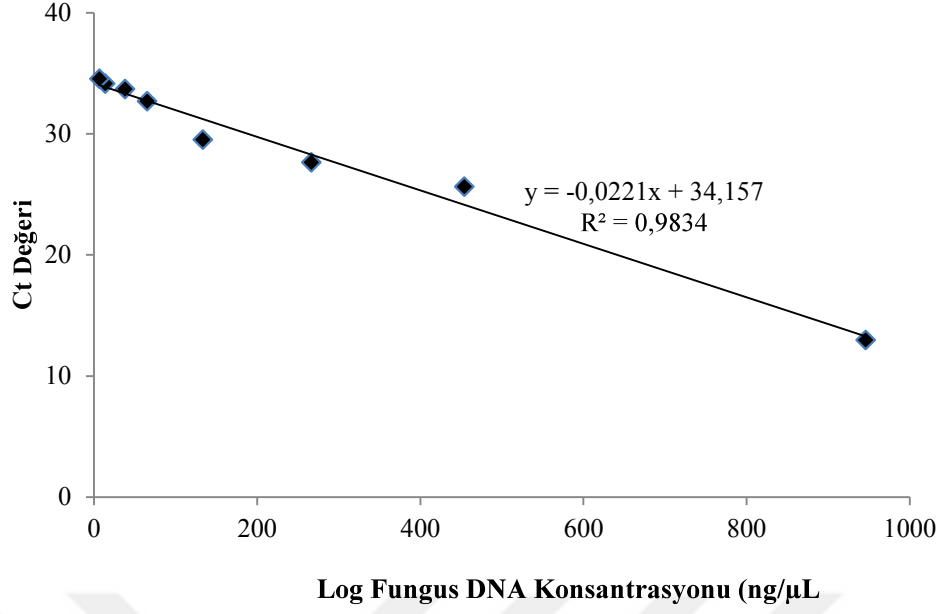
4.3.1. Uniplex RT-PZR ile anaerobik fungus yoğunluğunun belirlenmesi

Real Time PZR amplifikasyonunda standart DNA konsantrasyonu ile izole edilen mikroorganizmaların ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Standardizasyon çalışmalarında HAYMER de bulunan sığır örneğinden izole edilen anaerobik fungus DNA'sı Real Time PZR amplifikasyonunda kullanılmış ve ideal Ct değerleri (CT:14,15) bulunmuştur. Dolayısı ile tüm toplanan örneklerle yapılacak olan RT-PZR amplifikasyonları uygulanabilir niteliktedir.

Real Time PZR amplifikasyonu ile kalıp DNA konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi tespit etmek için rumen mikroorganizmalarından izole edilen DNA'lardan seri seyreltmeler (1: 2 oranında) kullanılmıştır. Bu seyreltmelerde 8 dilüsyon noktası belirlenmiştir (1X-8X). Seyreltilen DNA'lar kullanılarak elde edilen amplifikasyon sonuçları ile standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrileri seri dilüsyonlara ait DNA konsantrasyonu ile her bir dilüsyon için tespit edilen Ct değerleri arasındaki logaritmik ilişki belirlenerek oluşturulmuştur. Ct değeri tahmini ve elde edilen verilerin analizleri Real Time PZR cihazının (ESCO SPEKTRUM 48) yazılımı ile yapılmıştır. Ayrıca amplifikasyon verileri Excel programına aktarılmış grafik analizleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan rumen mikroorganizmalarının tekli Real Time PZR amplifikasyonu standardizasyonu Bulgular ve Tartışma 4.3.1.2- 4.3.2.2'de detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

4.3.1.1. *Neocallimastix spp.* Real Time PZR standartının belirlenmesi

Neocallimastix sp. referans suşu için Real Time PZR analizlerinde fungus cinsine özgü gen bölgesi ve bu bölgeye spesifik primer ve probler Çizelge 3.10'da belirtilmiştir. BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan GMLF 3 suşundan seri seyreltmeler ile elde edilen DNA dilüsyonları kalıp DNA olarak kullanılmıştır. *Neocallimastix sp.* suşundan izole edilen kromozomal DNA 1:2 dilüsyon oranında 8 kat seyreltilmiştir. DNA konsantrasyonları 454,2-6,7 ng/μL arasında değişim göstermiştir ve DNA dilüsyonlarının eşik değer döngüleri (Ct) 12,96-34,54 döngü arasında değişmiştir. Seyreltilen DNA standartlarından elde edilen Ct değerine karşılık gelen DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayıları belirlenerek doğrusal kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Neocallimastix sp.* Real time PZR standartı

Neocallimastix fungusu için Ct değeri ve logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki ilişki $y=34,157-0,0221x$ regresyon denklemi ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Neocallimastix sp.* standart DNA dilusyonları

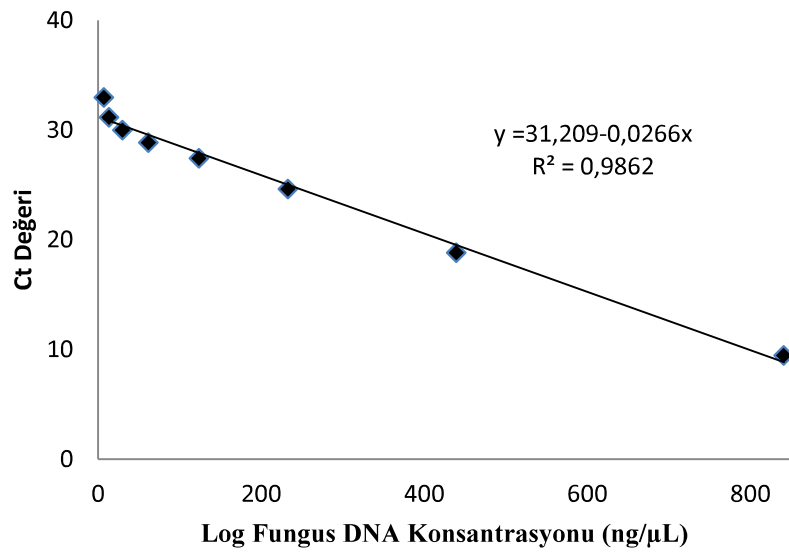
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL
1X	12,96	946,3
2X	25,61	454,2
4X	27,64	266,7
8X	29,52	133,6
16X	32,69	65,4
32X	33,68	38,3
64X	34,13	13,9
128X	34,54	6,7

Neocallimastix sp. fungusları üzerine Real Time PZR ile çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Denman ve Mcsweeney (2006) Monosentrik saf kültürlerin fungus biyokütlesindeki DNA oranlarında anlamlı bir fark olmadığını tespit etmiştir. *Caecomyces* fungus biyokütlesinin kuru ağırlığının ve ITS1 kopya sayılarının *Neocallimastix* ve *Anaeromyces*'e göre daha düşük olduğu görülmüştür (Lwin ve ark., 2011) bu çalışmada

benzer sonuç göstermiş, *Neocallimastix* fungusları *Orpinomyces*'ten daha fazla bulunmuştur.

4.3.1.2. *Orpinomyces spp.* Real Time PZR standartının belirlenmesi

Real Time PZR analizlerinde *Orpinomyces spp.* referans suşu için çizelge 3.10'da belirtilen cinse özgü gen bölgesi ve bu bölgeye spesifik primer ve probalar kullanılmıştır. BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan GMLF 19 suşundan seri seyreltmeler yapılarak elde edilmiş ve DNA dilüsyonları kalıp DNA olarak kullanılmıştır. *Orpinomyces sp.* suşundan izole edilen kromozomal DNA 1:2 dilüsyon oranında 8 kat seyreltilmiştir.



Şekil. 4.16. *Orpinomyces spp.* Real-Time PZR standartının oluşturulması

DNA konsantrasyonları 841,4 -13,6 ng/μL arasında değişim göstermiştir ve DNA dilüsyonlarının eşik değer döngüleri (Ct) 9,45-24,54 döngü arasında değişmiştir. Seyreltilen DNA standartlarından elde edilen Ct değerine karşılık gelen DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayıları belirlenerek doğrusal kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Çizelge 4.4. *Orpinomyces spp* standart DNA dilüsyonları

DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL
1X	9,45	841,4
2X	18,8	439,6
4X	24,61	233

8X	27,39	124,2
16X	28,82	62,1
32X	29,96	30
64X	31,14	13,6
128X	32,94	7,3

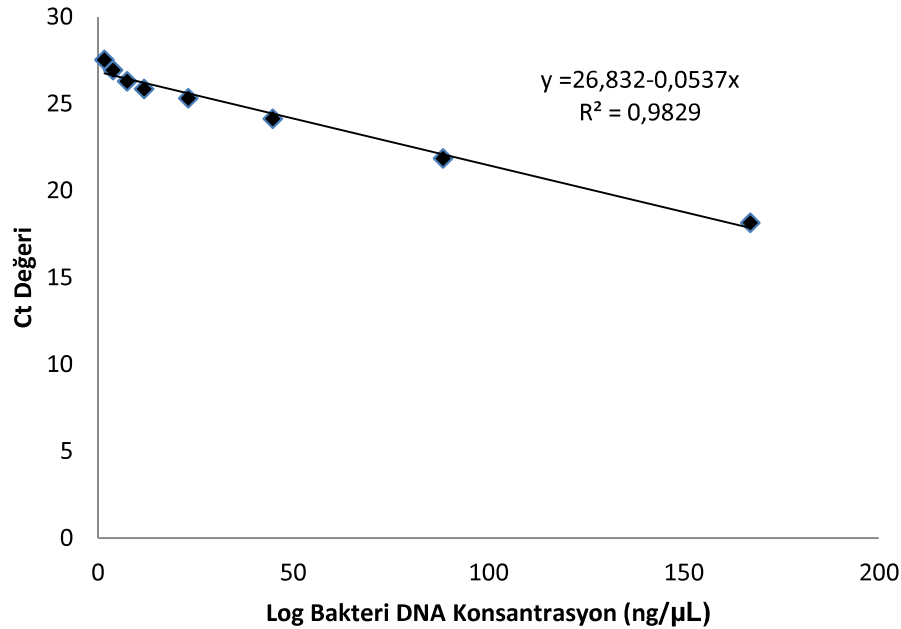
Kalibrasyon eğrişi oluşturulduktan sonra konsantrasyonları belirlenmiş DNA örnekleri kullanılarak *Orpinomyces* miktarları çizelge 4.4' te belirlenmiştir.

4.3.2. Uniplex RT-PZR ile anaerobik bakteri yoğunluğunun belirlenmesi

Real Time PZR amplifikasyonu için ile kalıp DNA konsantrasyonunu tespit etmek için rumen bakterilerinden izole edilen DNA'lardan seri seyreltmeler (1:2 oranında) kullanılmıştır. Bu seyreltmelerde 8 dilüsyon noktası belirlenmiştir (1X-8X). İlk olarak HAYMER'de bulunan sığır örneklerinden alınan yeni dışkı örnekleri ile primer ve proplar denenmiş ve tüm örnekler uygulanabilir nitelikte oldukları belirlenmiştir.

4.3.2.1. *Ruminococcus albus* RT-PZR Standartının Belirlenmesi

Real Time PZR analizlerinde türe özgü *Ruminococcus albus* miktarını belirlemek için kullanılan primer ve proplar (çizelge 3.10) kullanılarak Real Time PZR ile kuantifikasyonu belirlenmiştir. BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan SY3 suşundan elde seri seyreltmeler ile edilen DNA dilüsyonları kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



Şekil.4.17. *Ruminococcus albus* RT-PZR standartının oluşturulması

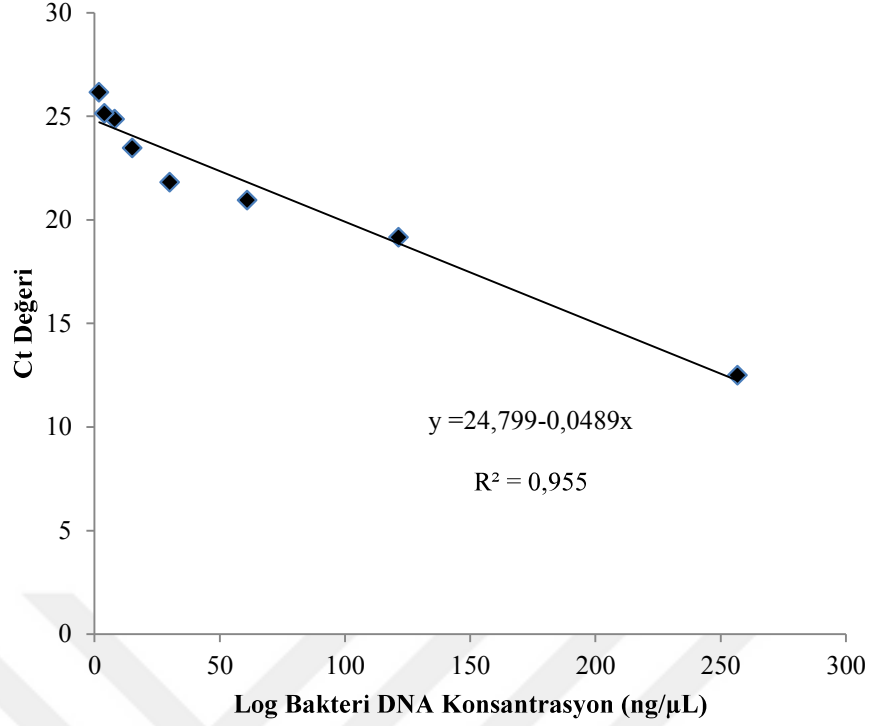
Ruminococcus albus suşundan izole edilen kromozomal DNA 1:2 dilüsyon oranında 7 kat seyreltilmiştir. DNA konsantrasyonları 167,1-3,9 ng/μL arasında değişim göstermiştir ve DNA dilüsyonlarının eşik değer döngüleri (Ct) 12,97-14,4 döngü arasında değişmiştir. Seyreltilen DNA standartlarından elde edilen Ct değerine karşılık gelen DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayıları belirlenerek doğrusal kalibrasyon eğrisi $y=26,832-0,0537$ olarak oluşturulmuştur.

Çizelge 4.5. *Ruminococcus albus* standart DNA dilüsyonları

DNA Dilüsyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL
1X	18,13	167,1
2X	21,83	88,4
4X	24,12	44,8
8X	25,31	23,2
16X	25,83	11,9
32X	26,27	7,5
64X	26,93	3,9
128X	27,52	1,7

4.3.2.2. *Fibrobacter succinogenes* Real Time PZR standartının belirlenmesi

Fibrobacter Succinogenes S85 referans suşunun Real Time PZR analizleri ile kuantifikasyonunu belirlemek amacıyla türe özgü gen bölgesi ve bu bölgeye spesifik primer ve problemler (Çizelge 3.10) kullanılmıştır. BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan S85 suşundan elde seri seyreltmeler ile edilen DNA dilüsyonları kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.18. *Fibrobacter succinogenes* RT-PZR standartının oluşturulması

Fibrobacter succinogenes S85 suşundan izole edilen kromozomal DNA 1:2 dilusyon oranında 7 kat seyreltilmiştir. DNA konsantrasyonları 121,4-1,85 ng/μL arasında değişim göstermiştir ve DNA dilusyonlarının eşik değer döngüleri (Ct) 14,11-18,02 döngü arasında değişmiştir. Seyreltilen DNA standartlarından elde edilen Ct değerine karşılık gelen DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayıları belirlenerek doğrusal kalibrasyon eğrisi $y=24,799-0,0489x$ olarak oluşturulmuştur.

Çizelge 4.6. *Fibrobacter succinogenes* standart DNA dilusyonları

DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL
1X	12,49	256,80
2X	19,15	121,40
4X	20,95	61,00
8X	21,82	30,00
16X	23,46	15,10
32X	24,86	8,10
64X	25,14	4,00
128X	26,16	1,85

4.3.3. Örneklerde mikroorganizma miktarının belirlenmesi

Oluşturulan Real-Time PZR reaksiyonları ile toplanan örneklerde fungus ve bakteri miktarları belirlenmiştir. Sığır örneklerinde mikroorganizma miktarı belirlenmesi çizelge 4.7’de gösterilmiştir. DNA izolasyonu aynı miktar dışkıdan yapılmıştır.

Çizelge 4.7 Sığır örneklerinde primer ve problemleri ile elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
SA1	17,62	26,9	17,86	23,66	21,65
SA2	30,5	21,07	26,78	20,62	19,50
SA3	22,18	18,56	32,28	21,88	20,98
SE4	17,31	19,65	29,66	22,05	22,42
SE5	68,25	17,53	26,69	30,57	21,26
SE6	47	16,73	17,36	30,53	24,85
SF7	34,56	28,09	16,05	23,45	20,97
SF8	22,25	30,56	32,64	31,90	23,94
SF9	21,81	30,38	30,98	22,93	26,30
ST10	14,18	31,02	30,63	21,81	26,72
ST11	15,93	29,94	31,41	21,44	28,16
ST12	7,31	14,88	28,32	25,40	28,13
SP13	12,87	13,56	31,59	22,95	32,22
SP14	83,68	19,93	30,73	21,90	28,28
SD15	29,68	21,94	32,67	24,40	31,46
SD16	34,31	28,85	32,23	22,19	26,42

S: Sığır A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar (g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Neocallimastix sp. primer ve problemleri ile yapılan RT-PZR sonuçlarına göre sığırlarda SP13 numaralı Pazarcık örneği 13,56 Ct değeri ile en çok *Neocallimastix* fungusu barındıran sığır örneği olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde Pazarcık ilçesi SP13, SP14

örnekleriyle en fazla *Neocallimastix* rastlanan ilçe olmuştur. SF8, SF9, ST10 numaralı örnekler en yüksek Ct değerleri göstererek hedef mikroorganizmayı en az barındıran örnekler olmuşlardır. Afşin ilçesi alınan SF7, SF8, SF9 numaralı sığır örnekleri ile *Neocallimastix* ortalaması en düşük olan ilçe olmuştur.

Orpinomyces spp. primer ve problemleri ile yapılan RT-PZR sonuçlarına göre sığırlarda *Orpinomyces* yoğun halde bulunmamaktadır. SF7 numaralı pazarcık örneği 34,56 ng/μL DNA konsantrasyonu ile 16,058'lik Ct değeri elde etmiş ve en anlamlı değere sahip olmuştur. SE4, SE5 ve SE6 örnekleri en yoğun miktarda *Orpinomyces spp.* barındıran örnekler olmuştur. SD15 ve SD16 örneklerinin bulunduğu Dulkadiroğlu ilçesi sığırlarda en az hedef mikroorganizmayı barındıran ilçe olmuştur.

Sığırlarda *Ruminococcus albus* için yapılan RT-PZR işlemleri sonrasında SA2 numaralı Andırın ilçesinden toplanan örnek 20,62'lik Ct ile *R. albus*'un en bol bulunduğu örnek olmuştur. SE6 numaralı Elbistan örneği ise 34,53 Ct ile önemsiz olarak belirlenmiştir. Tüm ilçelerde *Ruminococcus albus* yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir fakat Andırın ilçesinde ufak bir farkla da olsa diğer ilçelerden daha yoğun konsantrasyonda *Ruminococcus albus* mevcuttur. DNA konsantrasyonu 83,68 ng/μL ile en yüksek olan SP14 örneği ise 21,90 Ct değeri göstermiştir.

Fibrobacter succinogenes'in sığırlarda miktar tayini yapmak için RT-PZR işlemi yapılmış ve *Ruminococcus albus*'ta olduğu gibi SA2 numaralı örnek 30,5 ng/μL DNA konsantrasyonu ve 19,50 Ct ile hedef organizmayı en yüksek miktarda ihtiva eden örnek olmuştur. Andırın en yüksek miktarda *Fibrobacter succinogenes* tespit edilen ilçe olmuş, Elbistan ve Afşin onu takip etmiştir. Pazarcık ve Dulkadiroğlu örneklerinde ise düşük miktarda hedef organizma tespit edilmiştir. SP13 ve SD15 numaralı örneklerin Ct değerleri önemsiz olarak belirlenmiştir.

Uniplex RT-PZR çalışmalarında *Ruminococcus albus* toplamda *Fibrobacter succinogenes*'den daha fazla miktarda belirlenmiştir. Bu sonuçlar *R.albus*' un grup ve sürekli kültürde hem *F.Succinogenes* hem de *R.flavefaciens*' den daha fazla olduğunu bildiren Chen ve Weimer (2001)' in sonuçlarıyla benzerdir.

Çizelge 4.8. Koyun örneklerinde primer ve problemleri ile elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
OA1	35,62	28,8	25,98	20,06	27,13
OA2	30,68	30,26	27,35	19,25	25,54
OA3	27,18	16,16	25,21	19,59	25,65
OE4	22,31	17,50	30,22	21,84	27,58
OE5	87,31	13,29	31,16	27,31	26,77
OE6	138,56	13,02	30,74	29,74	28,13
OF7	109,00	13,55	30,59	28,33	24,68
OF8	330,62	13,43	29,23	29,59	27,58
OF9	179,00	29,78	30,57	27,60	22,45
OT10	40,00	22,81	21,43	20,30	22,02
OT11	35,25	19,91	30,05	20,81	27,02
OT12	25,87	23,42	29,87	21,45	22,63
OP13	40,81	23,91	29,48	22,17	20,68
OP14	121,06	17,19	30,45	24,59	22,03
OD15	31,50	16,21	31,55	28,33	27,43
OD16	60,25	20,57	32,63	27,68	26,54

O: Koyun A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar(g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Koyunlarda *Ruminococcus albus* miktarını tayin etme amacıyla yapılan uniplex RT-PZR işleminin ardından 49,1 ng/μL DNA yoğunluğundaki OA2 numaralı Andırın koyun örneği 19,25 lik Ct değeri ile en fazla miktarda *Ruminococcus albus* barındırmakta iken OE6 numaralı örneğin 29,74'lük Ct değeri standart dilüsyonlarının en yüksek Ct sinden daha yüksek çıkmış ve önemsiz olarak belirtilmiştir. Dulkadiroğlu örneklerinde

R.albus tespit edilmemiştir fakat bunun dışındaki ilçelerde anlamlı miktarlarda bulunmaktadır. En yüksek sayı Andırın ilçesinden alınan örneklerde tespit edilmiştir.

Koyun örneklerinde *Orpinomyces* probaları ile yapılan RT-PZR sonucunda OT10 numaralı Türkoğlu örneği 21,43'lük Ct ile anlamlı miktarda *Orpinomyces sp.* içermiştir ve Ct değerleri 30 üzeri olan örneklerin önemsiz olarak bulunmuştur. İlçe bazında bakıldığında ise OA1,OA2,OA3 numaralı Andırın örneklerinin tamamında anlamlı miktarda *Orpinomyces sp.* değerleri bulunmuştur.

Koyun örneklerinde *Neocallimastix* probu ile yapılan RT-PZR işleminde 470,2 DNA yoğunluğundaki 6 numaralı örnek 13,025 Ct değeri ile en yüksek sayıda *Neocallimastix* bulunduran koyun örneğidir. *Neocallimastix spp.* için 4 numaralı keçi örneğinde 21,02'lik Ct değeri ile önemli kabul edilecek bir değere sahiptir. 30 Ct üzeri değerler anlamlı bir sonuç göstermemektedir. Elbistan ilçesi O4, O5, O6 numaralı örnekler olarak koyunlarda en çok, Andırın ise OA1, OA2, OA3 numaralı örnekler ile en az *Neocallimastix sp.* barındıran ilçe olmuştur. OT12 ve OD15 örnekler ise Ct değerleri çok düşük değer gösterdiği için hesaplamalara dahil edilmemiştir.

Koyunlarda *Fibrobacter succinogenes* probu ile uygulanan RT-PZR amplifikasyonunda 65,3 ng/μL DNA konsantrasyonu ve 20,68 Ct değeri ile OP13 numaralı Pazarcık örneğinin en yüksek konsantrasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Pazarcık ilçesinden alınan örnekler en yüksek miktarda *Fibrobacter succinogenes* tespit edilen örnekler olmuştur. Tüm örneklerinde 37'lik Ct değeri gösteren Dulkadiroğlu ilçesi ise hemen hemen hiç hedef organizmayı barındırmayan ilçe olmuştur. Benzer bir şekilde Koike ve Kobayashi (2001) *F. succinogenes*, koyunlarda rumen digestasının başlıca selülitik bakterisi olduğunu ve Ruminococların nispeten daha az olduğunu bildirmişlerdir. Mosoni ve ark. (2007) ise çalışmamızla zıt olarak koyunlarda *R. flavefaciens*'in, *F. succinogenes*' den biraz daha fazla bulunduğunu her iki türün de *R. albus*' dan üstün olduğunu bulmuşlardır.

