

**Ruminantlardan Anaerobik Fungus İzolasyonu ve İdentifikasyonu**

**Mustafa Saçkesen**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Aralık 2007**

**Isolation and Identification of Anaerobic Fungi from Ruminants**

**Mustafa Saçkesen**

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

**Department of Biology**

**December 2007**

# **Ruminantlardan Anaerobik Fungus İzolasyonu ve İdentifikasyonu**

**Mustafa Saçkesen**

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Danışman: Doç. Dr. Semra İLHAN**

**Aralık 2007**

Mustafa SAÇKESEN'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Ruminantlardan Anaerobik Fungus İzolasyonu ve İdentifikasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ (Anadolu Üniv.)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü



## ÖZET

Anaerobik funguslar gerek ruminantların ve gerekse tek mideli herbivorların birçoğunun sindirim sisteminde simbiyotik olarak yaşarlar. Konakçı hayvanın funguslar için uygun sıcaklık, anaerobik ortam ve besin kaynağı sağlamasına karşılık funguslar konakçı hayvan tarafından alınan bitkilerin hücre duvarlarındaki polisakkaritleri sellobiyoz ve glikoza çevirerek simbiyotik halkayı tamamlarlar. Orpin tarafından keşiflerinden bu yana 6 cins içerisinde 19 tür tanımlanmıştır. *Neocallimastix*, *Piromyces* ve *Caecomyces* cinsleri monosentrik, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* ve *Cyllamyces* cinsleri ise polisentrik yaşam gösterirler.

Bu çalışmada, bir tanesi rumen sıvısı diğerleri çeşitli herbivora ait dışkı olmak üzere 25 örnek üzerinde çalışılmıştır. İzolasyon işlemi sonucunda elde edilen 6 izolatın *Neocallimastix* cinsine ait olduğu anlaşılmıştır. Bu izolatların zoosporları ve vegetatif halleri görüntülenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anaerobik fungus, izolasyon, identifikasyon, Neocallimastigales.

## SUMMARY

Anaerobic fungi inhabit the gastro-intestinal tract of ruminants and the most non-ruminant herbivores. Host animals provide nutrient and anaerobic environment whilst anaerobic fungi are involved in biodegradation of plant particles ingested by the host animals. Since their first identification by Orpin, 6 genera and 19 species have been characterized so far. While *Neocallimastix*, *Piromyces* and *Caecomyces* are monocentric fungi, species of the genera *Orpinomyces*, *Anaeromyces* and *Cyllamyces* show polycentric development.

In this study, it was investigated 25 samples. From these samples one was Rumen fluid and the others were faeces from various herbivores. As a result of isolation processes, 6 isolates obtained belonged to *Neocallimastix* genus. The zoospores and vegetative forms of these isolates were monitored.

**Key Words:** Anaerobic fungi, isolation, identification, Neocallimastigales.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince, gerek ders aşamasında gerekse de laboratuvar çalışmalarında emeği geçen, bilgisini ve ilgisini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Semra İLHAN'a; anaerobik kültür teknikleri konusundaki tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN'e; beni laboratuvarlarına kabul ederek çalışma imkanı sunan, anaerobik funguslar konusunda tecrübe edinmeye katkıda bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE, Doç. Dr. M. Sait EKİNCİ ve Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL başta olmak üzere tüm BİGEM (Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği) Laboratuvarı çalışanlarına; malzeme desteğinden dolayı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a; tez çalışmam sırasında malzeme alımı için maddi destekte bulunan ESOGÜ-FBAM (Fen Bilimleri Araştırma Merkezi)'a;

Değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Bükay YENİCE GÜRSU, Nalan ÖZCAN, Semih FİDAN, İdris KARATOPAK ve tüm SAAL (Su ve Atıksu Analiz Laboratuvarı) çalışanlarına;

Tezimin yazım aşamasında ve kontrolünde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım İsa SIDİR ve Yadigar GÜLSEVEN'e