Çizelge 4.9. Keçi örneklerinde primer ve problemleri ile elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
KA1	25,62	33,19	30,81	24,2	27,92
KA2	28,62	30,81	31,25	21,84	25,82
KA3	34,12	31,46	30,7	22,55	28,03
KE4	66,37	21,02	29,62	21,22	25,35
KE5	15,56	25,21	29,82	27,49	23,33
KE6	60,5	26,14	33,71	22,97	31,55
KF7	14,25	26,67	32,71	32,08	26,57
KF8	7,18	29,40	32,18	30,20	27,63
KF9	25,56	30,60	29,94	20,92	24,26
KT10	187,37	27,93	28,45	19,03	22,56
KT11	221,06	28,55	29,93	20,58	22,86
KT12	156,62	27,98	28,24	20,52	20,96
KP13	73,18	28,83	30,63	22,50	19,50
KP14	177,81	29,97	32,39	21,70	20,54
KD15	65,75	29,47	30,24	19,85	22,92
KD16	66,37	26,84	30,92	25,10	27,82

K: Keçi A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar (g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Keçi örneklerine *Neocallimastix* probu ile uygulanan RT-PZR amplifikasyonunda 66,37 ng/μL DNA konsantrasyonu ile 21,02'lik Ct değeri gösteren KE4 numaralı Elbistan örneği en yoğun, KA1 numaralı örnek ise en az *Neocallimastix* bulunan örnektir. Elbistan ilçesi keçilerde KE4, KE5, KE6 örnekleriyle en çok, Andırın ilçesi ise KA1, KA2, KA3 örnekleriyle en az *Neocallimastix sp.* bulunan ilçe olmuştur.

Keçi örneklerinde *Orpinomyces spp.* problemleri ile yapılan RT-PZR amplifikasyonlarında KT12 numaralı örnek 28,24 lük Ct ile öne çıkmaktadır. KT10, KT11, KT12 numaralı Pazarcık ilçesinden temin edilen örneklerde diğer ilçelere göre daha

yüksek miktarda *Orpinomyces sp.* bulunduğu belirlenmiştir. Keçi örneklerinde fungus miktarları inek ve koyun örneklerine oranla daha geride kalmıştır.

Keçilerde *R.albus* sayısını belirlemek için yapılan RT-PZR amplifikasyonu ile K10 numaralı keçi örneğinde 299,8 ng/μL DNA konsantrasyonu ve 19,03'lük Ct ile en fazla *R.albus* bulunduran örnek olarak belirlenmiştir. KT10, KT11, KT12 numaralı örneklerin alındığı Türkoğlu ilçesi *R.albus* sayısını en yüksek miktarda bulundurmaktadır.

Keçi örneklerinde miktarı tespit edilmek amacıyla *Fibrobacter succinogenes* probu ile yapılan RT-PZR KP13 numaralı örneğin 19,5 Ct ile keçi örnekleri arasında en yüksek miktarda *Fibrobacter succinogenes*'e sahip olduğu belirlenmiştir. Pazarcık ilçesi keçi örneklerinde en yüksek miktarda hedef organizmayı barındıran ilçe olarak tespit edilmiştir. KE6 ve KD16 örnekleri Ct değerleri 30 üzeri olduğu için önemsiz olarak değerlendirilmiştir.

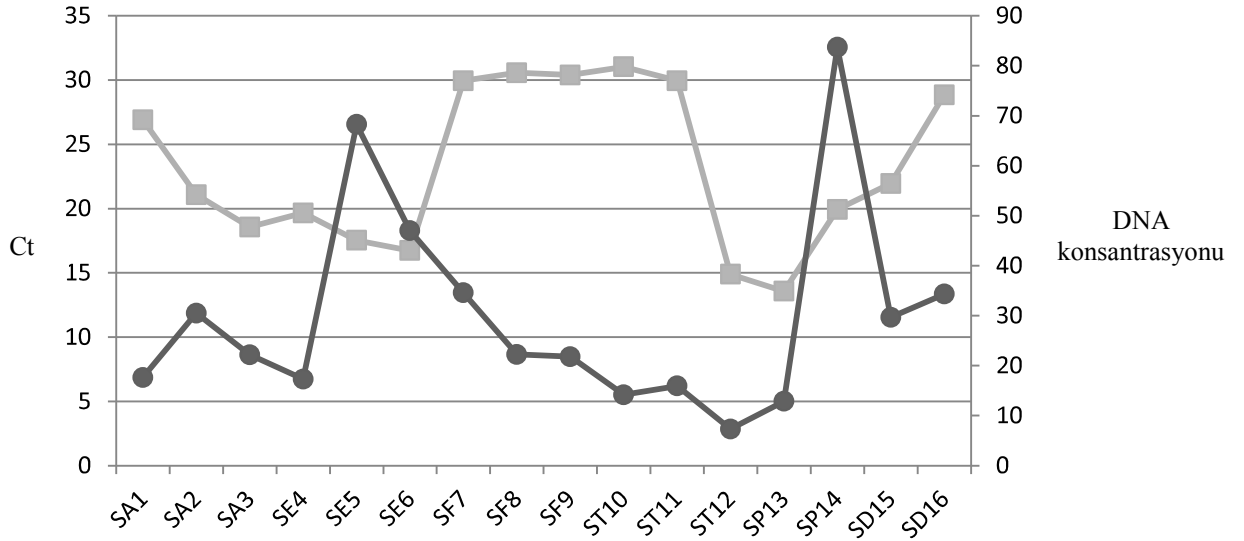
Tüm ilçelerde ve hayvanlarda bakteri popülasyonunun funguslara göre önemli derecede daha fazla miktarda olduğu belirlenmiştir. Keçilerde *Neocallimastix* cinsine ait bireylerin *Orpinomyces*'e oranla daha yoğun bulunmuştur. Bu hayvanların otladığı meralarda bulunan bitki örtüsü ile ilgili olabilmektedir.

Kok ve ark, (2013) yüksek konsantrasyonda yoğunlaştırılmış tanen içeren *Leucaena leucocephala* hibrid-Bahru'nun (LLB), keçilerde selüloolitik rumen fungal popülasyon üzerine etkisini, gerçek zamanlı PZR kullanılarak araştırmışlardır. Beslemenin ilk 10 gününde LLB ile beslenen keçilerdeki fungus popülasyonu inhibe olmuş, ancak 15 günlük beslemeden sonra, kontrol keçilerine (39.7 μg / ml) oranla fungal popülasyonun (157.0 μg / ml) 4 kat kadar artışı olmuştur. Bununla birlikte, bu süreden sonra, fungal popülasyon sürekli olarak azalmış ve 30 günlük beslenmede, fungus popülasyonu (50.6 μg / ml) kontrol keçileri (55.4 μg / ml) ile önemli ölçüde farklı olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda genel itibariyle kaba yemle beslenen keçilerde ise fungus miktarı yüksek olarak bulunmamıştır.

4.3.4. Mikrobiyal dağılımın belirlenmesi

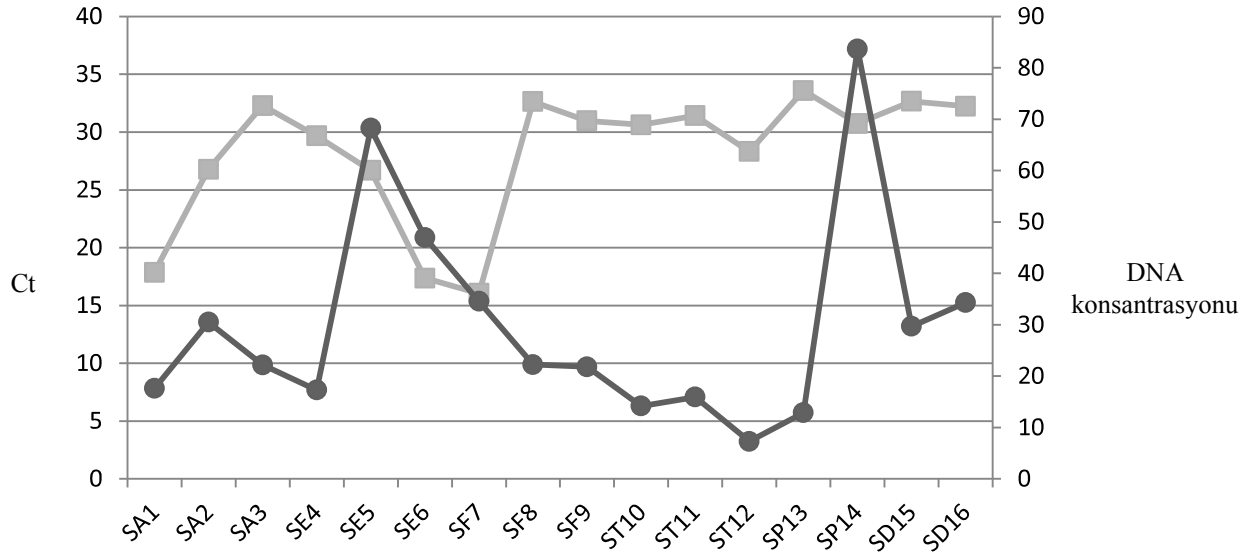
Ct değeri ile DNA konsantrasyonu arasındaki değişen ilişki toplam DNA'daki çalışılan mikroorganizma miktarını verir. Dolayısı ile yüksek DNA miktarına karşılık

yüksek Ct değeri beklenemez. Sığır örneklerinde DNA yoğunluğu ile Ct değeri arasındaki ilişki Şekil 4.19-4.22’de gösterilmiştir.



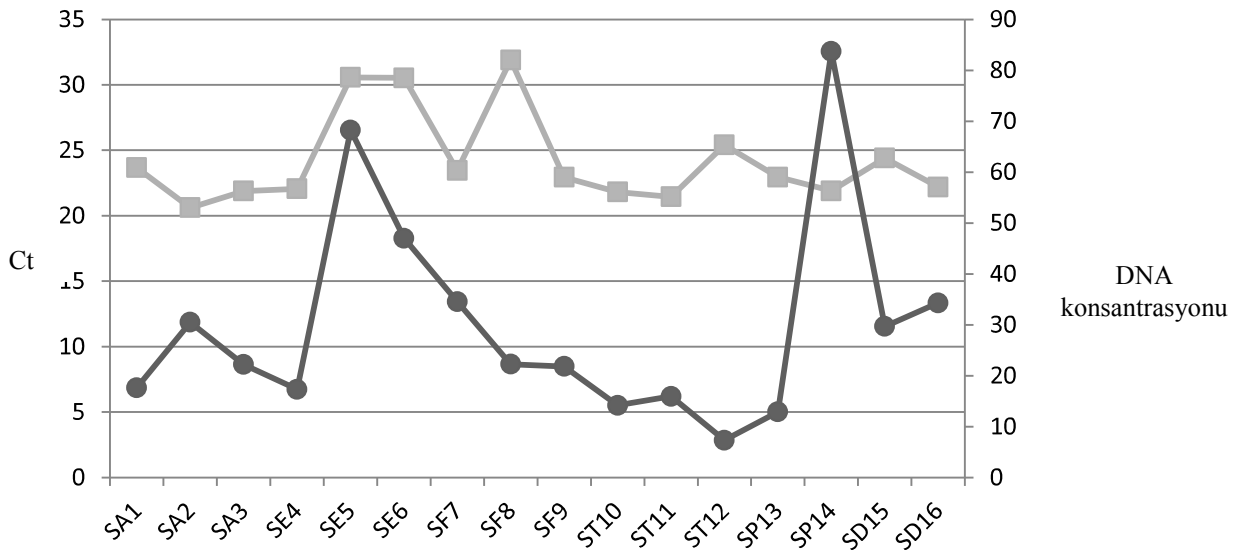
Şekil.4.19. Sığır örneklerinde *Neocallimastix* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

ST12 ve SP13 numaralı örnekler DNA konsantrasyonları düşük olmasına rağmen, DNA içeriğinde diğer örneklerle göre daha yoğun miktarda *Neocallimastix* fungusu bulundurmaktadır. SF8 ile SF9, ST10 ile ST11 örnekleri hem DNA konsantrasyonu hemde *Neocallimastix* yoğunluğu bakımından benzerlik göstermiştir ve hedef mikroorganizmayı diğer örneklerden daha az yoğunlukta barındırmaktadır.



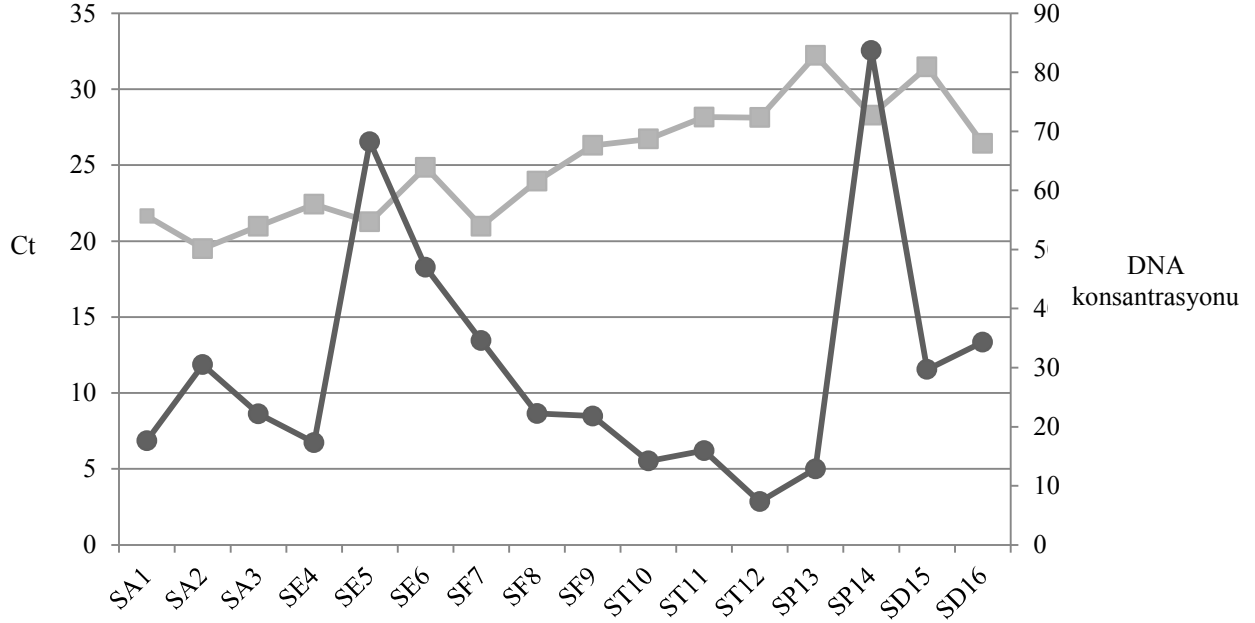
Şekil 4.20. Sığır örneklerinde *Orpinomyces* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

SF7 numaralı örnek içeriğinde en fazla *Orpinomyces* bulunduran örnek olmuştur. SP14 örneği ise yüksek DNA konsantrasyonuna rağmen 30 döngü sonunda ışıma yapmış ve içeriğinde az miktarda hedef organizmayı bulundurduğu belirlenmiştir. SA3, SF8, SF9; ST10, ST11 ve ST12, SP13 örnekleri DNA konsantrasyonu ve Ct değerleri bakımından birbirlerine benzerlik göstermektedirler.



Şekil 4.21. Sığır örneklerinde *R.Albus* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

SA2 örneği DNA yoğunluğu yüksek olmamasına rağmen hedef mikroorganizmayı en çok barındıran örnek olmuştur. SE5 örneği en yüksek ikinci DNA konsantrasyonuna sahip olmasına rağmen içeriğinde en az *Ruminococcus albus* yoğunluğu bulunan sığır örneklerinden biri olmuştur. Bu durum bize SE5 örneğinde; bu çalışmada yer almayan diğer bakterilerin, fungusların ve protozoaların bulunduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.22. Sığır örneklerinde *F.succinogenes* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■ : Ct değeri)

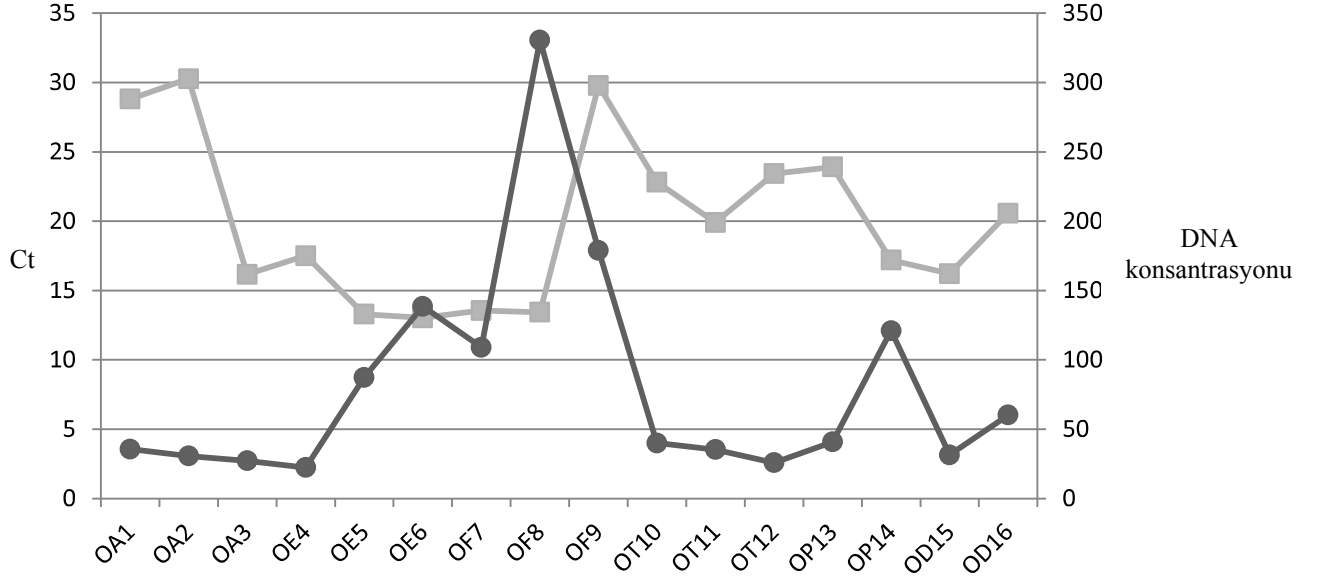
SA1, SA2, SA3 numaralı örneklerde hedef mikroorganizma yoğunluğu diğer örneklerle oranla daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni olarak hayvanların beslendiği meralarda *Fibrobacter succinogenes* popülasyonunun yüksek olması düşünülmektedir. Düşük DNA konsantrasyonuna sahip olan SP13 örneği bununla paralel olarak *Fibrobacter succinogenes* yoğunluğu en az olan örnek olmuştur. SP14 örneğinin ise DNA yoğunluğuna zıt bir şekilde düşük miktarda *Fibrobacter succinogenes* ihtiva ettiği belirlenmiştir.

Koike ve ark., (2003) samana bağlanmış *Fibrobacter succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *Ruminococcus albus* miktarlarını belirleyerek RT-PZR ile her üç türün sayısının NDF kaybolmasıyla kademeli olarak arttığını analiz etmişler ve çalışmamıza paralel olarak *Fibrobacter succinogenes* miktarının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Koike ve ark., 2003). Diğer taraftan Wora-anu ve ark. (2000), 100: 0, 60:40 ve 40:60 oranlarındaki kaba yem-konsantrat oranlarının, sırasıyla, bataklık mandalarında selüloolitik bakteri

popölasyonunu (5.62×10^{10} , 4.06×10^{10} ve 4.57×10^{10} CFU/ ml) azaltabileceğini bildirmişlerdir. Ek olarak, Tajima ve ark., (2001) saman diyetindeki hayvanlarda *Fibrobacter succinogenes* DNA baskın miktarının bir tahıl diyetine geçişin üçüncü gününde 20 kat düştüğünü ve 28. günde DNA'da 57 kat azalma ile daha da azaldığını bildirmiştir. 3. günde *R. flavefaciens* DNA konsantrasyonu, saman diyetindeki hayvanlarda başlangıç değerinin % 10'una düşmüş ve 28. günde bu seviyede kalmıştır. Bu nedenle, bu deneyde, bakteri DNA'sının kuantifikasyonu, daha yüksek konsantre beslenmelerden etkilenerek üç selölolitik bakteri sayısının (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*) azalmasını göstermiştir. Benzer şekilde Hungate (1966) katı parçacıkların birçoğuna bağlanmış olduğu için yeni içerikler alındığında selölolitik bakterilerin tüm digestada daha çok bulunduğunu bildirmiştir. Koike ve ark., (2003) gözlemlenen bağlı hücre sayısındaki artış, çoğunlukla saman üzerinde hücre çoğalmasına atfedilebilirken, 6 saatte, üç türün bağlı hücrelerinin sayısı kademeli olarak arttığını ve 24 saat (*F. succinogenes* için gram kuru madde (DM) başına 10^9 ve *R. flavefaciens* için gram DM başına 10^7) ya da 48 saatte (*R. albus* için gram gram başına 10^6) zirve yaptığını bildirmişlerdir.

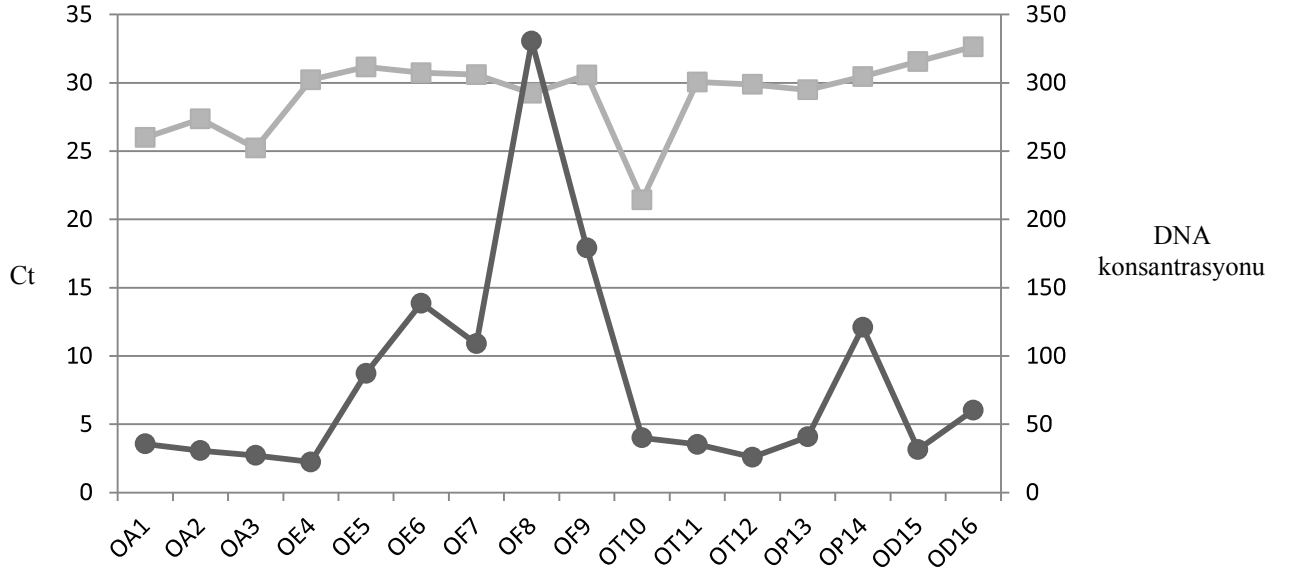
Selölolitik bakterilerin dinamikleri, özellikle de konsantrat değişimlerinde, diyet değişikliklerine verilen yanıt ile iyi ilişki içerisinde (Mosoni ve ark., 2007). Üstelik, mikroorganizma ile birlikte rumen pH, substratların doğası, sıcaklık gibi çevresel faktörler ve katyonların ve çözünebilir karbonhidratların varlığı, bakteriyel bağlanmayı etkileyen faktörler olarak öne sürülmüştür (Miron ve ark., 2001). Ruminant pH bu faktörlerin en önemlilerinden biridir, çünkü selölolitik bakteri sayıları pH değişimine çok duyarlıdır (Sung ve ark., 2006). Ruminantlar lif bakımından yetersiz rasyonlar ile beslendiğinde, rumen pH azalır, mikrobik ekoloji değiştirilir ve hayvanlar metabolik bozukluklara daha duyarlı hale gelir (Russell ve Rychlik, 2001).

Koyun örneklerine DNA yoğunluğu ile Ct değeri arasındaki ilişki şekil 4.23-4.26'da gösterilmiştir.