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Annem, babam ve canım kardeşim; tezimin tamamlanmasındaki en büyük yardımcılarımdır. Sizlere minnettarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.2. Rumen ve Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi .....	5
2.2.2. Rumen mikroflorasının etkileşimi ve fonksiyonları .....	10
2.3. Anaerobik Fungusların Kültüre Alınması .....	13
2.4. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü .....	15
2.4.1. Monosentrik fungusların yaşam döngüsü .....	16
2.4.2. Polisentrik anaerobik fungusların yaşam döngüsü.....	18
2.4.3. Hayatta kalabilen yapılar (Kist) .....	19
2.4.4. Anaerobik fungusların spor formları.....	20
2.5. Anaerobik Fungusların Dağılımı.....	21
2.5.1. Sindirim sistemi organlarındaki anaerobik funguslar .....	21
2.5.2. Anaerobik fungusların dünya genelinde dağılımları.....	22
2.6. Durağan Kültürlerde Gelişimin Belirlenmesi ve Anaerobik Fungusların Sayımı	22
2.7. Anaerobik Fungusların Taksonomisi .....	23
2.8. Anaerobik Fungusların Tanımlanmalarına Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	29
2.8.1. <i>Neocallimastix</i> sp. ....	30
2.8.2. <i>Piromyces</i> sp. ....	31
2.8.3. <i>Caecomyces</i> sp. ....	32
2.8.5. <i>Anaeromyces</i> sp.....	33
2.8.6. <i>Cyllamyces</i> sp.....	33
2.9. Anaerobik Kültür Teknikleri ve Fungusların Saklanması .....	34
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>37</b>
3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Sterilizasyonu .....	37
3.1.1. Rumen sıvısının saflaştırılması ve saklanması.....	37

3.1.2. Anaerobik besiyeri .....	38
3.1.3. Anaerobik besiyerinde bakteri büyümesini engelleyici antibiyotik ilavesi ..	41
3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması .....	41
3.2.1. Anaerobik fungusların izolasyonu .....	41
3.2.2. Anaerobik fungusların saflaştırılması .....	44
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>59</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hungate tüpü ve septalı kapakları.....	13
2.2 50 ml'lik serum şişeleri ve alüminyum güvenlik kapakları.....	14
2.3 Monosentrik anaerobik fungusların yaşam döngüsü.....	17
2.4 Anaerobik fungusların hareketli ve vejetatif fazları.....	18
2.5 Anaerobik fungusların yaşam döngüleri.....	19
2.6 Koyun rumeninin soldan görünüşü.....	21
3.1 Sığır rumeninden rumen sıvısının alınması.....	37
3.2 Santrifüjlendikten sonra -20 °C'de depolanan stok rumen sıvısı.....	38
3.3 Anaerobik besiyerinin hazırlanması ve besiyeri hazırlamada kullanılan düzenek.....	39
3.4 100 ml, 50 ml ve 25 ml'lik hacimlerde, serum şişelerinde hazırlanmış anaerobik besiyerleri.....	39
3.5 39 °C'de inkübe edilen anaerobik fungus kültürleri.....	42
3.6 CO <sub>2</sub> tüpü ve CO <sub>2</sub> 'li inkübatör.....	43
3.7 Samanlı besiyeri içeren anaerobik fungus kültür tüpleri.....	43
3.8 Üreme görülen tüplerdeki samanların öze yardımıyla taze besiyerine aktarılması.....	44
4.1 İdentifikasyon amacıyla gözlenen canlı zoospor ve kamçıları.....	49
4.2 Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler.....	49
4.3 <i>Neocallimastix</i> sp.'nin vejetatif görüntüsü. Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler.....	50
4.4 <i>Neocallimastix</i> sp.'nin vejetatif görüntüsü. Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler.....	50