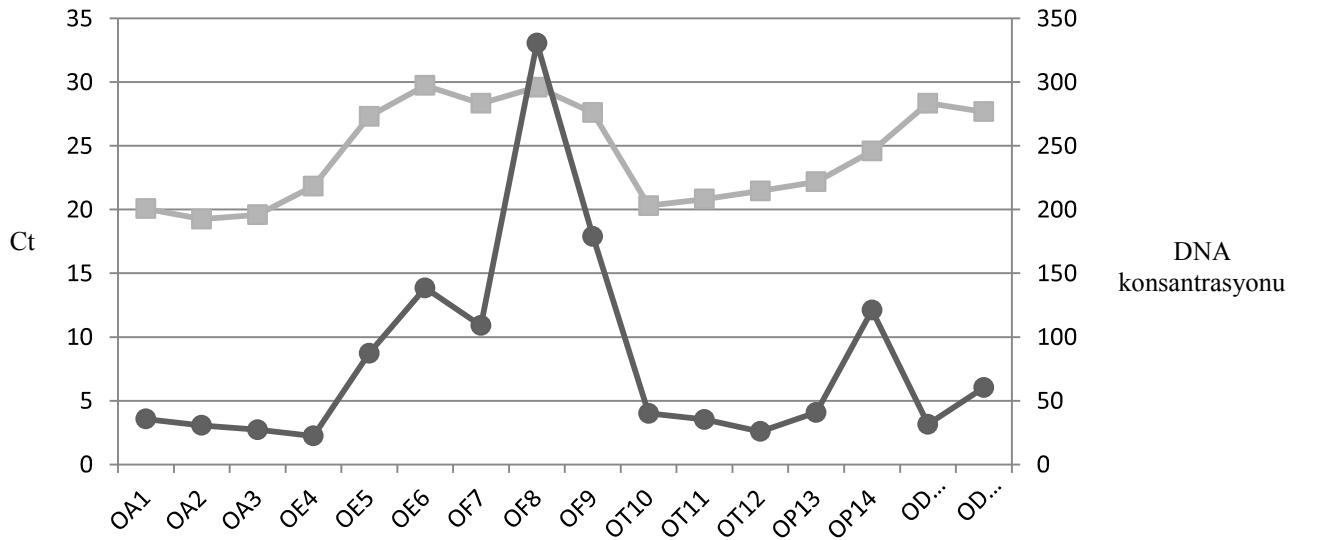
Şekil 4.23. Koyun örneklerinde *Neocallimastix* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

Koyunlarda OE5, OE6, OF7, OF8 örnekleri DNA konsantrasyonu yüksek olan ve buna paralel olarak *Neocallimastix* miktarıda yüksek olan örnekler olmuşlardır. Bu örnekler birbirine komşu iki ilçe olan Afşin ve Elbistandan temin edilmiştir. Meraların ve yemlerin benzer olmasının Ct değerlerindeki bu yakınlığı sağlamış olabileceğini düşündürmektedir. Konsantrasyonu en yüksek olan OF8 örneği kendinden çok daha düşük olan örneklerle benzer Ct değeri göstermiştir. Bunun nedenini birçok mikroorganizma DNA'sını bulundurması olarak düşünebiliriz.



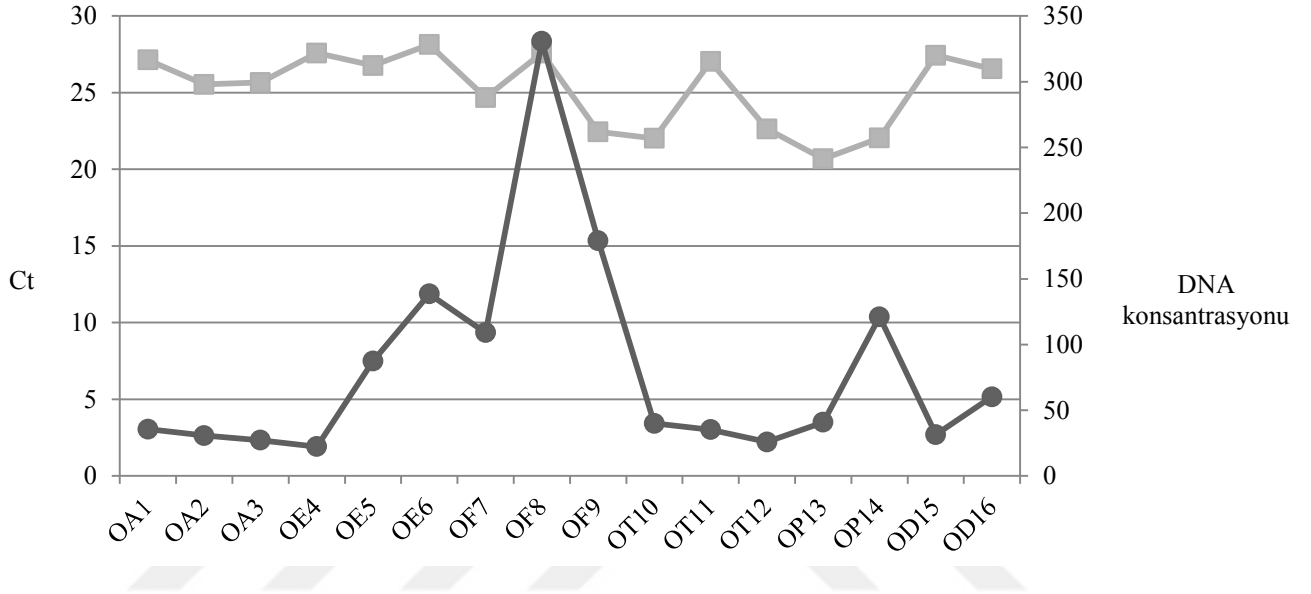
Şekil. 4.24. Koyun örneklerinde *Orpinomyces* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

OT10 örneği DNA konsantrasyonu düşük olmasına karşın Ct değeri ile örnekler arasında en yoğun miktarda *Orpinomyces* bulunduğunu göstermiştir. Andırın ilçesinden alınan OA1, OA2, OA3 örnekleri hem DNA konsantrasyonu hemde Ct değeri bakımından benzerlik göstermişlerdir. OF8 örneği ise çok yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olmasına rağmen bu konsantrasyonun içinde *Orpinomyces* düşük miktarda kalmıştır.



Şekil. 4.25. Koyun örneklerinde *Ruminococcus albus* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

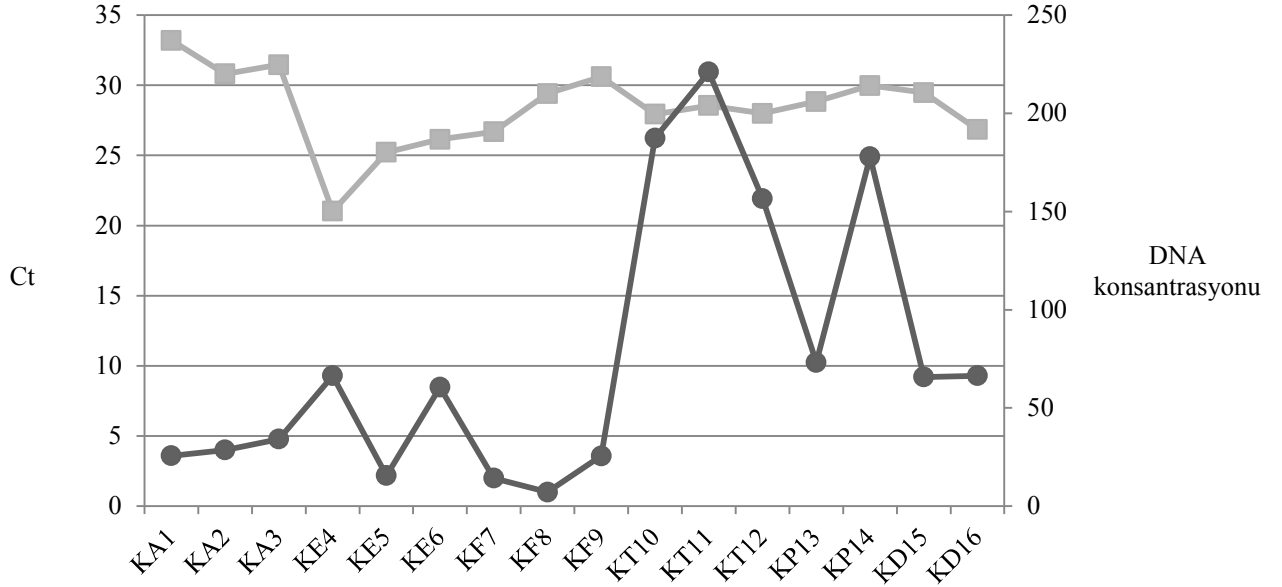
OA1, OA2, OA3 numaralı koyun örnekleri *Ruminococcus albus*'u en çok ihtiva eden örnekler olmuştur. Hayvanlar merada aynı tip yemleri yedikleri için bu örnekler muhtemelen benzer DNA konsantrasyonu ve Ct değerleri göstermiştir. En yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olan OF8 örneği ise çok düşük bir değer göstermiştir. Bu değer hedef mikroorganizma dışındaki organizmaların bu örnekte yoğun bulunduğunu göstermiştir.



4.26. Koyun örneklerinde *F.succinogenes* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■ : Ct değeri)

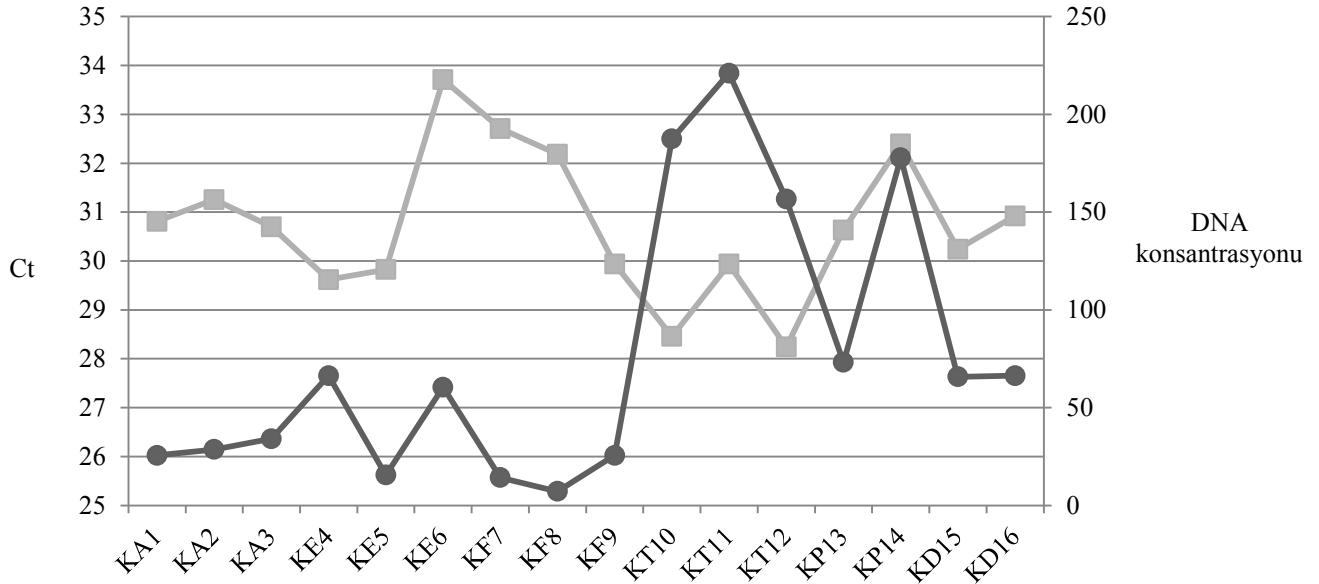
OP13 örneği koyunlarda *F.succinogenes* yoğunluğu en yüksek örnek olarak öne çıkmıştır. OA2 ve OA3 örnekleri DNA konsantrasyonu ve Ct değerleri açısından benzerlik göstermiştir. Afşin ilçesinden alınan OF8 örneği yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olmasına rağmen hedef mikroorganizma yoğunluğu düşük olarak belirlenmiştir.

Keçi örneklerinde DNA yoğunluğu ile Ct değeri arasındaki ilişki Şekil 4.27-4.30'da gösterilmiştir.



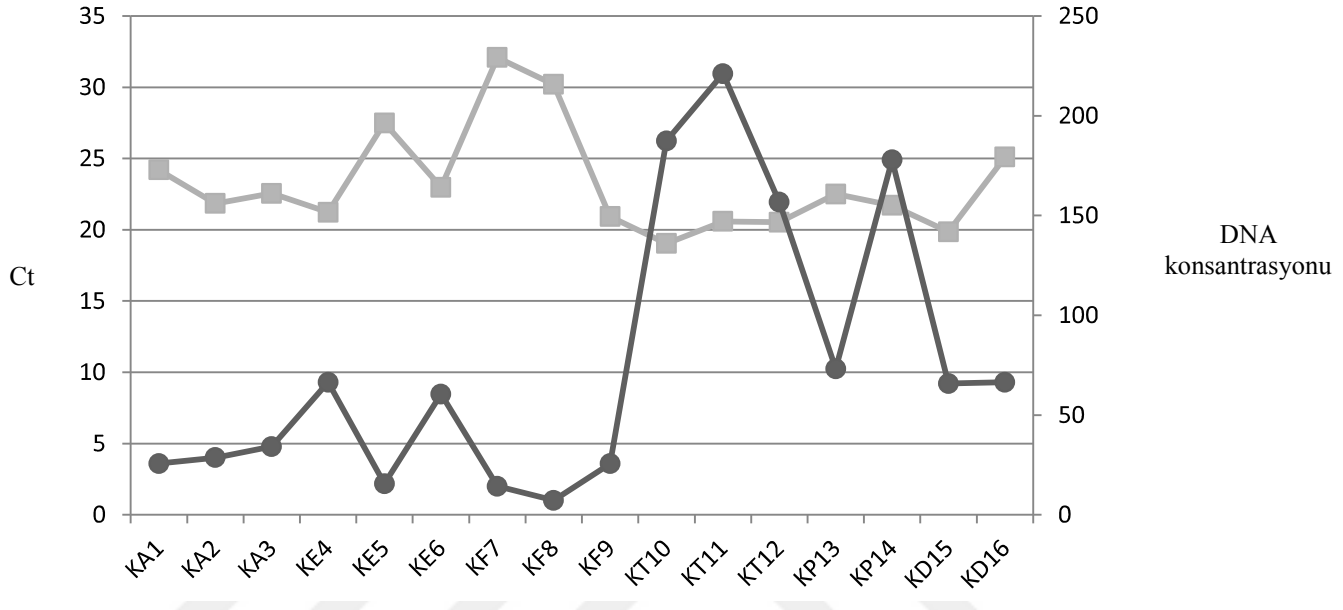
Şekil. 4.27. Keçi örneklerinde *Neocallimastix* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

KE4 örneğinin hedef mikroorganizmayı en yüksek miktarda ihtiva ettiği belirlenmiştir. KT11 ve KP14 örnekleri DNA konsantrasyonu yüksek olmasına rağmen bu değerler Ct değerine yansımamıştır. Düşük DNA konsantrasyonuna sahip olan KA1, KA2, KA3 ve KF9 örnekleri bununla paralel Ct sonuçları göstermiştir.



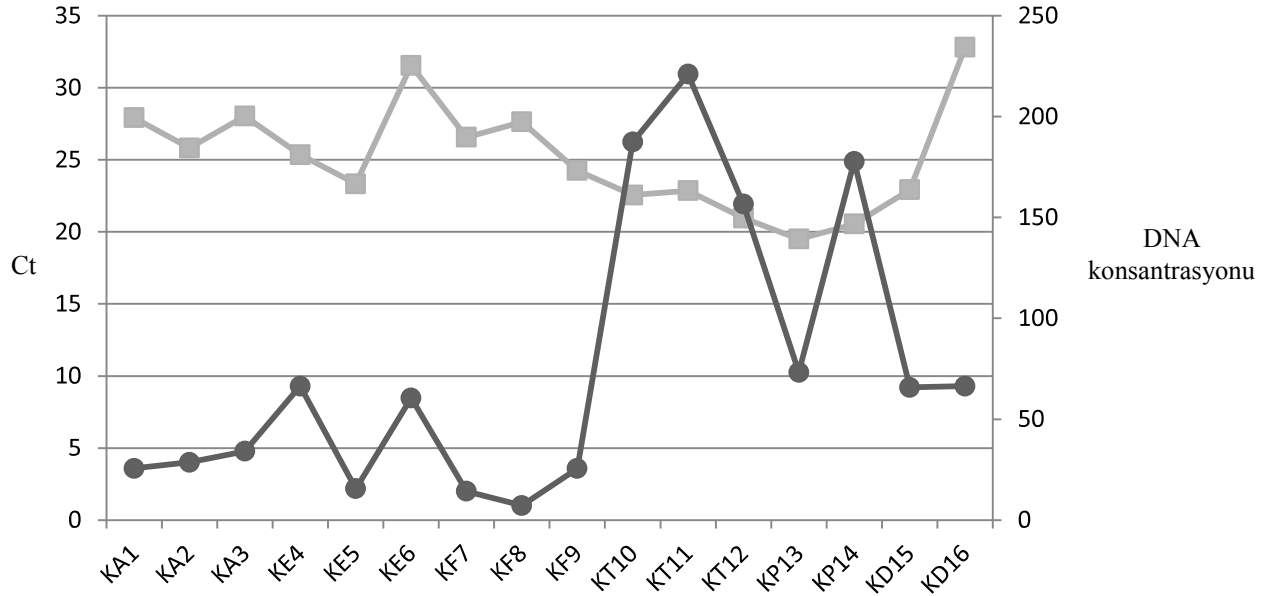
Şekil. 4.28. Keçi örneklerinde *Orpinomyces* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

Keçi örneklerinde *Orpinomyces* yoğunluğu düşük seviyeler de kalmıştır. Yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olan KT10 ve KT12 örneklerinin DNA yoğunluklarıyla orantılı olarak diğer örneklerle kıyasla daha fazla *Orpinomyces* içerdiği belirlenmiştir. Andırın, Türkoğlu ve Dulkadiroğlu ilçesinden alınan örnekler DNA konsantrasyonu ve Ct değerleri bakımından birbirlerine benzerlik göstermişlerdir.



Şekil. 4.29. Keçi örneklerinde *Ruminococcus albus* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

Türkoğlu ilçesinden alınan KT10, KT11 ve KT12 örnekleri *Ruminococcus albus* bulundurma yönünden en zengin örneklerdir. Bu örnekler yüksek DNA konsantrasyonuna sahiptir. KD15 örneğinde ise düşük DNA konsantrasyonuna rağmen hedef mikroorganizmayı yoğun miktarda barındırdığı belirlenmiştir. Afşinden alınan KF7 ve KF8 örnekleri çok düşük DNA konsantrasyonuna sahiplerdir aynı zamanda *Ruminococcus albus* ihtiva etme açısından da oldukça fakirdirler. *Ruminococcus albus* bakımından ilçelerden alınan örnekler kendi içlerinde birbirine benzer değerler vermişlerdir.



Şekil. 4.30. Keçi örneklerinde *Fibrobacter succinogenes* DNA yoğunluğu ile Ct değeri grafiği (● : DNA konsantrasyonu, ■: Ct değeri)

En yüksek beşinci DNA konsantrasyonuna sahip olan KP13 örneği en yoğun miktarda *Fibrobacter succinogenes* bulunduran keçi örneği olmuştur. Andırın ilçesi diğer mikroorganizma ve hayvanlarda olduğu gibi birbirine yakın değerler vermiştir bu durumun yaylımda olan hayvanların benzer yemlerle beslenmesinden kaynaklandığı öngörülmektedir. KD15 ve KD16 örnekleri aynı yerden alınmış ve aynı DNA konsantrasyonuna sahip olmalarına karşın Ct değeri açısından çok farklı sonuç vermişlerdir.

4.4. Multiplex Real Time PZR Sonuçları

Multiplex Real Time PZR farklı floresan özellik taşıyan birden fazla prob ve bu problemlerin bağlandığı bölgeyi amplifiye edecek primer çiftleri kullanılarak hedeflenen DNA ya da DNA'ları eş zamanlı kalitatif ve kantitatif olarak belirleyebilen uygulamadır. Multiplex Real Time PZR ile birçok mikroorganizma ya da hedeflenen nükleik asit bölgeleri belirlenmiştir (Hartman ve ark., 2009; Singh ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Garrido ve ark., 2013; Alves ve ark., 2016).

Bu teknoloji ile hedeflenen birden fazla ampikonun kalitatif ve kantitatif olarak karakterizasyonunun yapılması, hızı, doğruluğu gibi üstünlüklerinin yanı sıra bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Bu sınırlamalardan en önemlisi kullanılan floresan

moleküllerin dalga boyu aralıklarıdır. Bir floresan molekül uyarılma ve yayılma olarak iki farklı dalga boyu aralığına sahiptir (Shipley, 2007; Navarro ve ark., 2015). Multipleks Real Time PZR analizlerinde floresan moleküllere ait dalga boylarının birbirleri ile örtüşmemesi gerekmektedir. Real Time PZR belirleme tekniklerinde problemlerin 5' ve 3' ucunda bulunan muhbir ve söndürücü floresan moleküllerin her ikisi de belirli dalga boyu aralıkları ile ışığa yayma özelliğine sahiptir. Belirleme teknolojisindeki gelişmeler ile söndürücü molekülün floresan özellik taşımayan nitelikte geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısı ile muhbir floresan molekül için daha geniş bir dalga boyu aralığı imkanı oluşmuştur (Mackay, 2004). Bu çalışmada ise Taqman problemleri için FAM (495 nm- 520 nm), HEX (535 nm -556 nm), Texas RED (597 nm -616 nm) ve Cy5 (646 nm -669 nm) olarak 4 farklı muhbir floresan molekül kullanılmıştır. Söndürücü molekül olarak ise floresan ışığa yaymayan BHQ1 (480 nm-580 nm), BHQ2 (558 nm -670 nm) ve BHQ3 (670 nm -730 nm) molekülleri kullanılmıştır. Multipleks Real Time PZR'ın diğer bir sınırlaması ise Real Time PZR cihazının bir özelliği olan farklı sayıdaki kanal sayısına sahip olmasıdır. Farklı floresan molekülün ışınları farklı kanallar aracılığı ile floresan algılama sistemine iletilmektedir (Navarro ve ark., 2015). Analiz sırasında her bir kanal sadece bir floresan molekülün (bir probun) ışınlarını iletmektedir. Bu nedenle kanal sayıları Multipleks Real Time PZR uygulamaları için hedef bölge sayılarını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada farklı sayıda mikroorganizmayı kalitatif ve kantitatif olarak tek bir amplifikasyonda tanımlayabilmek için yeni Multipleks Real Time PZR stratejileri geliştirilmiştir. Her bir Multipleks Real Time PZR gruplarına özel hedef organizmaların en uygun PZR koşullarını belirleyebilmek için alternatif Real Time PZR amplifikasyon protokolleri denenmiştir.

Multipleks Real Time PZR gruplarına özgü en uygun PZR koşulları belirlenmiştir. Multipleks Real Time PZR analizleri 3 tekrarlı yapılmış, elde edilen bağımsız Ct değerlerinin ortalamaları alınarak kullanılmıştır (Şekil 4.10-4.12). Rumen mikroorganizmaları için hazırlanan seyreltilmiş DNA standartlarının analizlerinde 10-28 Ct arasındaki değerler elde edilmiştir. Bazı DNA standartlarında işlem başarılı şekilde gerçekleşmemiş ve Ct değerine denk gelen amplifikasyon döngüleri elde edilememiştir.

Neocallimastix, *Orpinomyces* fungusları ve *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* bakterileri ile bu dört organizmaya ait toplam DNA konsantrasyonları ile Ct değerleri arasındaki ilişkiyi belirleyen kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve regresyon

denklemleri ile korelasyon katsayıları belirlenmiştir. DNA konsantrasyonları ve toplam mikroorganizma sayısı esas alınarak çizilen eğrilerin korelasyon katsayıları Şekil 4.15-4.18’de gösterilmiştir. Bu değerler metodun hassasiyetinin göstermektedir. Metodun dinamik aralığı *Neocallimastix* için 6,7-946,3/μL, *Orpinomyces* için 7,3-841,4ng/μL, *Ruminococcus albus* için 1,7-167 ng/μL ve *Fibrobacter succinogenes* 1,85-256,8ng/μL olarak tespit edilmiştir. DNA konsantrasyonu bazında regresyon denklemleri *Neocallimastix* ($y=34,157-0,0221x$), *Orpinomyces* ($y=31,209-0,0266x$), *Ruminococcus albus* ($y=26,832-0,0537x$) ve *Fibrobacter succinogenes* ($y=-0,0489x+24,799$) rumen mikroorganizmaları için regresyon analizleri ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Sığır örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
SA1	17,62	26,13	18,14	25,27	25,37
SA2	30,5	18,35	26,99	24,89	23,64
SA3	22,18	16,05	30,61	24,74	24,14
SE4	17,31	17,27	26,92	24,73	24,57
SE5	68,25	16,9	27,72	29,32	26,6
SE6	47	18,35	18,32	29,45	24,9
SF7	34,56	26,47	18,26	22,17	21,96
SF8	22,25	29,35	29,76	28,67	25,27
SF9	21,81	26,08	28,56	25,03	27,31
ST10	14,18	29,53	26,06	24,13	22,73
ST11	15,93	27,56	27,43	24,69	24,34
ST12	7,31	11,29	25,44	27,68	23,44
SP13	12,87	12,17	29,48	26,67	31,14
SP14	83,68	17,51	29,03	25,46	28,38
SD15	29,68	19,13	30,07	26,34	25,04
SD16	34,31	27,28	31,34	24,58	23,97

S: Sığır A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar(g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Multiplex PZR işlemi sonucunda 7,31 DNA konsantrasyonuna sahip olan ST12 örneğinde 11,29 Ct değeri ile en yoğun oranda *Neocallimastix* ihtiva eden örnek olmuştur. SA1 örneği *Orpinomyces* problemlerinde 17,62 DNA konsantrasyonu ve 18,14 Ct ile hedef mikroorganizmayı en yüksek oranda bulunduran örnek olmuştur. SF7 örneği 34,56 DNA konsantrasyonuyla ve 22,17 Ct değeri ile sığır örnekleri içinde en fazla *Ruminococcus albus* barındıran örnek olmuştur. *Fibrobacter succinogenes* ise SF7 numaralı örnekte 34,56 DNA yoğunluğunda 21,96 Ct değeri göstererek en çok hedef mikroorganizma bulunan örnek olmuştur.

SF13 örneği *Orpinomyces* problemlerinde yüksek Ct değeri gösterdiği için önemsiz olarak kabul edilebilir. SE5 ve SE6 numaralı Elbistan örnekleri *Ruminococcus albus* için gösterdikleri Ct değeri ile hedef mikroorganizmayı en az bulunduran örnekler olmuşlardır. SP13 örneği *Fibrobacter succinogenes* için 30 üzeri Ct değeri gösterdiği için önemsizdir.

Multiplex RT-PZR amplikasyonunda sığırlarda *Fibrobacter succinogenes* arada çok fark olmasada *Ruminococcus albus*'tan daha yüksek oranda bulunmuştur. Sonucumuzla benzer şekilde Wanapat ve ark., (2009) mandalarda *Fibrobacter succinogenes*'in (109 kopya / ml digesta ve rumen sıvısı) *R. albus*'tan (106 kopya / ml digesta ve rumen sıvısı) daha fazla sayıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızla paralel olarak rumen yoğunluklarının *Fibrobacter succinogenes* için % 0,1 (Stahl ve ark., 1988) ila % 6,6 (Briesacher ve ark., 1992) ve *Ruminococcus spp.* için % 1.3 ila % 2.9 arasında değiştiğini belirtilmiştir (Krause, 1999).

Çizelge 4.11. Koyun örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
OA1	35,62	26,83	25,95	24,30	28,08
OA2	30,68	28,97	26,26	19,56	26,77
OA3	27,18	19,40	27,05	23,36	27,06
OE4	22,31	21,51	28,39	24,38	26,35
OE5	87,31	13,58	28,44	24,1	24,41
OE6	138,56	13,04	28,43	25,99	25,45
OF7	109	15,09	30,83	32,02	27,76
OF8	330,62	15,12	26,71	27,94	24,6
OF9	179	29,78	28,3	27,47	25,17
OT0	40	22,13	26,53	24,22	24,295
OT11	35,25	24,45	28,71	20,01	30,55
OT12	25,87	25,67	25,87	24,1	23,11
OP13	40,81	25,37	26,25	24,45	23,05
OP14	121,06	20,23	26,19	25,08	23,79
OD15	31,50	19,77	28,63	27,49	26,9
OD16	60,25	24,3	27,35	28,29	26,48

S: Sığır A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar(g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Koyunlarda OE5 ve OE6 numaralı Elbistan örnekleri *Neocallimastix* probu ile yapılan işlemlerin ardından en çok *Neocallimastix* barındıran örnekler olmuşlardır. Bu örneklerin alındığı Elbistan ilçesi en fazla *Neocallimastix* barındıran ilçe olmuştur.

Orpinomyces problemleri ile yapılan RT-PZR amplifikasyonunda OT12 numaralı koyun örneği 25,87'lik Ct ile hedef fungusu en yoğun olarak bulunduran örnek olmuştur. Pazarcık örnekleri gösterdikleri Ct değerleri ile en fazla *Orpinomyces* tespit edilen ilçe olmuştur.

OA2 örneği 19,56'lık Ct değeri ile en fazla *Ruminococcus albus* barındıran örnek olmuştur. OF7 örneği 32,02 Ct değeri ile en az hedef mikroorganizmayı en az barındıran örnek olmuştur ve bu değer önemsizdir. Bu örneğin alındığı Afşin ilçesinde en az *Ruminococcus albus* ihtiva eden ilçe olarak belirlenmiştir.

Fibrobacter succinogenes için Pazarcık ilçesinden temin edilen OP13 ve OP14 örnekleri 23,05 ve 23,79 Ct değerleri ile en yoğun miktarda hedef bakteriyi barındıran ilçe olmuştur. OT11 numaralı Türkoğlu örneği 30,55 Ct değeri ile hedef mikroorganizmayı en az barındıran örnek olmuştur.

Çizelge 4.12. Keçi örneklerinde multiplex RT-PZR Ct sonuçları

Örnek kodu	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	(Ct)			
		<i>Neocallimastix</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
KA1	25,62	29,9	30,17	26,31	28,06
KA2	28,62	29,13	28,94	24,04	27,26
KA3	34,12	29,99	30	25,96	31,40
KE4	66,37	16,93	25,50	23,05	24,82
KE5	15,56	24,4	26,09	24,09	24,76
KE6	60,5	23,13	29,67	23,58	27,2
KF7	14,25	23,33	31,01	28,33	27,07
KF8	7,18	31,2	33,65	28,61	28,38
KF9	25,56	28,8	27,12	24,15	25,88
KT10	187,37	25,82	28,53	24,28	25,7
KT11	221,06	26,19	28,13	24,97	24,025
KT12	156,62	26,24	26,48	23,79	21,72
KP13	73,18	25,31	25,91	22,97	22,89
KP14	177,81	27,18	28,05	24,32	22,41
KD15	65,75	26,47	29,72	22,18	24,78
KD16	66,37	28,61	27,38	24,95	31,43

S: Sığır A: Andırın E: Elbistan F: Afşin T: Türkoğlu P: Pazarcık D: Dulkadiroğlu

:DNA aynı miktar(g) dışkı örneğinden izole edilmiştir.

Keçi örneklerinde KE4 numaralı örnek 16,93 Ct değeri ile en çok *Neocallimastix* barındıran örnek olmuştur. KF8 örneği 31,2 Ct değeri göstererek hedef organizmanın en az bulunduğu örnek olmuştur. Elbistan ilçesinden alınan örnekler erken döngülerde ışıma yaparak hedef fungusun en fazla bulunduğu ilçe olmuştur.

KE4 örneği 25,50 Ct ile keçilerde en fazla *Orpinomyces* ihtiva eden örnek olmuştur. KF8 örneği 33,65'lik Ct ile hedef fungusun en az bulunduğu örnek olmuştur. Bu örneğin alındığı Afşin ilçesi de en az *Orpinomyces* barındıran ilçe olmuştur.

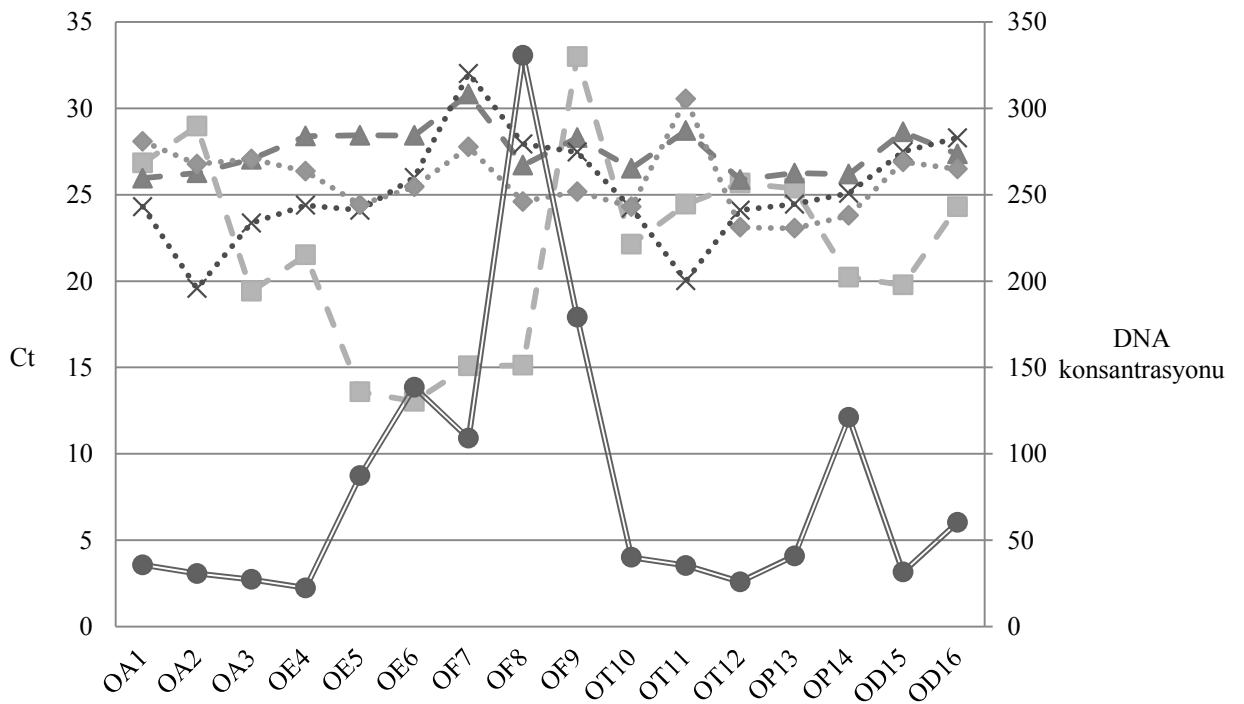
Ruminococcus albus problemleri ile yapılan RT-PZR işleminin ardından KD15 örneği hedef organizmayı en çok barındıran örnek olarak belirlenmiştir. KF8 örneği 28,61'lik Ct değeri ile en az *Ruminococcus albus* bulunan örnek olmuş ve örneğin alındığı Afşin ilçesinde bu mikroorganizmanın en az bulunduğu ilçe olmuştur.

KT12 numaralı örnek 21,72 Ct değeri göstererek en yoğun *Fibrobacter succinogenes* bulunan örnek olmuştur. KA3 ve KD16 örnekleri yüksek Ct değerleri göstererek hedef mikroorganizmayı en az ihtiva eden örnekler olmuştur. Andırın ilçesinde diğer ilçelere oranla daha az miktarda hedef bakterinin bulunduğu belirlenmiştir. Sığır, koyun, keçi örneklerinin DNA ve Ct değerlerini gösteren grafikler Şekil 4.31-4.33'de gösterilmiştir.



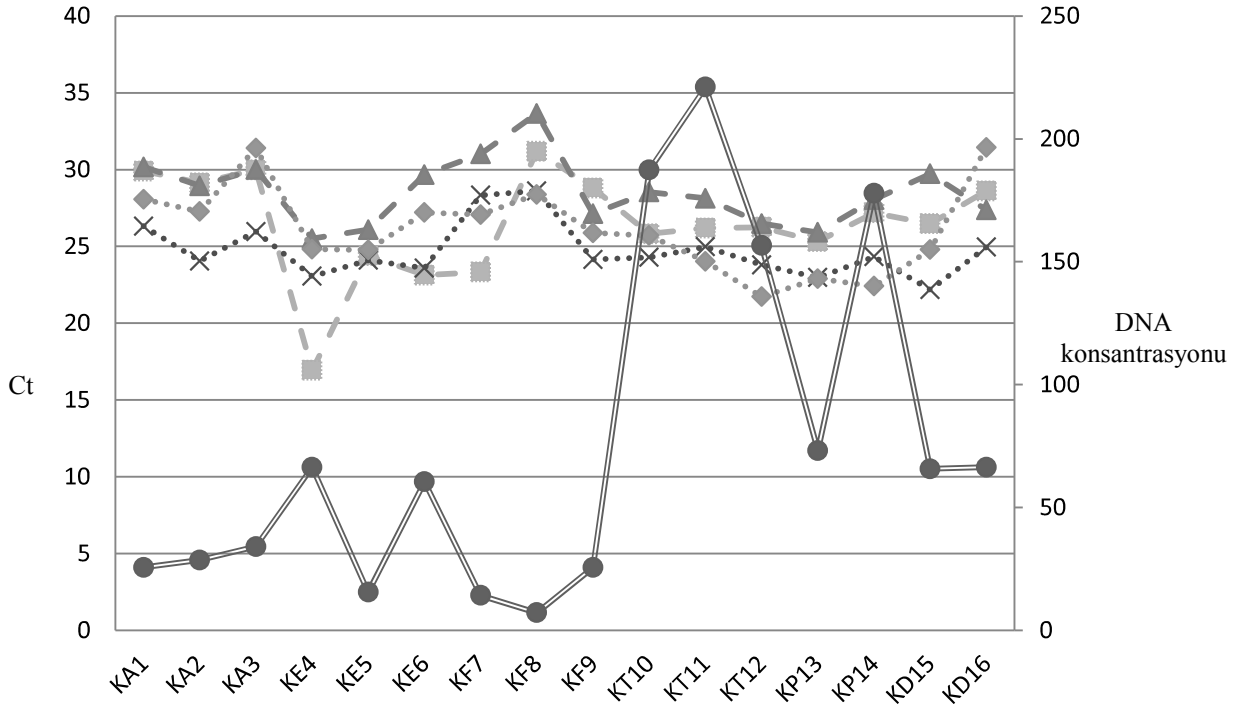
Şekil 4.31. Sığır örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği (●: DNA kons. ■: *Neocallimastix*. ▲: *Orpinomyces*. ×: *R. albus*. ◆: *F. succinogenes*)

Neocallimastix probu multiplex RT-PZR amplifikasyonunda 9 örnekte en erken ışımaları yaparak örneklerde en yoğun şekilde bulunan mikroorganizma olmuştur. *Orpinomyces* probu ise genel olarak geç ışıma yapmış ve amplifikasyonda en az yoğunlukta bulunan organizma olduğunu göstermiştir (Şekil 4.31). SA1 örneğinde *Neocallimastix*, *F. succinogenes* ve *R. albus*, SE4 numaralı sığır örneğinde *R. albus* ile *F. succinogenes* benzer Ct değerleri göstermiştir. DNA konsantrasyonu en fazla olan SP14 örneği hedef mikroorganizmaları barındırma açısından düşük seviyede kalmıştır bu değerler bu örneğin bizim hedeflediğimiz bakteri, fungus, protozoa gibi organizmaları barındırdığını göstermektedir.



Şekil 4.32. Koyun örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği (●: DNA kons. ■: *Neocallimastix*. ▲: *Orpinomyces*. ×: *R. albus*. ◆: *F. succinogenes*).

Koyun örneklerinde (Şekil 4.32) OT12 ve OP13 örnekleri birbirine yakın DNA konsantrasyonuyla paralel olarak tüm mikroorganizmalar birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Sığır örneklerinde olduğu gibi *Neocallimastix* probu genel olarak en erken ışımaları yaparak en çok bulunan hedef mikroorganizma olmuştur. Düşük DNA konsantrasyonuna rağmen OE4 örneği tüm hedef mikroorganizmalar için anlamlı değerler göstermiştir.



Şekil 4.33. Keçi örneklerinde multiplex RT-PZR işlemi sonunda DNA yoğunluğu ve Ct değerleri grafiği (●: DNA kons., ■: *Neocallimastix*, ▲: *Orpinomyces*, ×: *R. albus*, ◆: *F. succinogenes*).

Keçi örnekleri üzerine yapılan çalışmada *Ruminococcus albus* probu genel olarak en erken ışımayı yaparak en çok bulunan hedef mikroorganizma olmuştur (Şekil 4.33). *Orpinomyces* ise keçi örneklerinde en az bulunan mikroorganizma olmuştur. Düşük DNA konsantrasyonlu KF8 örneği fungus barındırma yönünden en düşük değeri göstermiştir. Aynı ilçeden alınan, DNA yoğunlukları yakın olan KA1 ve KA2 örnekleri *Ruminococcus albus* dışında benzer sonuç vermişlerdir. KD15 ve KD16 örnekleri DNA yoğunlukları yakın olmasına ve aynı ilçeden alınmalarına rağmen farklı değerler göstermişlerdir.

4.4.1. Rumen mikroorganizmalarının mikrobiyal popülasyonlarının belirlenmesi

Anaerobik rumen filamentöz funguslar geniş çaplı rizoid sistem oluştururlar. Bir mikroskop kullanarak doğrudan sayımla doğru sayım ve tanımlama, özellikle çevresel numunelerin hem polisentrik hem de tek merkezli türler içerdiği düşünüldüğünde pratik değildir. Bunun yanında yalnız zoosporları veya thallus yapılarını saymak tam olarak doğru değildir, özellikle polisentrik funguslar zoosporlara ek olarak rizomiselyum parçalarından koloniler oluşturabilmektedir (Dehority ve Orpin, 1997). Doğrudan mikroskopi sayımlarına kıyasla sürekli olarak daha yüksek fungus sayıları veren bir MPN

yöntemi geliştirilmiştir (Theodorou ve ark., 1990; Obispo ve Dehority, 1992). Bu yöntemin bir dezavantajı, fungusların sıvı ortamda homojen olmayan bir kültür olarak büyümesi ve bu nedenle doğru şekilde seri olarak seyreltilememesidir (Dehority ve Orpin, 1997). Özellikle, bazı polisentrik fungus izolatları in vitro büyütüldüğü zaman bozunması zor olan kalın bir pelikül yapı oluşturur (Denman ve McSweeney., 2006). Bunun üstesinden gelmek için veriler, mililitrede fungus biyokütlesi veya ham protein açısından sunulur. Bunun geçerli olabilmesi için, çeşitli büyüme aşamalarında hem polisentrik hem de monosentrik anaerobik fungusların temsilcilerinden DNA ve ham protein içeriğinin anlaşılması gerekmektedir. Monosentrik saf kültürler, DNA'nın fungal biyokütle oranında önemli bir farklılık göstermese de, polisentrik izolatlar, daha erken evrelerde daha sonraki aşamalara göre daha yüksek bir DNA içeriğine sahip olmaktadır. Bu *Orpinomyces spp.* büyüme özellikleri ile çakışmaktadır çünkü büyüme ilk aşamalarında, geniş bir polinükleerli rhizomiselyum belirgindir (Breton ve ark., 1989). DNA'daki biyokütle oranındaki düşüş, büyümenin sonraki aşamalarında, herhangi bir büyük nükleer bölünme olmaksızın rizomiselyumun genişlemesinin gerçekleştiğini göstermektedir. Denman ve McSweeney., (2006) sığır rumeninin hem polisentrik hem de monosentrik türlere sahip olduğu belirterek, DNA içeriğini biyokütle ve daha sonra fungal azot veya ham protein değerlerine dönüştürmek için ortalama 13 mg mL^{-1} biyokütle değeri kullanılmıştır. Bu değeri, fungal büyüme aşamaları boyunca ve iki ana form arasında gözlenen farklılıkları sağlamak için aktif büyüme sırasında çeşitli fungus türleri için ortalama DNA içeriği olarak seçmişlerdir. Sadece monosentrik türlerin bulunduğu sistemlerde, daha düşük bir değer c. Biyokütlenin 10 mg mL^{-1} 'i kullanılmalıdır, oysa ağırlıklı olarak polisentrik türlerin yaşadığı ortamlarda, 20 mg mL^{-1} biyokütle yaklaşan daha yüksek bir değere ihtiyaç duyulmaktadır.

Polisentrik ve monosentrik funguslar arasındaki azot değerlerinde anlamlı bir fark bulunmazken, fungal büyümenin çeşitli aşamalarında benzerdir; ortalama %6.5'lik bir değer kullanılmıştır (Denman ve McSweeney, 2006). Bu değer, daha önce sözü edilen %5.9 azotlu anaerobik funguslara benzerdir (Faichney ve ark., 1997). Genel fungus primer setinin, test edilen üç jenerasyon boyunca tüm anaerobik fungal DNA'yı çoğalttığı, ancak aerobik fungal izolatların herhangi birini amplifiye etmediği bulunmuştur. Anaerobik funguslarla en yakın ilişkili takım olan *Spizellomycetales* (Bowman ve ark., 1992) takımında bulunan dört temsilciden hiçbiri, veya test edilen diğer ilgili takım temsilcileri, anaerobik fungal-spesifik primer setini kullanırken bir ampikon üretmemiştir. Aerobik

chytrid fungusları genellikle topraktan bulunur, kültürlenir (Sparrow, 1960) ve özellikle tarım ve bahçecilik uygulamalarına maruz kalan topraklarda yaygındır (Weber ve Webster, 2000). İlk tahminlerde kitinaz kullanılan rumendeki fungus biyokütlesinin, toplam fungus biyokütlesinin yaklaşık %8'ini oluşturduğunu belirtmiştir (Orpin ve Joblin, 1988). Bu analizin büyük miktarda hataya duyarlı olduğu ve yem maddelerinden ve aerobik fungus bulaşmasından etkilenebileceği belirtilmiştir. Çeşitli sayım metotları ile hesaplanan fungus bolluğu genellikle zoosporlar veya TFU' lar olarak 10^3 - 10^7 mL⁻¹ aralığındadır (Theodorou, 1990; Orpin ve Joblin, 1997). Ot diyetiyle beslenen koyunlarda, Faichney ve ark. (1997), fungus katkısını mikrobiyal nitrojenin % 1.1 ila % 3.5'i arasında olacak şekilde hesaplamak için rRNA tabanlı bir tarama metodu kullanmıştır. rRNA miktarını kullanan çalışmalar, hücre büyüme aşamaları boyunca rRNA içeriğindeki değişiklikler nedeniyle hataya açıktır (Raskin ve ark., 1997). Bununla birlikte, rDNA içeriği, çeşitli fungal izolatların büyüme döngüsü üzerinde hedef değerler üzerinde önemli bir değişiklik olmadan daha sabit kalır. rDNA'nın daha sağlam bir hedef olduğu görüşünü destekleyen benzer gözlemler rapor edilmiştir (Blomberg ve ark., 1997; Sylvester ve ark., 2004).

Denman ve McSweeney (2006) fibrolitik bakteriyel türler *Ruminococcus flavefaciens* ve *Fibrobacter succinogenes*'i izlemek için seçilen primer setlerinin, ilgili hedefler için spesifik olduğunu ve test edilen diğer türlerle çapraz reaktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Her iki *F. succinogenes* ve *R. flavefaciens* ürünleri için ayırma eğrisi profillerinin sıkı olduğunu ve bu da yüksek bir özgüllük seviyesi olduğunu düşündürmüştür. Bu sonuçlar *F. succinogenes*'in, rumen içinde yüksek sayılarda mevcut olduğunu ve beslendikten sonra 12 saatte bir maksimum değere ulaştığını göstermektedir. Bu çalışmada, *F. succinogenes*'in *R. flavefaciens*'den 2 log10 daha büyük sayısında mevcut olduğu bildirilmiştir. *R. flavefaciens*'in en yüksek değerinde *F. succinogenes*'in mevcut olduğu en düşük değer saptanmıştır. Karşılaştırmalı kuantifikasyon deneyi, birçok örnek içinde çoklu hedeflerin izlenmesinin ve her bir test ile çoklu standart eğrilerin çalıştırılmasının yasaklayıcı olduğu uygulamalarda kullanılabilir. Aynı zamanda örneklerle göre popülasyon değişikliklerini gösterebilir ve mutlak hücre sayıları sağlayamaz. Anaerobik fungal real-time PZR testinin geliştirilmesi, araştırmacıların, ilk kez, rumen içindeki toplam anaerobik fungal popülasyonları daha hızlı ve doğru bir şekilde izlemelerini sağlar (Denman ve McSweeney., 2006). Gelecekteki çalışmalarda, son

zamanlarda ortaya çıkan imza dizilerinden türe özgü primerler kullanılarak belirli alt popülasyonların izlenmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir (Tuckwell ve ark., 2005).

Ruminal mikrobiyal popülasyonları yönlendirmek için mevcut ilerlemeler hayvan verimliliğini artırmaya yardımcı olmuştur (Cotta ve Russell, 1997; Weimer, 1998). Bu mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerin tam olarak anlaşılması, popülasyonların besin kullanımını daha da iyileştirmek için daha etkili bir şekilde manipüle edilmesinden önce gereklidir (Firkins ve Yu, 2006). Mikrobiyal topluluklardaki değişiklikleri izlemek için kullanılan yetiştirme temelli teknikler, mevcut teknikler ile üretilemeyen mikroorganizmaların çoğunu yetersiz olarak temsil edebilir (Zoetendal ve ark., 2004).