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.5 Sığır dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'nin vejetatif görüntüsü.....	51
4.6 Sığır dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'nin vejetatif görüntüsü.....	51
4.7 Sığır dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'nin vejetatif görüntüsü.....	52
4.8 <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü.....	52
4.9 <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü.....	53
4.10 <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait zoosporun görüntüsü ve 4'ten fazla sayıda kamçıları.....	53
4.11 <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait farklı zoosporların görüntüleri.....	54
4.12 Parçalanmış spor kesesi.....	54
4.13 Deforme olmuş spor kesesi.....	55
4.14 Koyun dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait zoosporun görüntüsü.....	55
4.15 Koyun dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü...	56
4.16 Koyun dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü...	56
4.17 Sığır dışkısından izole edilen <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü.....	57
4.18 <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait vejetatif görüntü.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u><b>Çizelge</b></u>	<u><b>Sayfa</b></u>
2.1 Anaerobik fungusların genus ve türleri ile bazı morfolojik özellikleri.	4
2.2 Sığırların dışkılarındaki ve sindirim sistemi organlarının her birindeki pH ve kuru madde miktarları.....	8
2.3 Sığırlarda dışkı ve sindirim organları başına tallus oluşturan birim sayısı ve gram kuru madde başına fungal tallus oluşturan birim sayıları.....	9
2.4 Anaerobik fungusların sınıflandırılması.....	26
2.5 Anaerobik fungusların genus düzeyinde identifikasyon anahtarı.....	28
2.6 Anaerobik fungusların genus düzeyinde morfolojik özellikleri.....	29
2.7 Anaerobik fungus genusları, türleri ve isimlendirmede kullanılan referanslar.....	34
3.1 Anaerobik fungus besiyeri içeriği.....	40
4.1 Anaerobik fungus izolasyon çalışmalarının sonuçları.....	45



## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
°C	Derece Santigrat
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit gazı
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mg/ml	Miligram/mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
N <sub>2</sub>	Azot gazı
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum hidrojen karbonat
O <sub>2</sub>	Oksijen gazı
pH	Ortamdaki Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
w/v	Çözünen katı miktarı / çözücü hacmi
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µg/ml	Mikrogram/mililitre
<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
dk	Dakika
EMS	En Muhtemel Sayı
et al.	ve diğerleri
k.o.b.	Koloni oluşturan birim
sp.	Tür
t.o.b.	Tallus oluşturan birim
yy	Yüzyıl

## 1. GİRİŞ

Dünyada en yaygın organik bileşikler durumunda olan selüloz, hemiselüloz, pektin ve lignin bitki hücre duvarlarında bir araya gelerek bitkiye hem yapısal sağlamlığı hem de herbivorlar tarafından sindirilmeye karşı dayanıklılığı kazandırır. Bu nedenle tek mideli herbivorlar tarafından sindirilme oranları %50'yi bulmamaktadır. Ruminantlar tarafından daha yüksek oranlarda parçalanmaları ise rumenin zengin mikroflorası sayesinde olmaktadır. Çünkü ruminantlarda bitki hücre duvarlarının yıkımı genel olarak rumende gerçekleşir ve bu yıkımda gerek protozoa (Coleman, 1978), gerek bakteriler (Pettipher and Latham, 1979) ve gerekse funguslar (Orpin, 1977a) etkin bir şekilde rol almaktadırlar. Bu nedenle son 50 yıl içerisinde herbivorların sindirim sistemindeki mikroorganizmalar ve özellikle rumen mikrobiyal ekosistemi hakkındaki bilgiler hızlı bir şekilde artmıştır. Fakat sindirim sisteminin protozoa ve özellikle bakterilerinin kültüre alınmaları ile ileri düzeyde karakterize edilmelerine rağmen üçüncü grup mikroorganizmalar olan fungusların önemi ancak son 25 yıl içerisinde anlaşılmıştır. Bakterilerin aksine fungusların anaerobik olarak yaşayamayacakları görüşünün (Foster, 1949), Orpin'in (1975) daha önce protozoa olduğu sanılan kamçılı hücrelerin aslında zorunlu anaerobik fungusların zoosporları olduğunu göstermesiyle çürütülmüş ve bu tarihten itibaren anaerobik funguslar üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. 1970'li yılların ortalarından itibaren yapılan bu çalışmaların ışığı altında anaerobik fungusların gerek ruminant ve gerekse diğer memeli herbivorların sindirim sistemlerindeki varlıkları ve bitkilerin daha yüksek oranlarda sindirimine olan katkıları konusunda şüphe kalmamıştır.