Geleneksel ruminal mikrobiyoloji öncelikle mikroorganizmaların izolasyonu, sayımı ve fenotipik karakterizasyonunu içeren klasik kültüre dayalı tekniklere dayanmaktadır. Bazı tahminlere göre, mevcut rumen mikroorganizmaları hakkındaki bilginin, rumendeki mikrobiyal çeşitliliğin sadece %10 ila 20'sini oluşturmaktadır (Zoetendal ve ark., 2004). Yeni mikroorganizmalar, kültür ve moleküler temelli tekniklerin bir kombinasyonu kullanılarak rumenden izole edilebilir ve karakterize edilebilir (Lee ve ark., 2002; Mackie ve ark., 2003). Henüz keşfedilmemiş olan rumende önemli bir rolü olan başka cins ve türler olabilir. Birçok rumen bakterisi plaka yüzeylerinde iyi gelişmez ve *Ruminococcus albus* için fenil asetik asit ve fenil propiyonik asit gibi spesifik büyüme gereksinimlerine sahip olabilir (Pegden ve ark., 1998). Dolayısıyla plaka sayımları, canlı hücrelerin sayısı hakkında hatalı sonuçlar verebilir. Örneğin, bakterilerin sıvı ortam içinde büyümesine izin veren muhtemel sayı (MPN) seyreltme yöntemlerinin çoğu, MPN prosedürlerinin de sınırlamalarına rağmen (Stewart ve arkadaşları, 1997), plaka sayımlarından 10-100 kat daha büyüktür (Firkins ve Yu, 2006). Yeni gen tabanlı teknolojiler, rumen gibi kompleks mikrobiyal ekosistemlerde mikrobiyal çeşitliliği incelemek için kullanılmaktadır (Kocherginskaya ve ark., 2001; Koike ve ark., 2003a; Shin ve ark., 2004). DGGE ve gerçek zamanlı PZR (Sylvester ve ark., 2004) gibi SSU rDNA'yı (küçük alt birim ribozomal RNA sentezini kodlayan DNA) hedefleyen kültürden bağımsız teknikler, ilgili mikroorganizmaların doğrudan analizine ve miktarına izin verir. Sayısız çalışma, farklı diyet koşulları altında veya farklı diyetler arasında geçiş sırasında ruminal bakteri popülasyonlarındaki değişiklikleri incelemek için SSU rDNA'yı hedef almıştır (Tajima ve ark., 1999; Tajima ve ark., 2000; Tajima ve ark., 2001; Kocherginskaya ve ark., 2001). Diğer çalışmalar, rumen içindeki partikül ve sıvı ile ilişkili bakterileri veya rumen

(Larue ve ark., 2005) içine yerleştirilmiş in situ torbalarda farklılaşmak için moleküler teknikleri kullanmıştır (Koike ve ark., 2003b). PZR-bazlı teknikler aynı zamanda spesifik bakteri gruplarının gruplandırılmasında ya da farklı ruminant hayvanlarda belirlenmektedir (Ghali ve ark., 2004). Bununla birlikte, çalışmalarda kütüphanelerden gelen klonlanmış sekansların yüksek bir yüzdesi, bilinen herhangi bir türle yakından ilişkili değildir (Firkins ve Yu, 2006). Bilinen izolatlarla göre geri alınan ve karakterize edilen sınırlı sayıdaki diziler nedeniyle, protozoa, bakteri ve arkea arasındaki çeşitlilik ve etkileşimler hakkındaki bilgilerimiz hala sınırlıdır. Belirli primerlerin ve rumenden daha önce kültürlenmemiş bakterilerin yetiştirilmesi için geliştirilmiş yetiştirme tekniklerinin bir kombinasyonunu kullanarak, mikrobiyal toplulukların çeşitliliğinin ve fonksiyonunun daha iyi karakterizasyonu sağlanabilir. Rumendeki protozoal ekoloji, saf kültürlerde yetiştirme ile ilgili zorluklardan dolayı bakterilerden daha az incelenmiştir (Dehority, 2003). Dahası, mevcut morfolojik teknikler, ruminal örneklerde tüm protozoal türlerin doğru tanımlanmasını ve nicelleştirilmesini sağlamamaktadır. Morfolojik özelliklere dayanan, yedi *Entodinium* türünün tek bir türün sadece morfolojik olarak farklı varyantları olduğunu öne sürmüştür (Dehority, 1994). Bu nedenle, morfoloji ve fenotipleri kullanarak mikrobiyal popülasyonlardaki değişikliklerin çalışmaları, genel olarak mikrobiyal topluluk yapısının etkilenip etkilenmediğine dair net bir görüntü vermemektedir. DGGE ve real-time PZR gibi kültürden bağımsız teknikler, protozoal popülasyonlardaki değişiklikleri karakterize etmek için de kullanılabilir. Bu bağlamda, rumen örneklerinde protozoal çeşitliliği incelemek için PZR yöntemlerini ilk olarak kullanmıştır (Karnati ve ark., 2003; Sylvester ve ark., 2005). İlk çalışmada, protozoa- spesifik bir primer (P-SSU-342f) tasarlanmış ve topluluk DNA'sından sadece protozoal 18S rDNA'nın bir fragmanını çoğaltmak için bir eukarya-spesifik primer ile eşleştirilmiştir. PZR amplikonları daha sonra klonlanmış, sekanslanmış ve teşhis için veritabanı sekansları ile karşılaştırılmıştır. Klonlanmış sekansların çoğu *Entodinium* benzeri sekanslarla eşleşirken, klonlar arasında hala büyük bir filogenetik çeşitlilik bulunabilmektedir. Bununla birlikte, aynı yaklaşımı kullanan başka bir çalışmada (Shin ve ark., 2004), 18S rDNA dizileri esasen *Entodinium* ile eşleştirilmiştir. Yüksek tahıl yemleri ile beslenen bazı hayvanların genellikle % 95-99 oranında *Entodinium* olan rumen protozoal popülasyonlarına sahip olabileceği düşünüldüğünde, klon sekanslarının çeşitliliğinin olmaması gerçek durumu yansıtabildiği bildirilmektedir. PZR-DGGE, ayrıca, rumendeki protozoal toplulukları belirlemede

(Regensbogenova ve ark., 2004; Sylvester ve ark., 2005) ve duodenum profillerinde de kullanılmıştır (Sylvester ve ark., 2004). Protozoa-spesifik primerler kullanılarak PZR-DGGE analizi, yoğun DGGE bantlarının eksizyonu, PZR ile yeniden amplifikasyonu ve geri kazanılan ana protozoal türlerin tanımlanması için DNA dizilemesi ile takip edilmiştir. Bu moleküler biyoloji teknikleri, farklı protozoal türlerin hem partikül hem de sıvı ilişkili fazlarda ve farklı diyetlerle beslenen hayvanların rumenindeki farklı yerlerde dağılımının daha doğru bir şekilde incelenmesini sağlayacaktır.

4.5. Prokaryotik ve Protozoal Popülasyonların Kültür Bazlı ve Mikroskopik Yöntemlerle Sayılması

Rumen mikroorganizmalarının sayım işlemleri için 1950'li yıllardan 1980'li yıllara kadar mikrobiyologlar tarafından, rumenden bakteriler yetiştirmek için ekim prosedürleri geliştirmişlerdir (Dehority, 2003). Bu yaklaşım kullanılarak spesifik büyüme faktörleri, ürünler ve diğer önemli bilgi türleri gözden geçirilmiştir. Birçok çapraz besleme ve sinerjik /antagonistik ilişki tanımlanmış olmasına rağmen (Wolin ve ark, 1997), çoğu topluluk ekolojisi örneği standart izolasyon prosedürleri kullanılarak taklit edilememektedir (Tajima ve ark, 1999). Örneğin, başka suşları önlemek için bazı bakteriler tarafından proteinli maddeler üretilir (Chan ve Dehority, 1999; Rychlik ve Russell, 2002). Bu inhibitörler ruminal bakterilerde oldukça yaygın olduğu için, kıtalar arasında farklılıklar olabilir (Cookson ve ark, 2004; Kalmokoff ve ark, 2003; Chen ve ark., 2004), mikrobiyal ekoloji üzerindeki etkileri ve yem bozunması ile mikrobiyal azot döngüsündeki etkisi in vivo olarak belirsizdir. Son on yılda, rumen protozoalarının aksenik kültürü rafine edilmiştir (Dehority, 1998; Nsabimana ve ark, 2003). Yine de, birçok protozoa türü henüz aksenik kültürde başarılı bir şekilde yetiştirilmemiştir. Önceden kültüre alınmamış bakteri ve protozoa türlerinin yetiştirilmesi işlevlerini anlamak için gereklidir aynı zamanda mikrobiyal toplulukları in vivo olarak karakterize edecek moleküler bazlı prosedürler için daha iyi bir temel sağlanmalıdır.

Kültür temelli teknikler kullanılarak, toplam bakteri sayısının beslendikten sonra azaldığı bildirilmiştir (Leedle ve ark, 1982). Azalmanın doğrudan beslenme ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (örneğin yükselen oksijen konsantrasyonları ile ilişkili liziz) (Firkins ve Yu., 2006). Bununla birlikte, yeni alınan besin partiküllerine hızlı bir şekilde yapışarak veya içme suyuyla seyreltilerek sıvıdaki bakteri sayımlarının azalması diğer olası

açıklamalıdır (Fields ve ark., 2000). Sığırlar sabit bir durumu benzetmek için her 2 saatte bir beslendiklerinde, Firkins ve ark, (1987b) yem alımının arttırılmasının, rumen havuzundaki bakterilerin toplam canlı sayımını ve rumende açıkça bozunmuş organik madde gramı başına düşen canlı sayıları arttırdığını belirtmiştir. Bununla birlikte, artan yem alımı, rumen sıvısı ile ilişkili sayıların neredeyse yarısı oranında azalmıştır. Tez çalışmamız da beslenmenin mikroorganizma sayısını etkileyebileceğini göstermiştir. Yazarlar, protozoal sayımların yem alımıyla ilişkili olmadığını, bu nedenle protozoal sindirimin önemli bir faktör olmadığını öne sürmüşlerdir. Sıvı ile seyreltme oranının arttırılması ve sıvı ile geçen küçük partiküllerin sıvı ile ilişkili bakteriler (FAB) ile yıkanması ileri sürülmüştür. Sıvı ile seyreltme oranının arttırılması ve sıvı ile geçen küçük partiküllerin akışkanla ilişkili bakteriler ile yıkanması. Öğütme topakları bakteriler tarafından kolonileşmeyi arttırır (Bowman ve Firkins, 1993), ancak genellikle geçiş oranlarını artırır (Van Soest, 1994). Fibrolitik bakteriler, ayrışma yetenekleri için kritik olan karmaşık yapışma mekanizmalarına sahiptir (Miron ve ark, 2001), böylece parçacık geçiş oranı, PAB (parçacık ile ilişkili bakteriler) popülasyonlarını önemli ölçüde etkileyecektir. Parçacık büyüklüğü ve mikrobiyal ekolojiye geçiş hızı gibi faktörlere ilişkin daha bütünleştirici hedeflere ihtiyaç vardır ve moleküler temelli tekniklerin artan kullanılabilirliği ile kolaylaştırılabilir. Örnekleme alanının, hayvanlar arasında mikrobiyal popülasyonlardaki farklılıkların ve diğer faktörlerin (Martin ve ark., 1999; Kocherginskaya ve ark, 2001; Michalet-Doreau ve ark, 2001; Koike ve ark, 2003a) de gelecekte yapılacak çalışmalarda dikkate alınması gerektiği görülmüştür.

Seçici ortamlara göre bakteri türlerinin veya gruplarının sayımı (Dehority, 2003) çeşitli sınırlamalara sahiptir bu sınırlamalar, canlı fakat kültürlenebilir türlerin bölünmeyen hücreleri (Leedle ve ark, 1982), aslında hücrelerin kümeleri tarafından başlatılan koloni oluşturan ünite hücreleri (Dehority, 2003), Laboratuvar ortamında bazı türlerin yetişememesi ve çoğu zaman göz ardı edilmesi (Wells ve Russell, 1996) ve kültürasyon temelli prosedürler ile istatistiksel varyasyon da dahil olmak üzere dört grupta toplayabiliriz. Birçok yazar toplam doğrudan sayımlar ve toplam canlı bakteri sayısı arasındaki farkın büyük ölçüde numunelerdeki kültürlenemeyen bakterilere atfedildiğini varsaymıştır (Wells ve Russell, 1996; Zoetendal ve ark, 2004).

Tez çalışmamızda da uyguladığımız manuel sayım tekniği bize tam olarak popülasyon sayılarını vermemektedir. Dehority (2003), büyüme aşamasından önce

yeterince uzun süre inkübasyon yapılmayan bazı çalışmalar koloni sayımını belirtmektedir. Krause ve ark, (1999b) selülitik en muhtemel sayı (MPN), polimerik selülozu degrade edemeyen selülodeksrin ayrıştırıcıların mevcudiyeti nedeniyle doğru olarak selülitik popülasyonu fazla tahmin ettiğini ileri sürmüşlerdir. Bazı substratlar arasındaki benzerlikler ve birçok bakterinin birden fazla substratı kullanma yeteneği, kültürasyon temelli yaklaşımları kullanarak bakteriyel popülasyonların kantitatif karakterizasyonunu da engellemektedir. Örneğin, MPN'de hem selüloz hem de ksilanın varlığı, birçok substratın her iki substratı kullanabilmesinden dolayı, bu substratlar ayrı olarak kullanıldığında, fibrolitik popülasyonu daha düşük bir değer alabilir. Son olarak, MPN sayımı, hayvan deneylerinde kullanım için çok daha uygun olmakla birlikte, gerçek sayım yöntemlerinden (Dehority ve ark., 1989) daha az duyarlıdır ve kullanılan MPN istatistiklerinin türüne bağlı olarak bakteriyel popülasyonların nicelleştirilmesinde yanlışlığa yol açabilir (Dehority ve ark., 1989; McBride ve ark., 2003).

Rumende protozoal sayım da problemlidir. Rumenden numune alınması, bazı protozoaların, özellikle de izotrichidlerin, hayvan beslendikten sonra şekerlere karşı kemotaksis nedeniyle bakterilerden daha da zor olmaktadır. Bunu takiben organizmaların, numunelerin alımının daha zor olduğu ventral rumene veya retikuluma (Dehority, 2003) yerleşmesi izler. Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu, daha küçük rumen fistüllerinden dolayı, sığırlarla karşılaştırıldığında tüm rumenden temsili örnekler toplamak çok daha zor olabilecek koyunlarla yapılmıştır.

Ruminant mikropların yetiştirme temelli çalışmaları özellikle mikrobiyal fizyoloji için yararlı bilgiler sağlamıştır. Bununla birlikte, ruminal bakterilerin sadece küçük bir kısmı laboratuvar ortamında yetiştirilebilir (Stewart ve ark., 1997). Tüm ruminal mikropların yetişememesi, çeşitlilik, topluluk yapısı, popülasyon dinamiği ve diyet bileşenlerinin bozulması ve dönüşümü gibi ruminal mikrobiyal toplulukları anlamamızı sınırlandırmıştır. Kültivasyon temelli yaklaşımların bu tür kısıtlamaları, moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanmasıyla, son yirmi yılda ruminal mikrobiyal topluluklar hakkındaki bilgimizi önemli ölçüde geliştirerek kısmen ortadan kaldırılmıştır.

Günümüzde mikrobiyal türleri çok hassas bir şekilde izlemek için qPZR' ye çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Rekabetçi PZR kullanılarak, çeşitli bakteri türlerinin 16S rRNA genleri, rumen örneklerinde ölçülmüştür (Koike ve Kobayashi, 2001). RT-PZR çalışmaları,

çeşitli zamanlarda çeşitli diyetlerle beslenen hayvanlardan bakteriyel popülasyonları tanımlamada kullanılabilmektedir. Bu çalışmalar, çalışmamızla benzer olarak baskın selüloolitik bakteri olarak *F. succinogenes*'i göstermektedir (Kobayashi ve ark., 2008). 16S rRNA genini hedefleyen gerçek zamanlı PZR ayrıca hibridizasyon dezavantajlarının üstesinden gelmiş ve rumen içindeki mikrobiyal popülasyonları izlemek için rumen içeriklerinden ekstrakte edilen nükleik asitler üzerinde başarıyla kullanılmıştır.

Ouwerkerk ve ark. (2002), ise önemli bir laktat ruminal bakteri olan *Megasphaera elsdenii* popülasyonunu saymak için gerçek zamanlı qPZR kullanmışlardır. Bu yöntem, rumende probiyotik olarak yerleştirilmiş *M. elsdenii* 'nin izlenmesi için bir araç olarak kullanılmıştır. Klieve ve ark. (2003) yüksek taneli bir diyetle beslenen sığırların rumeninde *M. elsdenii* YE34 ve *B. fibrisolvens* YE44 popülasyonlarını belirlemek için qPZR uygulamışlardır. *M. elsdenii* takviyesinin, sığırlardan 7 ila 10 gün önce tahılla beslenen sığırların rumeninde laktik asit kullanan bir bakteriyel popülasyon oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçta bize beslenmenin popülasyon üzerine etkisini göstermektedir. Çalışmamızda ise meralardaki yemlere göre hayvanlarda bulunan mikroorganizma popülasyonu farklılık göstermiştir. Bu yaklaşım ve farklı qPZR analizleri kullanılarak diğer rumen bakteriyel popülasyonlarını araştırmak için birçok primer çiftinin yayınlanması, süt ineklerinde asidogenik diyetlerle ilişkili değişiklikler gibi, rumen mikrobiyomu üzerindeki diyet tedavilerinin etkisini değerlendirmek için yararlı bilgiler sağlayabilir (Khafipour ve ark., 2009).

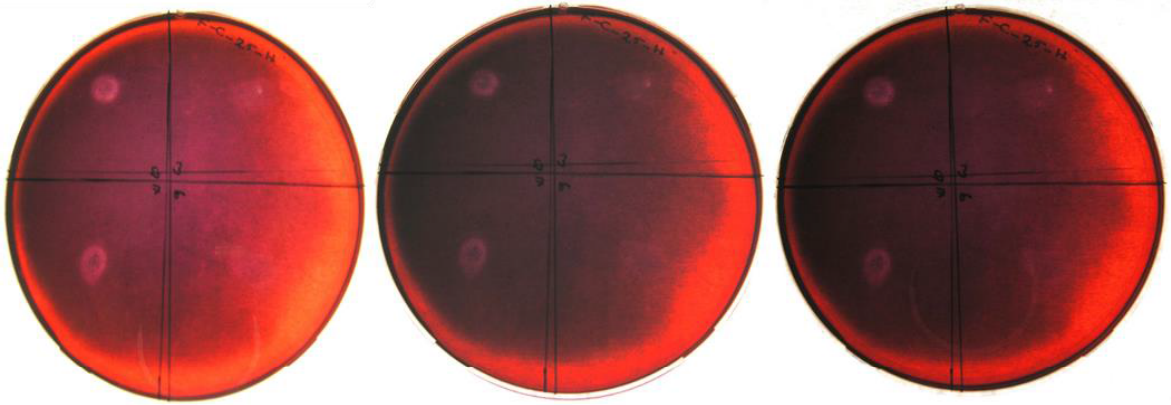
4.6. Anaerobik Fungusların Farklı Substratlarda Enzim Aktivitesinin Araştırılması

Dışkılardan izole edilen ve gelişme oranı yüksek olan fungus örnekleri farklı karbon kaynaklarında geliştirilerek ve tanen içeri diğer karbon kaynaklarına göre fazlan olan artutan, farmaton, kızılçam artutan yem katkı maddelerine bakılarak enzim aktivitesi ve fungal gelişme ne gibi etkileri olduğu incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur. Rumen mikrobiyal popülasyonuna daha doğru bir ifadeyle fungal popülasyona ne gibi etkilerinin olduğunu görmek artutan, farmaton ve kızılçam artutanın beslenme ve zootečni alanında kullanım olanakları ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

Türkoğlu 10 nolu örnekten izole edilen ve tanımlanan *Neocallimastix spp.* farklı oranlardaki artutanlı besiyerinde geliştirilerek, ekzo ve endo enzimler yönünden incelenmiştir. Ön eleme işlemi ksilan ve KMSaz kullanılarak yapılmıştır. Bunun için

petrilere dökülen Substrat örnekleri (CMC ve Ksilan) üzerine damlatılan enzim kaynakları zon çapına bakılarak seçilmiştir (Şekil 4.34,4.35)

Ksilan ve KMSaz (karboksi metil selüloz) substratlarına litrede 5 mg/ml, 2,5 mg/ml 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml konsantrasyonlardaki enerji kaynakları eklenerek enzimlerin aktivitelerine zon çapları ölçülerek bakılmıştır ve en geniş zon çapı verenler enzim assay işlemine tabi tutulmuştur. Artutan ve farmaton ve kızılçam artutan katkı maddeli örnekler 5 mg/ml konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir.



Şekil 4.34. Enzim aktivitesi için KMSaz optimum örneklerin belirlenmesi (5 mg/ml)



Şekil 4.35. Enzim aktivitesi için ksilanaz optimum örneklerin belirlenmesi (5 mg/ml)

Artutan, farmaton ve kızılçam artutan katkı maddeli örneklerin ksilanaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda 45 dk. koşullarında enzim assay yapılmıştır. Tüm katkı maddeleri ile yapılan enzim assay işlemlerinde optimum aktivite değeri 50 °C olarak belirlenmiştir (Çizelge 13-18).

Çizelge 4.13. Artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücre içi toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	6,03 $\pm$ 0,15	65,01 $\pm$ 8,93	0,11 $\pm$ 0,01	10,17 $\pm$ 1,7
5	1,41 $\pm$ 0,08	13,22 $\pm$ 2,28	0,15 $\pm$ 0,04	13,39 $\pm$ 3,93
7	0,60 $\pm$ 0,006	6,95 $\pm$ 0,45	0,21 $\pm$ 0,07	17,95 $\pm$ 5,88
9	0,56 $\pm$ 0,21	5,75 $\pm$ 3,53	0,16 $\pm$ 0,06	14,22 $\pm$ 5,28

Artutan katkı maddesi bulunan besiyerinde gelişen funguslara ksilanaz aktivitesi için yapılan enzim assay sonuçlarına göre hücre dışı enzim aktivitesi 3. günde en yüksek değeri vermiştir ve her geçen gün bu aktivite azalmıştır. Hücre içi enzim aktivitesi ise 7. güne kadar artmış sonrasında ise azalmaya başlamıştır. 3. günden sonra bu aktivite düşüklüğünün nedeni olarak fungusların ölmesi düşünülebilmektedir.

Çizelge 4.14. Farmaton katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücre içi toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	0,36 $\pm$ 0,17	5,59 $\pm$ 2,63	0,31 $\pm$ 0,1	4,02 $\pm$ 1,32
5	2,23 $\pm$ 0,16	35,12 $\pm$ 3,67	0,11 $\pm$ 0,01	15,70 $\pm$ 2,70
7	0,81 $\pm$ 0,22	21,95 $\pm$ 0,88	0,06 $\pm$ 0,01	9,30 $\pm$ 2,64
9	1,16 $\pm$ 0,14	18,43 $\pm$ 2,84	0,006 $\pm$ 0,001	7,68 $\pm$ 0,72

Farmaton katkı maddesi kullanılan ksilanaz enzim çalışmasında ise hücre dışı enzim aktivitesi 5. günde optimum seviyeye ulaşmış ve sonrasında aktivite azalma göstermiştir. Hücre içi enzim aktivitesinde de aynı şekilde 5. günde en yüksek aktivite

değeri gözlenmiş sonraki günlerde aktivitede azalmalar görülmüştür. Farmaton katkılı besiyerinde fungusların gelişimi 5. güne kadar devam ettiği için en yüksek aktiviteyi burda göstermiştir.

Çizelge 4.15. Kızılçam artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	2,25 $\pm$ 0,54	21,45 $\pm$ 6,25	0,13 $\pm$ 0,006	8,95 $\pm$ 1,66
5	1,4 $\pm$ 0,12	9,80 $\pm$ 4,67	0,11 $\pm$ 0,06	6,01 $\pm$ 2,14
7	0,89 $\pm$ 0,22	8,63 $\pm$ 2,45	0,08 $\pm$ 0,02	5,06 $\pm$ 0,12
9	0,29 $\pm$ 0,02	2,87 $\pm$ 0,28	0,07 $\pm$ 0,02	4,06 $\pm$ 1,41

Kızılçam artutan katkı maddesi eklenerek yapılan besiyerinde gelişen funguslar için yapılan ksilanaz hücre dışı enzim aktivitesi işleminde 3. günde en yüksek seviyede belirlenmiş sonrasında ise aktivite azalmaya başlamıştır 9. günde ise en düşük seviyeyi görmüştür. Hücre içi enzim aktivitesinde ise 8,95 ile 3. günde en yüksek aktiviteyi göstermiş ve diğer günlerde azalarak devam etmiştir. Canlı fungusların 3. günden sonra sayılarının azaldığı gözlemlendiği için bu azalmayı canlı fungus sayısı ile ilişkilendirmek mümkün olmuştur.