Geviş getiren herbivorlarda mide dört bölümden oluşur; rumen, retikulum, omasum ve abomasum. Rumen, ruminant sindirim sisteminin hacim olarak en büyük kısmını teşkil eder ve retikulomla beraber, sığırlarda 100-150 litre, koyunlarda 10 litre hacmine ulaşan ve yoğun bir mikroorganizma popülasyonu içeren, büyük bir fermentör vazifesi görmektedir (Hobson and Wallace, 1982a).

Yeni doğmuş ruminantların midesindeki rumen bölümü çok küçük ve işlevsiz haldedir. Çünkü bu hayvanların o dönemdeki temel besin maddesi süttür ve sütün sindirimini rumende o dönemin ana mikroorganizmaları olan *Lactobacilli*, *Streptococci* ve *Clostridium* yapmaktadır (Hobson and Wallace, 1982b). Hayvan yaklaşık 2-3 haftalıkken rumen, hayvanın sütün yanı sıra saman ve tahıllarla da beslenmeye başlamasıyla birlikte büyümeye başlar. Yani rumenin gelişmesini tetikleyen etkenler, saman ve tahıl gibi besinlerin vücuda alınmaya başlamasıdır. Genç hayvanlar otlatılmaya başladıklarında hayatlarında başlıca gereksinim duydukları temel mikroorganizmaları da almış olurlar. Rumen, işlevselliğini bu erken gelişim safhası içinde kazanır ve rumenin 6 ila 9. aylarda tamamen olgunlaştığı varsayılır.

Bitkisel besinlerin protein değeri az olduğundan, geviş getiren hayvanlar çok yemek zorundadırlar. Sindirimden önce yiyeceklerini genişleyebilen rumenlerinde depolarlar. Rumen ve retikulum, depolanma ve mayalanma yeri olarak kullanılmaktadır. Eğer bu hayvanların midesinde rumen bölmesi gelişmezse, hayvanın yediği yiyeceklerden elde ettiği besin miktarı önemli ölçüde azalacaktır. Çünkü otçul olan bu hayvanların bitkiden başka bir şeyle beslenmek gibi bir seçenekleri yoktur. Bitki hücrelerinin çeperlerinin yapısında bulunan selülozun sindirimi zordur ve selülozun sindirimi için “selülaz” enzimine gereksinim vardır. Ruminantlar, sindirim sistemlerinde selülozu glikoza parçalayabilen enzimlere sahip bakteri, protozoa ve funguslara sahiptirler.

Bu çalışmanın amacı, herbivorların sindirim sistemindeki mikrofloranın önemli bir grubunu oluşturan ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek öneme sahip olan anaerobik fungusların çeşitli herbivorlardan izole edilmeleri, saflaştırılmaları ve tanımlanmalarıdır. Bunu takiben bir anaerobik fungus kültür koleksiyonunun oluşturulmasına öncülük etmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anaerobik Fungusların Keşfi

*Aspergillus fumigatus* ve *Mucor rouxii* gibi maya ve anaerobik funguslar rumenin anaerobik şartları altında hayatta kalabilmektedirler. Bu mikroorganizmaların, herbivorların sindirim sisteminde buldukları önceden de bilinmekteydi. Fakat bunların fonksiyonel olmadıkları veya hayvanların yedikleri besinlerin kontaminantları oldukları düşünülüyordu (Clarke and DiMenna, 1961). Rumenin iki ana mikrobiyal grupları olan bakteriler ve protozoonlarla karşılaştırıldıklarında anaerobik işkembe fungusları sindirim sistemi içerisinde üçüncü ana grup olarak keşfedilmişlerdir.