Çizelge 4.16. Artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücre içi toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	1,62 $\pm$ 0,092	30,38 $\pm$ 7,52	0,04 $\pm$ 0,006	3,45 $\pm$ 0,52
5	1,90 $\pm$ 0,33	28,41 $\pm$ 5,38	0,035 $\pm$ 0,006	3,01 $\pm$ 0,61
7	1,08 $\pm$ 0,35	11,90 $\pm$ 5,46	0,027 $\pm$ 0,002	2,36 $\pm$ 0,23
9	0,68 $\pm$ 0,01	8,50 $\pm$ 0,16	0,020 $\pm$ 0,002	1,71 $\pm$ 0,21

KMSaz aktivitesi için artutan katkı maddeli besiyerinde gelişen fungus enzim aktivitesi için yapılan çalışmanın ardından hücre dışı enzim aktivitesi 3. günde 30,38 ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir 5. günden itibaren aktivite azalmaya başlamıştır. Hücre içi enzim aktivitesi ise 3,45 ile 3. günde en yüksek aktiviteyi göstermiş 9. günde ise 1,71 ile en düşük aktivite belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Farmaton katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücre içi toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	0,68 $\pm$ 0,11	10,73 $\pm$ 1,43	0,028 $\pm$ 0,005	3,75 $\pm$ 0,84
5	3,17 $\pm$ 0,12	49,68 $\pm$ 0,44	0,09 $\pm$ 0,02	11,87 $\pm$ 1,82
7	0,90 $\pm$ 0,05	14,21 $\pm$ 0,39	0,06 $\pm$ 0,01	9,06 $\pm$ 3,53
9	0,89 $\pm$ 0,7	13,49 $\pm$ 0,5	0,034 $\pm$ 0,004	4,70 $\pm$ 0,93

Farmaton katkı maddesi ile yapılan besiyerinde gelişen GMLF36'nın hücre dışı enzim aktivitesi 5. günde 49,68 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Sonrasındaki günlerde

ise aktivite düşmeye başlamıştır. Hücre içi enzim aktivitesinde de 3. günde düşük olan aktivite 5. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır 7. ve 9. günde ise aktivite azalmıştır.

Çizelge 4.18. Kızılçam artutan katkı maddesi bulunan anaerobik besiyerinde geliştirilen fungus enzim aktiviteleri *Neocallimastix* sp. GMLF36'nın hücre dışı ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$) KMSaz aktivitesinin belirlenmesi

Hücre dışı			Hücre içi	
Gün	Toplam aktivite	Spesifik aktivite	Toplam aktivite	Spesifik aktivite
3	0,42 $\pm$ 0,019	7,60 $\pm$ 2,24	0,20 $\pm$ 0,065	11,71 $\pm$ 2,99
5	0,68 $\pm$ 0,03	5,19 $\pm$ 1,7	0,10 $\pm$ 0,04	5,79 $\pm$ 1,63
7	0,20 $\pm$ 0,11	2,08 $\pm$ 1,06	0,096 $\pm$ 0,03	5,66 $\pm$ 1,45
9	0,097 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,44	0,09 $\pm$ 0,02	4,74 $\pm$ 0,8

GMLF 36'nın kızılçam artutan katkı maddesi bulunan besiyerinde gelişmesinin ardından KMSaz hücre dışı enzim aktivitesi 3. günde maksimum seviyeye ulaşmasına karşın sonraki günlerde kademeli olarak azalmıştır. Hücre içi enzim aktivitesi 3. günde 11,71 ile en yüksek değere ulaşmıştır. 5. ve 7. günlerde birbirine yakın aktivite göstermiştir.

Rumen fungal selüloolitik enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları genellikle 40 – 50 °C arasında değişmektedir (Mountfort ve Asher, 1985; Lowe ve ark., 1987c; Borneman ve ark., 1989; Chen ve ark., 1994; Ye ve ark., 2001). Rumen funguslarının selüloolitik enzimlerinin çalıştığı optimum pH değerlerinin 5.9 – 7.5 arasında değiştiği görülmektedir (Mountfort ve Asher, 1985; Lowe ve ark., 1987c; Borneman ve ark., 1989; Barichievich ve Calza, 1990; Chen ve ark., 1994; Ye ve ark., 2001).

N. patriciarum'a ait celA genini taşıyan *S. bovis*'de enzimin büyük çoğunluğu ekstrasellüler iken *E. coli*'de hücresel aktivite yüksek çıkmıştır (Ekinci, 2001). Bu çalışmada ise sadece kızılçam artutan hücresel aktivite yüksek çıkmıştır. Enzim aktivitesinin düşmesi fungus sayısının azalmasıyla yada fungusun enerjisini hazır kaynaktan sağlaması olarak düşünülebilir. Bu çalışmada günlere göre mikroskobik takipte

yapılarak canlı fungus sayısı ile enzim aktivitesi arasında paralellik belirlenmiştir. Dolayısı ile enzim aktivitesi fungus sayısı ile ilişkilendirilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Real-Time PZR optimizasyon aşamasında primer-prob konsantrasyonlarında ve PZR koşullarında modifikasyonlar yapılmıştır. Kalıp DNA'ların yeni dışkı örneklerinden izole edilmiş ve başarılı bir şekilde tanımlanmışlardır. Anaerobik rumen fungus ve bakterilerin referans suşlarının amplifikasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Hedef mikroorganizmaların karakterizasyonunda Taqman belirleme teknoloji kullanılmış ve sonrasında mikroorganizma sayımları yapılmıştır.

Geliştirilen Real Time PZR yöntemlerinde 16 adet sığır, 16 adet koyun ve 16 adet keçi dışkı örnekleri analiz edilmiştir. Analiz edilen sığır örneklerinde en yoğun *Neocallimastix* mikroorganizması belirlenmiştir. *Orpinomyces* daha düşük yoğunlukta belirlenmiştir. Koyun örneklerinde *Neocallimastix* mikroorganizması en yoğun olarak bulunmaktadır. Keçi örneklerinde ise *Fibrobacter succinogenes* mikroorganizması en yüksek sayıda tespit edilmiştir.

Hayvan besleme açısından son yıllarda en fazla üzerinde yoğunlaşılan konulardan birini de rumen mikrobiyal popülasyonunun yapısı ve dinamiği oluşturmaktadır. Bu değerlerin elde edilmesi amacıyla konvensiyonel yöntemlerin yanısıra son yıllarda moleküler teknikler ön plana çıkmaya başlamıştır. Rumen mikrobiyal dinamiğinin belirlenmesine yönelik moleküler yaklaşımlardan AFLP analizi, DGGE analizi gibi metodlar 2000'li yılların başından beri kullanılmasına ve değerli bilgiler vermesine karşın son dönemde uygulama alanı bulan qRT-PZR daha kısa sürede yüksek kalite ve kantitede veri elde etmede avantaj sağlamaktadır. Tez kapsamında farklı bölgelerden farklı rejimlerdeki hayvanların rumen mikrobiyal fauna/florasındaki değişimleri açığa çıkararak mikrobiyal popülasyon ile beslenme arasındaki ilişkileri ile ortaya çıkaracaktır.

Avantajları ve dezavantajları dikkate alındığında beslenmenin rumenin mikrobiyal popülasyonu üzerine etkilerinin moleküler teknikler kullanılarak yüksek hassasiyette açığa çıkarılması üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. Tez bu yönü ile farklı beslenme rejimlerinde rumen mikrobiyal popülasyonunun dinamiğinin aydınlatılması noktasında önemli verilerin elde edilmesine imkan tanıyacaktır. Böylece bu çalışma hayvan beslemeye yönelik olarak güncel moleküler verilerin kullanılması çalışmalarına öncülük edebilecek bir konumda olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- AKIN, D. E., LYON, C. E., WINDHAM, W. R., 1988. Physical Degradation of Lignified tem Tissues by Ruminal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 611-616.
- AKIN, D.E., 1993. Plant Structure and Chemistry – Influence on lignocellulose degradation by rumen protozoa, bacteria, and fungi. In: Genetics, Biochemistry, and Ecology of Lignocellulase Degradation. Shimada, K., Ohmiya, K., Kobayashi, Y., Hoshino, S., Saka, K., Karita, S., Ed., Unipublishers, Tokyo, Japan.
- Akin, D. E., Rigsby, L. L. (1987). Mixed Fungal Populations and Lignocellulosic Tissue Degradation in the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (9).
- Akin, D. E., Borneman, W. S. (1990). Role of Rumen Fungi in Fiber Degradation. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3023-3032.
- Alves, J., Hirooka, E. Y., de Oliveira, T. C. R. M. (2016). Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay With an Internal Amplification Control for the Detection of *Campylobacter* Spp. and *Salmonella* Spp. in Chicken Meat. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 175-181.
- Armstrong, D. G., and Gilbert, H. J. (1985). Biotechnology and the Rumen: a Mini Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(11), 1039-1046.
- Attwood, G. T., Kelly, W. J., Altermann, E. H., and Leahy, S. C. (2008). Analysis of the *Methanobrevibacter Ruminantium* Draft Genome: Understanding Methanogen Biology to Inhibit Their Action in the Rumen. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 83-88.
- Attwood, G. T., Lockington, R. A., Xue, G. P., and Brooker, J. D. (1988). Use of a Unique gene Sequence as a Probe to Enumerate a Strain of *Bacteroides Ruminicola* Introduced into the Rumen. *Applied and environmental microbiology*, 54(2), 534-539.

- Aylward, J. H., Gobius, K. S., Xue, G. P., Simpson, G. D., Dalrymple, B. P. (1999). The Neocallimastix Patriciarum Cellulase, Celd, Contains Three Almost Identical Catalytic Domains With High Specific Activities on Avicel. *Enzyme and microbial technology*, 24(8-9), 609-614.
- .Baldwin, R. L. (1995). *Modeling ruminant digestion and metabolism*. Springer Science Business Media.
- Barr, D. J. (1980). An Outline for the Reclassification of the Chytridiales, and for a New Order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany*, 58(22), 2380-2394.
- Barr, D.J.(1988). How Modern Systematics Relates to the Rumen Fungi. *BioSystems*, 21(3-4), 351-356.
- Barros, M. E., and Thomson, J. A. (1987). Cloning and Expression in Escherichia Coli of a Cellulase Gene From Ruminococcus Flavefaciens. *Journal of bacteriology*, 169(4), 1760-1762.
- Baskin, T. I.(2001). On The Alignment of Cellulose Microfibrils by Cortical Microtubules: A Review and a Model. *Protoplasma*, 215(1-4), 150-171.
- Beecher, M., Buckley, F., Waters, S. M., Boland, T. M., Enriquez-Hidalgo, D., Deighton, M. H., Lewis, E. (2014). Gastrointestinal Tract Size, Total-Tract Digestibility, and Rumen Microflora in Different Dairy Cow Genotypes. *Journal of dairy science*, 97(6), 3906-3917.
- Beguin,P.(1990). Molecular Biology of Cellulose Degradation. *Annual Reviews in Microbiology*, 44(1), 219-248.
- Beneduce, L., Fiocco, D., Spano, G. (2007). Development of PCR-Based Molecular Tools for the Detection of Emerging Food-Ad Water-Borne Pathogenic Bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 569-576.
- Berg B (2014) Decomposer Organisms. In: Berg B, Mc Claugherty C (eds) Plant Litter-Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration, 3rd edn. Springer, Heidelberg, pp 35–52.

- Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F., Gouet, P. (1992). Degradation and Fermentation of Cellulose by the Rumen Anaerobic Fungi in Axenic Cultures or in Association With Cellulolytic Bacteria. *Current Microbiology*, 25(3), 143-148.
- Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F., Gouet, P. (1993). Inhibition of the Cellulolytic Activity of *Neocallimastix Frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *Microbiology*, 139(4), 873-880.
- Bhatti, M. B., & Khan, S. (1996, March). Fodder production in Pakistan. In *Proceedings of National Conference on the Improvement, Production and Utilization of Fodder Crops in Pakistan* (p. 230).
- Blomberg, P., Randolph, C., Yao, C. H., Yao, M. C. (1997). Regulatory Sequences for the Amplification and Replication of the Ribosomal DNA Minichromosome in *Tetrahymena Thermophila*. *Molecular and cellular biology*, 17(12), 7237-7247.
- Bootten, T. J., Joblin, K. N., Mcardle, B. H., Harris, P. J. (2011). Degradation of Lignified Secondary Cell Walls of Lucerne (*Medicago Sativa* L.) By Rumen Fungi Growing In Methanogenic Co-Culture. *Journal of applied microbiology*, 111(5), 1086-1096.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. (1989). Fermentation Products and Plant Cell Wall-Degrading Enzymes Produced by Monocentric and Polycentric Anaerobic Ruminant Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1066-1073.
- Borneman WS, Hartley RD, Morrison WH, Akin DE, Ljungdahl LG (1990). Feruloyl and P-Coumaroyl Esterase From Anaerobic Fungi in Relation to Plant Cell Wall Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3):345–351.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., VanEseltine, W. P. (1986). Effect of Phenolic Monomers on Ruminant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), 1331-1339.
- Bowman, B. H., Taylor, J. W., Brownlee, A. G., Lee, J., Lu, S. D., White, T. J. (1992). Molecular Evolution of the Fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution*, 9(2), 285-296.

- Bowman, J.G.P. and Firkins, J. L. (1993). Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. *Journal of animal science*, 71(6), 1623-1633.
- Braune, R.(1913). *Untersuchungen über die im Wiederkauermagen vorkommenden Protozoen*. Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin..
- Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., and Gouet, P. (1989). Morphological and Metabolic Characterization of a new Species of Strictly Anaerobic Rumen Fungus: *Neocallimastix Joyonii*. *FEMS microbiology letters*, 58(2-3), 309-314.
- Briesacher, S. L., May, T., Grigsby, K. N., Kerley, M. S., Anthony, R. V. and Paterson, J. A., (1992). Use of DNA Probe to Monitor Nutritional Effects on Ruminant 'ruminants' and *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Anim. Sci.*, **70**, 289–295.
- Brookman, J. L., Mennim, G., Trinci, A. P. J., Theodorou, M. K., and Tuckwell, D. S. (2000). Identification and Characterization of Anaerobic gut Fungi using Molecular Methodologies based on Ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology*, 146(2), 393-403.
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., and Griffith, G. W. (2015). *Buichfawromyces Eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new Anaerobic Fungus (Neocallimastigomycota) Isolated from Buffalo faeces. *MycoKeys*, 9, 11.
- CATO, E. P., and SALMON, C. W. (1976). Transfer of *Bacteroides Clostridiiformis* Subsp. *Clostridiiformis* (Burri and Ankersmit) Holdeman and Moore and *Bacteroides Clostridiiformis* subsp. *girans* (Prévot) Holdeman and Moore to the Genus *Clostridium* as *Clostridium Clostridiiforme* (Burri and Ankersmit) comb. nov.: Emendation of Description and Designation of Neotype Strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 205-211.
- Chan, W. W. & B. A. Dehority (1999). Production of *Ruminococcus Flavefaciens* Growth Inhibitor(s) by *Ruminococcus albus*. *Animal Feed Science and Technology*, 77, 61-71.

- Chen, H., Li, X. L., and Ljungdahl, L. G. (1997). Sequencing of a 1, 3-1, 4-beta-D-glucanase (lichenase) from the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* Strain PC-2: Properties of the Enzyme Expressed in *Escherichia Coli* and Evidence that the gene has a Bacterial Origin. *Journal of bacteriology*, 179(19), 6028-6034.
- Chen, H. U. I. Z. H. O. N. G., Li, X. I. N. L. I. A. N. G., and Ljungdahl, L. G. (1994). Isolation and Properties of an Extracellular beta-glucosidase from the Polycentric Rumen Fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Applied and environmental microbiology*, 60(1), 64-70.
- Chen, J., and Weimer, P. J. (2001). Competition Among Three Predominant Ruminal Cellulolytic Bacteria in the Absence or Presence of Non-Cellulolytic Bacteria. *Microbiology*, 147(1), 21-30.
- Chen, J., Stevenson, D. M., and Weimer, P. J. (2004). Albusin B, a Bacteriocin From The Ruminal Bacterium *Ruminococcus Albus* 7 That Inhibits Growth of *Ruminococcus Flavefaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 3167-3170.
- Cheng, Y. F., Edwards, J. E., Allison, G. G., Zhu, W. Y., and Theodorou, M. K. (2009). Diversity And Activity of Enriched Ruminal Cultures of Anaerobic Fungi and Methanogens Grown Together on Lignocellulose in Consecutive Batch Culture. *Bioresource technology*, 100(20), 4821-4828.
- Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H., and Costerton, J. W. (1991). Microbial Ecology And Physiology of Feed Degradation Within the Rumen. In *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants* (pp. 595-624).
- Chesson, A., and Forsberg, C. W. (1997). Polysaccharide Degradation by Rumen Microorganisms. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 329-381). Springer, Dordrecht.
- Chon, J. W., Park, J. S., Hyeon, J. Y., Park, C., Song, K. Y., Hong, K. W., Hwang, I. G., Kwak, H. S., Seo, K. H. 2012. Development Of Real-Time PCR for the Detection of 145 *Clostridium Perfringens* in Meats and Vegetables. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (4): 530-534.

- Church, D. C. (1975). Digestive physiology and nutrition of ruminants. Volume 1. Digestive physiology. *Digestive physiology and nutrition of ruminants. Volume 1. Digestive physiology.*, (Ed. 2).
- COLBERG, P. J.(1988). Anaerobic Microbial Degradation of Cellulose, Lignin, Oligolignols, and Monoaromatic Lignin Derivatives. *Biology of anaerobic microorganisms*, 333-372.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., ... & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic acids research*, 31(1), 442-443.
- Coleman, G. S. (1985). The Cellulase Content of 15 Species of Entodiniomorphid Protozoa, Mixed Bacteria and Plant Debris Isolated From The Ovine Rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 104(2), 349-360.
- Coleman, G. S. (1986). The Metabolism of Rumen Ciliate Protozoa. *FEMS microbiology letters*, 39(4), 321-344.
- Cookson, A. L., Noel, S. J., Kelly, W. J., and Attwood, G. T. (2004). The use of PCR for the Identification and Characterisation of Bacteriocin Genes From Bacterial Strains Isolated From Rumen or Caecal Contents of Cattle and Sheep. *FEMS microbiology ecology*, 48(2), 199-207.
- Cotta, M. A., and Russell, J. B. (1997). Digestion of Nitrogen in the Rumen: A Model for Metabolism of Nitrogen Compounds in Gastrointestinal Environments. In *Gastrointestinal microbiology*(pp. 380-423). Springer, Boston, MA.
- Cullen, D.,and Kersten,P.(1992). Fungal Enzymes for Lignocellulose Degradation. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, 100-131.
- Czerkawski, J. W., and Cheng, K. J. (1988). Compartmentation in the Rumen. *Rumen microbial ecosystem/edited by PN Hobson*.
- Dagar, S. S., Kumar, S., Griffith, G. W., Edwards, J. E., Callaghan, T. M., Singh, R., ... and Puniya, A. K. (2015). A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal biology*, 119(8), 731-737.

- Dagar, S. S., Kumar, S., Mudgil, P., Singh, R., and Puniya, A. K. (2011). D1/D2 Domain of Large-subunit Ribosomal DNA for Differentiation of *Orpinomyces* spp. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6722-6725.
- Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities and Perspectives. *International journal of biological sciences*, 5(6), 578.
- Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I., & Trinci, A. P. (1993). Distribution of Anaerobic Fungi in the Digestive Tract of Cattle and Their Survival in faeces. *Microbiology*, 139(6), 1395-1400.
- Dehority, B. A., and Tirabasso, P. A. (2000). Antibiosis Between Ruminant Bacteria and Ruminant fungi. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 2921-2927.
- Dehority, B. A., and Orpin, C. G. (1997). Development of, and Natural Fluctuations in, Rumen Microbial Populations. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 196-245). Springer, Dordrecht.
- Dehority, B. A., and Tirabasso, P. A. (2001). Effect of Feeding Frequency on Bacterial and Fungal Concentrations, pH, and other Parameters in the Rumen. *Journal of animal science*, 79(11), 2908-2912.
- Dehority, B. A., Tirabasso, P. A., and Grifo, A. P. (1989). Most-probable-number Procedures for Enumerating Ruminant Bacteria, Including the Simultaneous Estimation of total and Cellulolytic Numbers in one Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2789-2792.
- Denman, S. E., and McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for Monitoring Anaerobic Fungal and Cellulolytic Bacterial Populations within the Rumen. *FEMS microbiology ecology*, 58(3), 572-582.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., and Hebraud, M. (2006). Protein cell Surface Display in Gram-positive Bacteria: from Single Protein to Macromolecular Protein Structure. *FEMS microbiology letters*, 256(1), 1-15.
- Dogiel, V. (1928). La Faune d'infusoires Habitant l'estomac du buffle et du Dromadaire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 6(3), 323-338.

- Edwards, J. E., Kingston-Smith, A. H., Jimenez, H. R., Huws, S. A., Skøt, K. P., Griffith, G. W., ... and Theodorou, M. K.(2008). Dynamics of Initial Colonization of Nonconserved Perennial Ryegrass by Anaerobic Fungi in the Bovine Rumen. *FEMS microbiology ecology*, 66(3), 537-545.
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J., and Wallace, R. J.(2004). 16S rDNA Library-Based Analysis of Ruminal Bacterial Diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86(3), 263-281.
- EKİNCİ, M. S.(2001). Expression of a Fungal Cellulase Gene By\Beta-Glucanase Promoter of Streptococcus Bovis. *Turkish Journal of Biology*, 25(1), 37-44.
- Eloff, A. K., and Van Hoven, W.(1980). Intestinal Protozoa of the African Elephant *Loxodonta Africana* (Blumenbach). *African Zoology*, 15(2), 83-90.
- Faichney, G. J., Poncet, C., Lassalas, B., Jouany, J. P., Millet, L., Doré, J., and Brownlee, A. G.(1997). Effect of Concentrates in a Hay Diet on the Contribution of Anaerobic Fungi, Protozoa and Bacteria to Nitrogen in Rumen and Duodenal Digesta in Sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 64(2-4), 193-213.
- Felix, C. R., and Ljungdahl, L. G.(1993). The Cellulosome: The Exocellular Organelle of Clostridium. *Annual Reviews in Microbiology*, 47(1), 791-819.
- Ferry, J. G., and Kastead, K. A.(2007). Methanogenesis. In *Archaea* (pp. 288-314). American Society of Microbiology.
- Fields, M. W., Mallik, S., and Russell, J. B.(2000). Fibrobacter Succinogenes S85 Ferments Ball-Milled Cellulose as Fast as Cellobiose Until Cellulose Surface Area is Limiting. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(4), 570-574.
- Firkins, J. L., and Yu, Z. (2006). Characterisation and Quantification of the Microbial Populations in the Rumen. *Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, 19-54.
- Firkins, J. L., Berger, L. L., Merchen, N. R., Fahey, G. C., and Mulvaney, R. L.(1987). Ruminal Nitrogen Metabolism in Steers as Affected by Feed Intake and Dietary Urea Concentration. *Journal of Dairy Science*, 70(11), 2302-2311.

- Fliegerová, K., Mrázek, J., Hoffmann, K., Záborská, J., and Voigt, K. (2010). Diversity of Anaerobic Fungi Within Cow Manure Determined by ITS1 analysis. *Folia microbiologica*, 55(4), 319-325.
- Fliegerová K, Mrázek J, Voigt K (2012) Gut fungi: classification, evolution, life style and application. In: Fungi: types, environmental impact and role in disease, pp 3–19
- Flint, H. J., Bisset, J., and Webb, J.(1989). Use of Antibiotic Resistance Mutations to Track Strains of Obligately Anaerobic Bacteria Introduced Into the Rumen of Sheep. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(2), 177-183.
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., and White, B. A.(2008). Polysaccharide Utilization by gut Bacteria: Potential for New Insights From Genomic Analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121.
- Fontes, C. M., and Gilbert, H. J.(2010). Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annual review of biochemistry*, 79, 655-681.
- Forsberg, C. W., Cheng, K. J., and White, B. A. (1997). Polysaccharide Degradation in the Rumen and Large Intestine. In *Gastrointestinal microbiology* (pp. 319-379). Springer, Boston, MA.
- Forsberg, C. W., Beveridge, T. J., and Hellstrom, A.(1981). Cellulase and Xylanase Release from *Bacteroides Succinogenes* and its Importance in the Rumen Environment. *Applied and environmental microbiology*, 42(5), 886-896.
- France, J., Theodorou, M. K., and Davies, D.(1990). Use of Zoospore Concentrations and Life Cycle Parameters in Determining the Population of Anaerobic Fungi in the Rumen Ecosystem. *Journal of theoretical biology*, 147(3), 413-422.
- Garcia-Vallve, S., Romeu, A., and Palau, J.(2000). Horizontal Gene Transfer of Glycosyl Hydrolases of the Rumen Fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 17(3), 352-361.
- Garrido, A., Chapela, M. J., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M., and Cabado, A. G. (2013). A New Multiplex Real-Time PCR Developed Method for

- Salmonella Spp. and Listeria Monocytogenes Detection in Food and Environmental Samples. *Food Control*, 30(1), 76-85.
- Gaudet, G., and Gaillard, B.(1987). Vesicle Formation and Cellulose Degradation in Bacteroides Succinogenes Cultures: Ultrastructural Aspects. *Archives of microbiology*, 148(2), 150-154.
- Gerbi, C., Bata, J., Breton, A., and Prensier, G.(1996). Glycoside and Polysaccharide Hydrolase Activity of the Rumen Anaerobic Fungus Caecomyces Communis (Sphaeromonas Communis Sensu Orpin) At Early and Final Stages of the Developmental Cycle. *Current microbiology*, 32(5), 256-259.
- Ghali, M. B., Scott, P. T., and Al Jassim, R. A. M. (2004). Characterization of Streptococcus Bovis From the Rumen of the Dromedary Camel and Rusa Deer. *Letters in applied microbiology*, 39(4), 341-346.
- Gong, J., and Forsberg, C. W. (1989). Factors Affecting Adhesion of Fibrobacter Succinogenes Subsp. Succinogenes S85 and Adherence-Defective Mutants to Cellulose. *Applied and environmental microbiology*, 55(12), 3039-3044.
- Grabber, J. H. (2005). How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*, 45(3), 820-831.
- Griffith, G. W., Baker, S., Fliegerova, K., Liggenstoffer, A., van der Giezen, M., Voigt, K., and Beakes, G.(2010). Anaerobic Fungi: Neocallimastigomycota. *IMA fungus*, 1(2), 181-185.
- Griffith, G. W., Ozkose, E., Theodorou, M. K., and Davies, D. R.(2009). Diversity of Anaerobic Fungal Populations in Cattle Revealed by Selective Enrichment Culture Using Different Carbon Sources. *Fungal Ecology*, 2(2), 87-97.
- Gruby, D. (1843). Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Comptes Rendus*, 17, 1304-1308.

- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., and Mcallister, T.(2014). Anaerobic Fungi (Phylum Neocallimastigomycota): Advances in Understanding Their Taxonomy, Life Cycle, Ecology, Role and Biotechnological Potential. *FEMS microbiology ecology*, 90(1), 1-17.
- Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., and O'Malley, M. A. (2014). Anaerobic Gut Fungi: Advances In Isolation, Culture, and Cellulolytic Enzyme Discovery for Biofuel Production. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1471-1482.
- Hanna, S. E., Connor, C. J., and Wang, H. H.(2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of food science*, 70(3), R49-R53.
- Harhangi, H. R., Akhmanova, A., Steenbakkers, P. J., Jetten, M. S., van der Drift, C., and Camp, H. J. O. (2003). Genomic DNA Analysis of Genes Encoding (hemi-) Cellulolytic Enzymes of the Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. E2. *Gene*, 314, 73-80.
- Harhangi, H. R., Steenbakkers, P. J., Akhmanova, A., Jetten, M. S., van der Drift, C., and Camp, H. J. O. (2002). A Highly Expressed Family 1 B-Glucosidase With Transglycosylation Capacity From The Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1574(3), 293-303.
- Harris, P. J., and Smith, B. G.(2006). Plant Cell Walls and Cell-Wall Polysaccharides: Structures, Properties and Uses in Food Products. *International journal of food science & technology*, 41, 129-143.
- Hartman, L. J., Selby, E. B., Whitehouse, C. A., Coyne, S. R., Jaissle, J. G., Twenhafel, N. A., and Kulesh, D. A.(2009). Rapid Real-Time PCR Assays for Detection of *Klebsiella Pneumoniae* With the *Rmpa* or *Maga* Genes Associated With the Hypermucoviscosity Phenotype: Screening of Nonhuman Primates. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(5), 464-471.

- Hespell RB, Aiken DE, Dehority BA.(1997). Bacteria, Fungi, and Protozoa in the Rumen. In: Mackie RI, White BA (eds), *Gastrointestinal Microbiology*, pp. 59–141. Chapman Hall, New York.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., and Lumbsch, H. T.(2007). A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R.(1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nature Biotechnology*, 10(4), 413.
- Ho, Y. W., and Barr, D. J. S. (1995). Classification of Anaerobic Gut Fungi From Herbivores With Emphasis on Rumen Fungi From Malaysia. *Mycologia*, 655-677.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., and Jalaludin, S.(1988). Penetrating Structures of Anaerobic Rumen Fungi in Cattle and Swamp Buffalo. *Microbiology*, 134(1), 177-181.
- Ho, Y. W., and Bauchop, T.(1991). Morphology of Three Polycentric Rumen Fungi and Description of a Procedure for the Induction of Zoosporogenesis and Release of Zoospores in Cultures. *Microbiology*, 137(1), 213-217.
- Ho, Y. W., Wong, M. V. L., Abdullan, N., Kudo, H., and Jalaludin, S.(1996). Fermentation Activities of Some New Species of Anaerobic Rumen Fungi From Malaysia. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42(1), 51-59.
- Huang, L. I., and Forsberg, C. W.(1990). Cellulose Digestion and Cellulase Regulation and Distribution in *Fibrobacter Succinogenes* Subsp. *Succinogenes* S85. *Applied and environmental microbiology*, 56(5), 1221-1228.
- Huang, L., and Forsberg, C. W.(1988). Purification and Comparison of the Periplasmic and Extracellular Forms of the Cellodextrinase From *Bacteroides Succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1488-1493.
- Hungate, R. E., Fletcher, D. W., Dyer, I. A.(1955). Effects of Chlortetracycline Feeding on Bovine Rumen Microorganisms. *Journal of Animal Science*, 14(4), 997-1002.
- Hungate, R. E.(1966). The rumen and its microbes Academic Press New York and London.

- Hungate, R. E.(1975). The Rumen Microbial Ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6(1), 39-66.
- Ioelovich, M.(2008). Cellulose as a Nanostructured Polymer: a Short Review. *BioResources*, 3(4), 1403-1418.
- Janssen, P. H., and Kirs, M.(2008). Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3619-3625.
- Jarvis, G. N., Strömpl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R., and Joblin, K. N. (2000). Isolation and Identification of Ruminant Methanogens from Grazing Cattle. *Current Microbiology*, 40(5), 327-332.
- Joblin, K. N.(1981). Isolation, Enumeration, and Maintenance of Rumen Anaerobic Fungi in roll Tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1119-1122.
- Joblin, K. N.,and Naylor, G. E.(1989). Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 65(1-2), 119-122.
- Biswas, R., Persad, A., and Bisaria, V. S.(2014).Production of Cellulolytic Enzymes. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts, I*, 105-132.
- Joblin, K. N., Matsui, H., Naylor, G. E., and Ushida, K.(2002). Degradation of Fresh Ryegrass by Methanogenic co-cultures of Ruminant Fungi Grown in the Presence or Absence of Fibrobacter Succinogenes. *Current microbiology*, 45(1), 46-53.
- Joblin, K. N., Naylor, G. E., and Williams, A. G.(1990). Effect of Methanobrevibacter Smithii on Xylanolytic Activity of Anaerobic Ruminant Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2287-2295.
- Jouany, J. P.(1989). Effects of diet on Populations of Rumen Protozoa in Relation to Fibre Digestion. *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*, 59-74.
- Jouany, J. P.(1994). Methods of Manipulating the Microbial Metabolism in the Rumen. In *Annales de zootechnie* (Vol. 43, No. 1, pp. 49-62).
- Jouany, J. P., Michalet-Doreau, B., and Doreau, M.(2000). Manipulation of the Rumen Ecosystem to Support High-performance Beef Cattle. *Asian Australasian Journal Of Animal Sciences*, 13(1), 96-114.

- Juturu, V., and Wu, J. C. (2014). Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.
- Kabir, M. M., Forgács, G., and Horváth, I. S.(2015). Biogas from Lignocellulosic Materials. In *Lignocellulose-Based Bioproducts*(pp. 207-251). Springer, Cham.
- Kalmokoff, M. L., Cyr, T. D., Hefford, M. A., Whitford, M. F., and Teather, R. M. (2003). Butyrivibriocin AR10, a new Cyclic Bacteriocin Produced by the Ruminal Anaerobe Butyrivibrio Fibrisolvens AR10: Characterization of the gene and Peptide. *Canadian journal of microbiology*, 49(12), 763-773.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen Microbial Ecosystem. *Current Science*, 89 (1): 124-135.
- Kar, B., 2013. Anaerobik Rumen Funguslarının Filogenetik Analizi ve Lipit Metabolizmasındaki Rollerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş.169s
- Karnati, S. K. R., Yu, Z., Sylvester, J. T., Dehority, B. A., Morrison, M., and Firkins, J. L. (2003). Specific PCR Amplification of Protozoal 18S rDNA sequences from DNA Extracted from Ruminal Samples of Cows. *Journal of animal science*, 81(3), 812-815.
- Kawai, S., Honda, H., Tanase, T., Taya, M., Iijima, S., Kobayashi, T.(1987). Molecular Cloning of Ruminococcus Albus Cellulase Gene. *Agricultural and biological chemistry*, 51(1), 59-63..
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C., and Krause, D. O.(2009). Rumen Microbiome Composition Determined using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. *Applied and environmental microbiology*, 75(22), 7115-7124.
- Kirk, T. K., and Farrell, R. L. (1987). Enzymatic" combustion": the Microbial Degradation of Lignin. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 465-501.
- Klieve, A. V., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R. J., Mackie, R. I., and Attwood, G. T.(2003). Establishing Populations of Megasphaera Elsdenii YE 34 and Butyrivibrio Fibrisolvens YE 44 in the Rumen of Cattle fed high grain Diets. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 621-630.

- Kobayashi, Y.(2006). Inclusion of Novel Bacteria in Rumen Microbiology: need for Basic and Applied Science. *Animal Science Journal*, 77(4), 375-385.
- Kobayashi, Y., Koike, S., Taguchi, H., Itabashi, H., Kam, D. K., and Ha, J. K.(2004). Recent Advances in gut Microbiology and Their Possible Contribution to Animal health and Production-a Review. *Asian-Australasian Journals Animal Sciences* 17(6), 877-884.
- Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I., and White, B. A. (2001). Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under Two Different Diet Conditions Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. *Anaerobe*, 7(3), 119-134.
- Koetschan, C., Kittelmann, S., Lu, J., Al-Halbouni, D., Jarvis, G. N., Müller, T., and Janssen, P. H.(2014). Internal Transcribed Spacer 1 Secondary Structure Analysis Reveals a Common Core Throughout the Anaerobic Fungi (Neocallimastigomycota). *PLoS One*, 9(3), e91928.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y., and Tanaka, K.(2003). Phylogenetic Analysis of Fiber-Associated Rumen Bacterial Community and PCR Detection of Uncultured Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1), 23-30.
- Koike, S., and Kobayashi, Y.(2001). Development and use of Competitive PCR Assays for the Rumen Cellulolytic Bacteria: Fibrobacter Succinogenes, Ruminococcus Albus and Ruminococcus Flavefaciens. *FEMS microbiology letters*, 204(2), 361-366.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., and Tanaka, K.(2003). Kinetics of in Sacco Fiber-Attachment of Representative Ruminal Cellulolytic Bacteria Monitored by Competitive PCR. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1429-1435.
- Koike, S., Pan, J., Suzuki, T., Takano, T., Oshima, C., Kobayashi, Y., and Tanaka, K.(2004). Ruminal Distribution of the Cellulolytic Bacterium Fibrobacter Succinogenes in Relation to its Phylogenetic Grouping. *Animal Science Journal*, 75(5), 417-422.
- Kopečný, J., Hodrova, B., and Stewart, C. S.(1996). The effect of Rumen Chitinolytic Bacteria on Cellulolytic Anaerobic Fungi. *Letters in applied microbiology*, 23(3), 199-202.

- Kopečný, J., Hodrova, B., and Stewart, C. S.(1996). The Isolation and Characterization of a Rumen Chitinolytic Bacterium. *Letters in applied microbiology*, 23(3), 195-198.
- Kotzekidou, P.(2013). Survey of *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella* Spp. and *Escherichia Coli* O157: H7 in Raw Ingredients and Ready-To-Eat Products by Commercial Real-Time PCR Kits. *Food microbiology*, 35(2), 86-91.
- Krause, D. O., Bunch, R. J., Dalrymple, B. D., Gobius, K. S., Smith, W. J. M., Xue, G. P., and McSweeney, C. S.(2001). Expression of a Modified *Neocallimastix Patriciarum* Xylanase in *Butyrivibrio Fibrisolvens* Digests More Fibre but Cannot Effectively Compete With Highly Fibrolytic Bacteria in the Rumen. *Journal of applied microbiology*, 90(3), 388-396.
- Krause, D. O., Dalrymple, B. P., Smith, W. J., Mackie, R. I., and McSweeney, C. S.(1999). 16S Rdna Sequencing of *Ruminococcus Albus* and *Ruminococcus Flavefaciens*: Design of a Signature Probe and its Application in Adult Sheep. *Microbiology*, 145(7), 1797-1807.
- Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., and McSweeney, C. S.(2003). Opportunities to Improve Fiber Degradation in The Rumen: Microbiology, Ecology, and Genomics. *FEMS microbiology reviews*, 27(5), 663-693.
- Krause, D. O., Smith, W. J., and McSweeney, C. S.(2004). Use of Community Genome Arrays (Cgas) to Assess the Effects of *Acacia Angustissima* on Rumen Ecology. *Microbiology*, 150(9), 2899-2909.
- Kulkarni, N., Shendye, A., and Rao, M.(1999). Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 23(4), 411-456.
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V. A., Egan, A. R., and Morrison, M.(2005). Novel Microbial Diversity Adherent to Plant Biomass in the Herbivore Gastrointestinal Tract, as Revealed by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis and *Rrs* Gene Sequencing. *Environmental microbiology*, 7(4), 530-543.
- Latham, M. J., Brooker, B. E., Pettipher, G. L., and Harris, P. J.(1978). Adhesion of *Bacteroides Succinogenes* In Pure Culture and in the Presence of *Ruminococcus*

- Flavefaciens to Cell Walls in Leaves of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*). *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6), 1166-1173.
- Lean, I. J., Golder, H. M., and Hall, M. B (2014). Feeding, Evaluating, and Controlling Rumen Function. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 30(3), 539-575.
- Lean, I. J., Van Saun, R., and DeGaris, P. J.(2013). Energy and Protein Nutrition Management of Transition Dairy Cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2), 337-366.
- Lee, S. M., Guan, L. L., Eun, J. S., Kim, C. H., Lee, S. J., Kim, E. T., and Lee, S. S.(2015). The Effect of Anaerobic Fungal Inoculation on the Fermentation Characteristics of Rice Straw Silages. *Journal of applied microbiology*, 118(3), 565-573.
- Lee, S. S., Ha, J. K., and Cheng, K. J.(2000). Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to in Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3807-3813.
- Leedle, J. A., Bryant, M. P., and Hespell, R. B.(1982). Diurnal Variations in Bacterial Numbers and Fluid Parameters in Ruminal Contents of Animals Fed Low-Or High-Forage Diets. *Applied and environmental microbiology*, 44(2), 402-412.
- Leis, S., Dresch, P., Peintner, U., Fliegerová, K., Sandbichler, A. M., Insam, H., and Podmirseg, S. M. (2014). Finding a Robust Strain For Biomethanation: Anaerobic Fungi (Neocallimastigomycota) From The Alpine Ibex (*Capra ibex*) and Their Associated Methanogens. *Anaerobe*, 29, 34-43.
- Leschine, S. B.(1995). Cellulose Degradation in Anaerobic Environments. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 399-426.
- Li, R. W., Connor, E. E., Li, C., Baldwin, VI, R. L., and Sparks, M. E.(2012). Characterization of the Rumen Microbiota of Pre-Ruminant Calves Using Metagenomic Tools. *Environmental microbiology*, 14(1), 129-139.
- Liebetanz, E., Die parasitischen Protozoen der Wiederkauermagens. *Arch. Prot.*, 1910, **19**, 19-90.
- Liggenstoffer, A. S., Youssef, N. H., Couger, M. B., and Elshahed, M. S.(2010). Phylogenetic Diversity and Community Structure of Anaerobic Gut Fungi

- (Phylum Neocallimastigomycota) in Ruminant and Non-Ruminant Herbivores. *The ISME journal*, 4(10), 1225.
- Liu, Y. J., Hodson, M. C., and Hall, B. D.(2006). Loss of the Flagellum Happened Only once in the Fungal Lineage: Phylogenetic Structure of Kingdom Fungi Inferred From RNA Polymerase II Subunit Genes. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 74.
- Ljungdahl, L. G.(2008). The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC-2 and Aspects of Its Applied Use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 308-321.
- Loveless, A. R.(1983). *Principles of plant biology for the tropics*. Longman.
- Lowe, S. E., Griffith, G. G., Milne, A., Theodorou, M. K., and Trinci, A. P.(1987). The Life Cycle and Growth Kinetics of an Anaerobic Rumen Fungus. *Microbiology*, 133(7), 1815-1827.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.(1951). Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lwin, K. O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., and Matsui, H.(2011). Real-time PCR assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population size in the Rumen. *Current microbiology*, 62(4), 1147-1151.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S.(2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- Mackay, I. M.(2004). Real-Time PCR in the Microbiology Laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10(3), 190-212.
- Mackie, R. I.(1997). Gut Environment and Evolution of Mutualistic Fermentative Digestion. In *Gastrointestinal microbiology* (pp. 13-35). Springer, Boston, MA.
- Mackie, R. I., Aminov, R. I., Hu, W., Klieve, A. V., Ouwerkerk, D., Sundset, M. A., and Kamagata, Y. (2003). Ecology of Uncultivated *Oscillospira* Species in the Rumen of Cattle, Sheep, and Reindeer as Assessed by Microscopy and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6808-6815.

- Martin, S. A., and Akin, D. E. (1990). Effect of Phenolic Compounds on Fiberdegrading Enzymes From Rumen Bacteria. *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization in Ruminants*. Elsevier, New York, 289-300.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., & Fonty, G. (2002). A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *Journal of animal science*, 80(3), 790-796.
- Martin, C., Millet, L., Fonty, G., and Michalet-Doreau, B.(2001). Cereal Supplementation Modified the Fibrolytic Activity but not the Structure of the Cellulolytic Bacterial Community Associated With Rumen Solid Digesta. *Reproduction Nutrition Development*, 41(5), 413-424.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., and Cheng, K. J.(1994). Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. *Journal of Animal Science*, 72(11), 3004-3018.
- McBride, G. B., McWhirter, J. L., and Dalgety, M. H.(2003). Uncertainty in Most Probable Number Calculations for Microbiological Assays. *Journal of AOAC International*, 86(5), 1084-1088.
- McGavin, M. J., Forsberg, C. W., Crosby, B., Bell, A. W., Dignard, D., and Thomas, D. Y.(1989). Structure of the Cel-3 Gene From Fibrobacter Succinogenes S85 and Characteristics of the Encoded Gene Product, Endoglucanase 3. *Journal of bacteriology*, 171(10), 5587-5595.
- McGranaghan, P., Davies, J. C., Griffith, G. W., Davies, D. R., and Theodorou, M. K.(1999). The Survival of Anaerobic Fungi in Cattle Faeces. *FEMS microbiology ecology*, 29(3), 293-300.
- McSweeney, C. S., Dulieu, A., Katayama, Y., and Lowry, J. B.(1994). Solubilization Of Lignin by the Ruminal Anaerobic Fungus Neocallimastix Patriciarum. *Applied and environmental microbiology*, 60(8), 2985-2989.
- Milne, A., Theodorou, M. K., Jordan, M. G., King-Spooner, C., and Trinci, A. P.(1989). Survival of Anaerobic Fungi in Feces, in Saliva, and in Pure Culture. *Experimental Mycology*, 13(1), 27-37.

- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., and Fonty, G.(2001). Fibrolytic Activities and Cellulolytic Bacterial Community Structure in the Solid and Liquid Phases of Rumen Contents. *Reproduction Nutrition Development*, 41(2), 187-194.
- Michalet-Doreau, B., and Morand, D.(1997). Effect of Yeast Culture, *Saccharomyces Cerevisiae* CNCM I-1077, on Ruminant Fermentation During Adaptation to High-Concentrate Feeding. *4èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris*, 4, p121.
- Miller, G. L.(1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Minato, H., Ishizaki, S., Adachi, Y., and Mitsumori, M.(1989). Effect on Rumen Microbial Populations of Ammonia Treatment of Rice Straw Forage for Steers. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 35(2), 113-124.
- Minato, H.(1993). Attachment of Microorganisms to Solid Substrate in the Rumen. *Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation*.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., and Morrison, M.(2001). Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of dairy science*, 84(6), 1294-1309.
- Morgenstern, I., Powlowski, J., and Tsang, A.(2014). Fungal Cellulose Degradation by Oxidative Enzymes: From Dysfunctional GH61 Family to Powerful Lytic Polysaccharide Monooxygenase Family. *Briefings in functional genomics*, 13(6), 471-481.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C., and Forano, E.(2007). Quantification by Real-Time PCR of Cellulolytic Bacteria in the Rumen of Sheep After Supplementation of a Forage Diet With Readily Fermentable Carbohydrates: Effect of a Yeast Additive. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2676-2685.
- Mould, D. L., and Thomas, G. J.(1958). The Enzymic Degradation of Starch by Holotrich Protozoa From Sheep Rumen. *Biochemical Journal*, 69(3), 327.

- Mountfort, D. O., and Asher, R. A.(1985). Production and Regulation of Cellulase by Two Strains of the Rumen Anaerobic Fungus *Neocallimastix Frontalis*. *Applied and environmental microbiology*, 49(5), 1314-1322.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., and Koong, L. J.(1982). Estimation of Stoichiometric Parameters for Rumen Fermentation of Roughage and Concentrate Diets. *Journal of Animal Science*, 55(2), 411-421.
- Nagpal R, Puniya AK, Griffith GW, Goel G, Puniya M, Sehgal J, Paul, Singh K (2009) Anaerobic rumen fungi: potential and applications. In: Khachatourians GG, Arora DK, Rajendran TP, Srivastava AK (eds) Agriculturally important microorganisms, vol 1. Academic World International, New York, pp 375–393
- Nagpal, R., Puniya, A. K., Sehgal, J. P., Singh, K.(2010). Influence of Bacteria and Protozoa From the Rumen of Buffalo On In-Vitro Activities of Anaerobic Fungus *Caecomyces* Sp. Isolated From The Feces of Elephant. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(8), 152-156.
- Nagy, T., Tunnicliffe, R. B., Higgins, L. D., Walters, C., Gilbert, H. J.,and Williamson, M. P.(2007). Characterization of a Double Dockerin From the Cellulosome of the Anaerobic Fungus *Piromyces Equi*. *Journal of molecular biology*, 373(3), 612-622.
- Nakashimada, Y., Srinivasan, K., Murakami, M., and Nishio, N (2000). Direct Conversion of Cellulose to Methane by Anaerobic Fungus *Neocallimastix Frontalis* and Defined Methanogens. *Biotechnology letters*, 22(3), 223-227.
- Nannapaneni, R. 2012. Methods for Identification of Bacterial Foodborne Pathogens. Microbial Food Safety (Editorler: Omar, A., Oyarzabal, O.A., Backert, S.). Springer, NY. s. 45-55.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., and Solera, J.(2015). Real-time PCR Detection Chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.
- Newbold, C. J., McKain, N., and Wallace, R. J.(1989). The Role of Protozoa in Ruminal Peptide Metabolism. In *Biochemistry and Molecular Biology of Anaerobic Protozoa*. Harwood Academic Publishers.

- NORDKVIST, E., 1987. Composition and Degradation of Cell Walls in Red Clover, Lucerne and Cereal Straw. The Swedish University, Agricultural Science. UPPSALA.
- Nsabimana, E., Kišidayová, S., Macheboeuf, D., Newbold, C. J., and Jouany, J. P.(2003). Two-Step Freezing Procedure for Cryopreservation of Rumen Ciliates, an Effective Tool for Creation of a Frozen Rumen Protozoa Bank. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3826-3832.
- O'Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., and Barry, T.(2008). Rapid Real-Time PCR Detection of *Listeria Monocytogenes* in Enriched Food Samples Based on The *Ssra* Gene, a Novel Diagnostic Target. *Food Microbiology*, 25(1), 75-84.
- Obispo, N. E., and Dehority, B. A.(1992). A Most Probable Number Method for Enumeration of Rumen Fungi With Studies on Factors Affecting Their Concentration in the Rumen. *Journal of Microbiological Methods*, 16(4), 259-270.
- Odenyo, A. A., Mackie, R. I., Stahl, D. A. and White, B. A.(1994), The use of 16S rRNA Probes to Study Competition Between Rumen Fibrolytic Bacteria: Development of Probe for *Ruminococcus* Species and Evidence for Bacteriocin Production. *Applied and Environmental Microbiology*, , 60, 3688–3696.
- Ogimoto, K., and Imai, S.(1981). *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press..
- Ohmiya, K.(1990). The Rumen Ecosystem: The Microbial Metabolism and its Regulation. *Japan Scientific Societies Press. Tokio*, 195-202.
- Ohmiya, K. U. N. I. O., Nagashima, K., Kajino, T. S. U. T. O. M. U., Goto, E., Tsukada, A., and Shimizu, S.(1988). Cloning of the Cellulase Gene From *Ruminococcus Albus* and its Expression in *Escherichia Coli*. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1511-1515.
- Ohmiya, K., Shimizu, M., Taya, M., and Shimizu, S.(1982). Purification and Properties of Cellobiosidase From *Ruminococcus Albus*. *Journal of Bacteriology*, 150(1), 407.

- Ohmiya, K., Shirai, M., Kurachi, Y., and Shimizu, S.(1985). Isolation And Properties of Beta-Glucosidase From Ruminococcus Albus. *Journal of Bacteriology*, 161(1), 432-434.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani, M.(2009). A New Platform For Real-Time PCR Detection of Salmonella Spp., Listeria Monocytogenes and Escherichia Coli O157 In Milk. *Food Microbiology*, 26 (6): 615-622.
- Onodera, R., Yamasaki, N., and Murakami, K.(1988). Effect of Inhabitation by Ciliate Protozoa on the Digestion of Fibrous Materials in Vivo in the Rumen of Goats and in an in Vitro Rumen Microbial Ecosystem. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(10), 2635-2637.
- Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., and Kirby, A.(1994). Microbial Fermentation of Cereal Grains in Vitro. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45(6), 1247-1263.
- Orpin, C. G., and Letcher, A. J.(1979). Utilization of Cellulose, Starch, Xylan, and Other Hemicelluloses for Growth by the Rumen Phycomyceteneocallimastix Frontalis. *Current Microbiology*, 3(2), 121-124.
- Orpin, C. G.(1984). The Role of Ciliate Protozoa and Fungi in the Rumen Digestion of Plant Cell Walls. *Animal Feed Science and Technology*, 10(2-3), 121-143.
- Orpin, C. G.(1977). The Occurrence of Chitin in the Cell Walls of the Rumen Organisms Neocallimastix Frontalis, Piromonas Communis and Sphaeromonas Communis. *Microbiology*, 99(1), 215-218..
- Orpin, C. G.(1977). The Rumen Flagellate Piromonas Communis: Its Life-History and Invasion of Plant Material in the Rumen. *Microbiology*, 99(1), 107-117.
- Orpin, C. G., and Joblin, K. N.(1997). The Rumen Anaerobic Fungi. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 140-195). Springer, Dordrecht.
- Orpin, C. G.(1975). Studies on the Rumen Flagellate Neocallimastix Frontalis. *Microbiology*, 91(2), 249-262.

- Orpin, C. G.(1976). The Characterization of the Rumen Bacterium Eadie's Oval, Magnoovum Gen. Nov. Eadii Sp. Nov. *Archives of Microbiology*, 111(1), 155-159.
- O'sullivan, A. C.(1997). Cellulose: the Structure Slowly Unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., and Forster, R. J.(2002). Enumeration of Megasphaera Elsdenii in Rumen Contents by Real-Time Taq Nuclease Assay. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 753-758.
- Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., and Theodorou, M. K.(2001). Cyllamyces Aberensis Gen. Nov. Sp. Nov., a New Anaerobic Gut Fungus With Branched Sporangioophores Isolated From Cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 666-673.
- Palevich, N. (2011). Genome sequencing of rumen bacteria involved in lignocellulose digestion. *Master of Science in Genetics and Microbiology, Massey University, Palmerston North, New Zealand*.165s
- Parish, J. A., Rivera, J. D., and Boland, H. T.(2009). Understanding the Ruminant Animal Digestive System
- Paster, B. J., and Canale-Parola, E. R. C. O. L. E.(1985). Treponema Saccharophilum Sp. Nov., A Large Pectinolytic Spirochete From the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 212-219.
- Patra, A. K., and Yu, Z.(2014). Effects of Vanillin, Quillaja Saponin, And Essential Oils on in Vitro Fermentation and Protein-Degrading Microorganisms of the Rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 897-905.
- Patterson JA.,(1992). Rumen Microbiology. Editor-in- Chief Lederberg, J. Encyclopedia of Microbiology. Academic press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. New York, 3, 623- 542.
- Pegden, R. S., Larson, M. A., Grant, R. J., and Morrison, M.(1998). Adherence of the Gram-positive Bacteriumruminococcus Albus to Cellulose and Identification of a Novel Form of Cellulose-Binding Protein Which Belongs to the Pil Family of Proteins. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5921-5927.

- Perlin, A. S., and Suzuki, S.(1962). The Structure of Lichenin: Selective Enzymolysis Studies. *Canadian Journal of Chemistry*, 40(1), 50-56.
- Piao, H., Lachman, M., Malfatti, S., Sczyrba, A., Knierim, B., Auer, M., and Hess, M.(2014). Temporal Dynamics of Fibrolytic and Methanogenic Rumen Microorganisms During in Situ Incubation of Switchgrass Determined by 16S Rrna Gene Profiling. *Frontiers in microbiology*, 5, 307.
- Pitta, D. W., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Shirley, D. J., Bittinger, K., Baker, L. D., and Thomsen, N.(2014). Temporal Dynamics in the Ruminal Microbiome of Dairy Cows During the Transition Period. *Journal of Animal Science*, 92(9), 4014-4022.
- Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., and Wickersham, T. A.(2010). Rumen Bacterial Diversity Dynamics Associated With Changing From Bermudagrass Hay to Grazed Winter Wheat Diets. *Microbial ecology*, 59(3), 511-522.
- Pizzi, A., and Eaton, N.(1985). The Structure of Cellulose by Conformational Analysis. 2. The Cellulose Polymer Chain. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry*, 22(1), 105-137.
- Poole, D. M., Hazlewood, G. P., Laurie, J. I., Barker, P. J., and Gilbert, H. J.(1990). Nucleotide Sequence of the Ruminococcus Albus SY3 Endoglucanase Genes Cel1a And Cel1b. *Molecular and General Genetics MGG*, 223(2), 217-223.
- Ramos-Morales, E., Sanz-Sampelayo, M. R., and Molina-Alcaide, E.(2010). Nutritive Evaluation of Legume Seeds for Ruminant Feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(1), 55-64.
- Raskin L, Capman WC, Sharp R, Poulsen LK and Stahl DA(1997) Molecular Ecology of Gastrointestinal Ecosystems. *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2. *Gastrointestinal Microbes and Host Interactions* (Mackie RI, White BA and Isaacson RE, eds), pp. 243–298. Chapman Hall, New York.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A.(1994). Group-specific 16S rRNA Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1232-1240.

- Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-van der Staay, S. Y., Van Der Staay, G. W. M., Hackstein, J. H. P., and McEwan, N. R.(2004). Assessment of Ciliates in the Sheep Rumen By DGGE. *Letters in applied microbiology*, 39(2), 144-147.
- Rezaeian, M., Beakes, G. W., and Parker, D. S.(2004). Distribution and Estimation of Anaerobic Zoospore Fungi Along the Digestive Tracts of Sheep. *Mycological research*, 108(10), 1227-1233.
- Rijpens, N. P., and Herman, L. M.(2002). Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. *Journal of AOAC International*, 85(4), 984-995.
- Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S., and Gouet, P.(1990). Effects of Physicochemical Factors on the Adhesion to Cellulose Avicel of the Ruminal Bacteria *Ruminococcus Flavefaciens* and *Fibrobacter Succinogenes* Subsp. *Succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), 3081-3087.
- Russell, J. B., and Wilson, D. B.(1996). Why are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low Ph?. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1503-1509.
- Rychlik, J. L., and Russell, J. B.(2002). Bacteriocin-Like Activity of *Butyrivibrio Fibrisolvens* JL5 and its Effect on Other Ruminal Bacteria and Ammonia Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1040-1046.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J.(2008). Analyzing real-time PCR Data by the Comparative C T Method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101.
- Seshadri, R., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Teh, K. H., Lambie, S. C., Cookson, A. L., and Paez-Espino, D.(2018). Cultivation and Sequencing of Rumen Microbiome Members From the Hungate1000 Collection. *Nature Biotechnology*, 36(4), 359.
- Shah, H. N., and Collins, M. D.(1983). Genus *Bacteroides* a Chemotaxonomical Perspective. *Journal Of Applied Bacteriology*, 55(3), 403-416.
- Shi, Y., Odt, C. L., and Weimer, P. J.(1997). Competition for Cellulose Among Three Predominant Ruminal Cellulolytic Bacteria Under Substrate-Excess and Substrate-Limited Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 734-742.

- Shin, E. C., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Kim, E. J., and Kim, H.(2004). Phylogenetic Analysis of Protozoa in the Rumen Contents of Cow Based on the 18S Rdna Sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 378-383.
- Shipley, G. L.(2007). An Introduction to Real-Time PCR. In *Real-time PCR* (pp. 27-64). Taylor and Francis.
- Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E. A.(1999). The Cellulosome Concept as an Efficient Microbial Strategy for the Degradation of Insoluble Polysaccharides. *Trends in Microbiology*, 7(7), 275-281.
- Singh, K., Mangold, K.A., Wyant, K., Schora, D.M., Voss, B., Kaul, K.L., Hayden, M.K., Chundi, V., Peterson, L.R.(2012). Rectal Screening for Klebsiella pneumoniae Carbapenemases: Comparison of Real-Time PCR and Culture Using Two Selective Screening Agar Plates. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (8): 2596-2600.
- Sipat, A. B. D. U. L. L. A. H., Taylor, K. A., Lo, R. Y., Forsberg, C. W., and Krell, P. J.(1987). Molecular Cloning of a Xylanase Gene From Bacteroides Succinogenes and its Expression in Escherichia Coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 477-481.
- Sirohi, S. K., Choudhury, P. K., Dagar, S. S., Puniya, A. K., and Singh, D.(2013). Isolation, Characterization and Fibre Degradation Potential of Anaerobic Rumen Fungi From Cattle. *Annals of Microbiology*, 63(3), 1187-1194.
- Sirohi SK, Singh N, Dagar SS, Puniya AK(2012) Molecular Tools For Deciphering the Microbial Community Structure and Diversity in Rumen Ecosystem. *Annals of Microbiology* 95(5):1135–1154
- Sirohi, S. K., Singh, N., Dagar, S. S., and Puniya, A. K.(2012). Molecular Tools For Deciphering the Microbial Community Structure and Diversity in Rumen Ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1135-1154.
- Sparrow, F. K.(1960). Aquatic Phycomycetes 2nd edn University of Michigan Press Ann Arbor Google Scholar.

- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., and Montgomery, L.(1988). Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes For Studies of Ruminal Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), 1079-1084.
- Stams AJ(1994) Metabolic Interactions Between Anaerobic Bacteria in Methanogenic Environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66(1-3):271-294.
- Steenbakkens, P. J. M., Freelove, A., Van Cranenbroek, B., Sweegers, B. M. C., Harhangi, H. R., Vogels, G. D and Op den Camp, H. J. M.(2002). The Major Component of the Cellulosomes of Anaerobic Fungi From the Genus Piromyces as a Family 48 Glycoside Hydrolase. *DNA Sequence*, 13(6), 313-320.
- Steenbakkens, P. J., Irving, J. A., Harhangi, H. R., Swinkels, W. J., Akhmanova, A., Dijkerman, R., and Camp, H. J. O.(2008). A Serpin in the Cellulosome of the Anaerobic Fungus Piromyces Sp. Strain E2. *Mycological Research*, 112(8), 999-1006.
- Steenbakkens, P. J., Li, X. L., Ximenes, E. A., Arts, J. G., Chen, H., Ljungdahl, L. G., and Camp, H. J. O.(2001). Noncatalytic Docking Domains of Cellulosomes of Anaerobic Fungi. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5325-5333.
- Stevenson, D.M. and Weimer, P.J. (2007) Dominance of Prevotella and Low Abundance of Classical Ruminal Bacterial Species in the Bovine Rumen Revealed by Relative Quantification Real-Time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 165-174.
- Stewart, C. S.(1992). Lactic Acid Bacteria in the Rumen. In *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* (pp. 49-68). Springer, Boston, MA.
- Stewart, C. S., Duncan, S. H., Richardson, A. J., Backwell, C., and Begbie, R.(1992). The Inhibition of Fungal Cellulolysis by Cell-Free Preparations From Ruminococci. *FEMS microbiology letters*, 97(1-2), 83-87.
- Stewart, C. S., Flint, H. J., and Bryant, M. P.(1997). The Rumen Bacteria. in *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 10-72). Springer, Dordrecht.
- Sung, H. G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I. H., and Ha, J. K. (2006). Low Ruminal Ph Reduces Dietary Fiber Digestion Via Reduced Microbial Attachment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(2), 200-207.

- Sylvester, J. T., Karnati, S. K. R., Yu, Z., Newbold, C. J., and Firkins, J. L.(2005). Evaluation of a Real-Time PCR Assay Quantifying the Ruminal Pool size and Duodenal Flow of Protozoal Nitrogen. *Journal of dairy science*, 88(6), 2083-2095.
- Sylvester, J. T., Karnati, S. K., Yu, Z., Morrison, M., and Firkins, J. L.(2004). Development of an Assay to Quantify Rumen Ciliate Protozoal Biomass in Cows Using Real-Time PCR. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3378-3384.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y.(1999). Rumen Bacterial Diversity as Determined by Sequence Analysis of 16S Rdna Libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 159–169.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura,M. and Benno, Y.,(2001) Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Populationof the Rumen Revealed With Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2766–2774.
- Theodorou, M. K., Davies, D. R., Jordan, M. G., Trinci, A. P., and Orpin, C. G.(1993). Comparison of Anaerobic Fungi In Faeces and Rumen Digesta of Newly Born and Adult Ruminants. *Mycological Research*, 97(10), 1245-1252.
- Theodorou MK, Davies DR, Nielsen BB, Lawrence MI, Trinci APJ (1995) Determination of Growth of Anaerobic Fungi on Soluble and Cellulosic Substrates Using a Pressure Transducer. *Microbiology* 141(3):671–678.
- Theodorou, M. K., Gill, M., King-Spooner, C., and Beever, D. E.(1990). Enumeration of Anaerobic Chytridiomycetes as Thallus-Forming Units: Novel Method for Quantification of Fibrolytic Fungal Populations From the Digestive Tract Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1073-1078.
- Thomson, J. A.(1993). Molecular Biology of Xylan Degradation. *FEMS Microbiology Letters*, 104(1-2), 65-82.
- Thurston, B., Dawson, K. A., and Strobel, H. J.(1993). Cellobiose Versus Glucose Utilization by the Ruminal Bacterium *Ruminococcus Albus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2631-2637.

- Thurston, J. P. and Grain, J.(1971). Holotrich Ciliates From the Stomach of *Hippopotamus Amphibius*, With Descriptions of Two New Genera and four New Species. *J. Protozool.*, **18**, 131–141.
- Tsai, K. P., and Calza, R. E.(1993). Optimization of Protein And Cellulase Secretion in *Neocallimastix Frontalis* EB188. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4-5), 477-482.
- Tuckwell DS, Nicholson MJ, McSweeney CS, Theodorou MK and Brookman JL(2005) The Rapid Assignment of Ruminant Fungi to Presumptive Genera Using ITS1 and ITS2 RNA Secondary Structures to Produce Group-Specific Fingerprints. *Microbiology* 151: 1557–1567.
- Ueda, S., Yamaguchi, M., Iwase, M., and Kuwabara, Y.(2013). Detection of Emetic *Bacillus Cereus* by Real-Time PCR in Foods. *Biocontrol Science*, 18(4), 227-232.
- Van Der Giezen, M.(2009). Hydrogenosomes and Mitosomes: Conservation and Evolution of Functions 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(3), 221-231.
- Van Soest, P. J (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant., 2nd edn.(Cornell University Press: Ithaca, NY). *Google Scholar*.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., and Sherwood, R. T.(1980). Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 259-288.
- Wanapat, M., and Cherdthong, A.(2009). Use of Real-Time Pcr Technique in Studying Rumen Cellulolytic Bacteria Population as Affected by Level of Roughage in Swamp Buffalo. *Current Microbiology*, 58(4), 294-299.
- Wang, H. C., Chen, Y. C., and Hseu, R. S.(2014). Purification and Characterization of a Cellulolytic Multienzyme Complex Produced by *Neocallimastix Patriciarum* J11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(2), 190-195.
- Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5):509–547.

- Wang, X., Zhu, C., Xu, X., Zhou, G.(2012). Real-time PCR With Internal Amplification Control for the Detection of Cronobacter Spp. (Enterobacter sakazakii) in Food Samples. *Food Control*, 25 (2012): 144-149.
- Wang, L., Li, P., Zhang, Z., Chen, Q., Aguilar, Z. P., Xu, H., and Wei, H.(2014). Rapid and Accurate Detection of Viable Escherichia Coli O157: H7 in Milk Using a Combined IMS, Sodium Deoxycholate, PMA And Real-Time Quantitative PCR Process. *Food Control*, 36(1), 119-125.
- Weber RWS and Webster J (2000) Teaching Techniques For Mycology: 9. Olpidium and Rhizophlyctis (Chytridiomycetes). *Mycologist* 14: 17–20.
- Weimer, J.P.,(1998). Manipulating Ruminal Fermentation: a Microbial Ecological Perspective. *Journal of Animal Science*, 76: 3114–3122.
- Weimer, P. J.(1992). Cellulose Degradation by Ruminal Microorganisms. *Critical Reviews In Biotechnology*, 12(3), 189-223.
- Weimer, P. J., Stevenson, D. M., and Mertens, D. R.(2010). Shifts in Bacterial Community Composition in the Rumen of Lactating Dairy Cows Under Milk Fat-Depressing Conditions. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 265-278.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L. and Mertens, D.R (1999) Effect of diet on Populations of Three Species of Ruminal Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 82, 122–134.
- Wells, J. E. and J. B. Russell(1996). Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *Journal of Dairy Science*, 79, 1487-1495.
- Whitford MF, Forster RJ, Beard CE, Gong J, Teather RM. (1998). Phylogenetic Analysis of Rumen Bacteria by Comparative Sequence Analysis of Cloned 16S Rrna Genes. *Anaerobes* 4, 153–163.
- Williams, A. G.(1986). Rumen Holotrich Ciliate Protozoa. *Microbiological Reviews*, 50(1), 25.
- Williams, A. G., Withers, S. E., and Joblin, K. N.(1991). Xylanolysis by Cocultures of The Rumen Fungus Neocallimastix Frontalis and Ruminal Bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 12(6), 232-235.

- Williams, A. G. and Coleman, G. S.,(1992).*The Rumen Protozoa*, Springer Verlag, New York,
- Williams, A. G., and Coleman, G. S.(1985). Hemicellulose-degrading Enzymes in Rumen Ciliate Protozoa. *Current Microbiology*, 12(2), 85-90.
- Williams, A. G., and Strachan, N. H.(1984). The Distribution of Polysaccharide-Degrading Enzymes in the Bovine Rumen Digesta Ecosystem. *Current Microbiology*, 10(4), 215-220.
- Williams, A. G.(1979). The Selectivity of Carbohydrate Assimilation by the Anaerobic Rumen Ciliate *Dasytricha Ruminantium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 47(3), 511-520.
- Woese, C. R.(1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221.
- Wolin, M. J., and Miller, T. L.(1988). Microbe Interactions in the Rumen Microbial Ecosystem. *The Rumen Ecosystem* (ed. PN Hobson), 343-359.
- Wolin, M. J., Miller, T. L., and Stewart, C. S.(1997). Microbe-Microbe Interactions. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 467-491). Springer, Dordrecht.
- Wong, M.L., and Medrano, J.F.(2005). Real-Time PCR For Mrna Quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Wood, T. M., Wilson, C. A., and Stewart, C. S.(1982). Preparation of the Cellulase From the Cellulolytic Anaerobic Rumen Bacterium *Ruminococcus Albus* and its Release From the Bacterial Cell Wall. *Biochemical Journal*, 205(1), 129-137.
- Wubah DA, Kim DSH(1996). Chemoattraction of Anaerobic Ruminal Fungi Zoospores to Selected Phenolic Acids. *Microbiol Research* 151(3):257–262.
- WUBAH, D.A., FULLER, M.S., AKIN, D.E.,(1991). Resistant Body Formation in *Neocallimastix* Sp., an Anaerobic Fungus From The Rumen Of The Cow. *Mycologia* 83: 40-47.
- Xue, G. P., Gobius, K. S., and Orpin, C. G.(1992). A Novel Polysaccharide Hydrolase Cdna (Celd) From *Neocallimastix Patriciarum* Encoding Three Multi-Functional Catalytic Domains With High Endoglucanase, Cellobiohydrolase and Xylanase Activities. *Microbiology*, 138(11), 2397-2403.

- Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L., and Newbold, C. J.(2015). Manipulating Rumen Microbiome and Fermentation Through Interventions During Early Life: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1133.
- Ye, X. Y., Ng, T. B., and Cheng, K. J. (2001). Purification and Characterization of a Cellulase From the Ruminant Fungus *Orpinomyces Joyonii* Cloned in *Escherichia Coli*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33(1), 87-94.
- Youssef, N. H., Couger, M. B., Struchtemeyer, C. G., Ligginstoffer, A. S., Prade, R. A., Najar, F. Z., and Elshahed, M. S.(2013). Genome of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* Sp. C1A Reveals The Unique Evolutionary History of a Remarkable Plant Biomass Degradar. *Applied And Environmental Microbiology*, AEM-00821.
- Zhou, L. I. Q. I. N. G., Xue, G. P., Orpin, C. G., Black, G. W., Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P.(1994). Intronless Celb From the Anaerobic Fungus *Neocallimastix Patriciarum* Encodes a Modular Family a Endoglucanase. *Biochemical Journal*, 297(2), 359-364.
- Zhu, Z., and Noel, P. S. J (2016). *Dynamics of Rumen Bacterial and Archaeal Communities in Dairy Cows over Different Lactation Cycle Stages*. Section For Immunology and Microbiology, Aarhus University.
- Zoetendal, E. G., Cheng, B., Koike, S., and Mackie, R. I.(2004). Molecular Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract: From Phylogeny to Function. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5(2), 31-48.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi : 24.05.1987
Doğum Yeri : Kahramanmaraş
E-Posta : altugkaraman@hotmail.com
Telefon : +90 (554) 8550292

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	K.S.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü	2018
Yüksek Lisans	K.S.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü	2012
Lisans	K.S.Ü Biyoloji bölümü	2009
Lise	Atatürk lisesi	2005

1.1. ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. **KARAMAN, A.**, YAZDIÇ, F. C., AKYOL, İ., EKİNCİ, M. S., & ÖZKÖSE, E. Doğal Streptococcus thermophilus İzolatlarında comX Gen Varlığına Bağlı DNA Transfer Frekansının Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 44(1), 9-23.
2. Yazdıç, F. C., **Karaman, A.**, & Yazdıç, F. (2018). Antimicrobial Effect of Secondary Metabolites Produced by Some Bacillus Strains Developed in Different Energy Sources. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 6(10), 1437-1443.

1.2. ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE ÖZETİ BASILAN BİLDİRİLER

1. **Altuğ Karaman**, Emin Özköse, Mehmet Sait Ekinci, Ferit Can Yazdıç, Elif Köksalan, İsmail Akyol “DOĞAL Streptococcus Thermophilus İzolatlarında Horizontal Konjugasyonun İncelenmesi” X. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, 23 Nisan 2014 – KAYSERİ, p:151.

2. Ebru Seven, Melda Duzman, **Altuğ Karaman**, “Alternatif Karbonhidrat Kaynaklarında Maya Kültürlerinin Biyoetanol Üretim Potansiyelinin Araştırılması” 22. Uusal Biyoloji Kongresi, 23 Haziran 2014- Eskişehir p:812
3. Hülya KOCA, Yekta GEZGİNÇ, **Altuğ KARAMAN**, Elif KÖKSALAN “Ekşi Hamur Örneklerinden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu Ve Moleküler Tanımlaması” 2. Tarım ve Gıda kongresi, 28 nisan 2015, Nevşehir- p:181
4. Elif KÖKSALAN, GEZGİNÇ, Y., **KARAMAN, A.**, “Ekşi Hamurdan Lactobacillus plantarum İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması, Sekans Analizi ve Bazı Gıda Patojenik Bakterileriyle Antimikrobiyal Etkisi”, İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi , 28-30 Nisan 2015, Nevşehir- p:153
5. Ferit Can YAZDIÇ, Mehmet Sait EKİNCİ, Emin ÖZKÖSE, İsmail AKYOL, **Altuğ KARAMAN**, “Rumen Mikrobiyal Ekosisteminin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler İdentifikasyon Yöntemleri”, 9. Ulusal Zootečni Kongresi, Bildiri Kitabı, 937 pp., Konya, Türkiye, 3-5 Eylül 2015.
6. Ferit Can YAZDIÇ, Sahdi Mahdi Taha Zebari, **Altuğ KARAMAN**, Emin ÖZKÖSE, “Irak Yerel Tavuklarında D-loop ve 12S Mitokondriyal DNA Bölgeleri Dizi Analizi”, 12. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, 9-11 Mayıs 2016 Isparta.