Liebetanz ve Braune tarafından *Sphaeromonas communis* ve *Callimastix frontalis*, 20. yy.nin başlarında ilk olarak tanımlanan anaerobik sindirim funguslarıdır (Ozkose, 2001). Fakat bunlar flagellalı protozoonlardan orijinleniyordu ve anaerobik fungusların zoosporları değildi. Bauchop (1983)'a göre anaerobik fungusların keşfinin geç olmasının temel sebebi, rumen mikrobiyologlarının çalıştığı rumen sıvısı süzütüsü ve çalıştıkları suşlardı. Rumen mikrobiyologları yaptıkları araştırmalarda rumen içeriğini süzerek sadece rumen sıvısını kullanmışlar ve dolayısıyla anaerobik fungusların tutunduğu bitki parçacıklarını gözlem dışı bırakmışlardır. Rumen funguslarının keşfinin geç olmasının diğer bir sebebi de fakültatif veya zorunlu anaerobik fungusların olamayacağına dair inançtı (Foster, 1949). Koyun işkembesinde anaerobik fungusların varlığını ilk olarak ortaya çıkaran Orpin'in (1974a,b,1975) raporlarına kadar, anaerobik fungusların varlığına dair bir bilgi bulunmamaktaydı. 1966 yılında Varva ve Joyon tarafından uzlaşması yapılan *Callimastix* türlerinin, *Neocallimastix* genusunda sınıflandırılabilceği belirtilmiştir (Orpin, 1975), akabinde *C. cyclopsis*'in zooflagellalı fungus olmaktan ziyade ilkel bir mantar olduğu görüşü öne çıkmıştır. Ancak ileriki çalışmalar *C. cyclopsis*'in sivrisinek larva paraziti olan *Caelomomyces psorophorae*'nin yaşam döngüsünün bir bölümü olduğunu göstermiştir (Ozkose, 2001).

İlk defa Orpin (1975) tarafından rapor edilen anaerobik fungusların keşfinden sonra, 13 tane monosentrik ve 6 tane de polisentrik fungus tanımlanmış ve 6 genus içerisinde sınıflandırılmıştır.

**Çizelge 2.1.** Anaerobik fungusların genus ve türleri ile bazı morfolojik özellikleri. Bazı genus ve türlerin isimleri zamanla değiştirilmiştir. Tablo içindeki isimler fungusların en son isimlerini gösterirken dipnotta ilk isimleri yer almaktadır.

Genus	Tür	İzolasyon kaynağı	Polisentrik Monosentrik	Kamçı sayısı	Rizoid tipi
<i>Neocallimastix</i>	<i>frontalis</i>	Koyun	Monosentrik	Çok	Dallanmış
	<i>patriciarum</i> <sup>1</sup>	Koyun	Monosentrik	Çok	Dallanmış
	<i>hurleyensis</i>	Koyun	Monosentrik	Çok	Dallanmış
	<i>variabilis</i>	Sığır	Monosentrik	Çok	Dallanmış
<i>Piromyces</i>	<i>communis</i> <sup>2</sup>	Koyun	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>dumbonicus</i> <sup>6</sup>	Fil	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>mae</i>	At	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>rhizinflatus</i> <sup>6</sup>	At	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>spiralis</i>	Keçi	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>minutus</i>	Geyik	Monosentrik	Tek	Dallanmış
	<i>citronii</i>	At	Monosentrik	Tek	Dallanmış
<i>Caecomyces</i>	<i>communis</i> <sup>4</sup>	Koyun	Monosentrik	Tek	Küresel
	<i>equi</i>	At	Monosentrik	Tek	Küresel
	<i>sympodialis</i>	Sığır	Polisentrik	Tek	Küresel
<i>Orpinomyces</i>	<i>joyonii</i> <sup>5</sup>	Koyun	Polisentrik	Çok	Dallanmış
	<i>intercalaris</i>	Sığır	Polisentrik	Çok	Dallanmış
<i>Anaeromyces</i>	<i>mucronatus</i>	Koyun	Polisentrik	Tek	Dallanmış
	<i>elegans</i> <sup>3</sup>	Sığır	Polisentrik	Tek	Dallanmış
<i>Cyllamyces</i>	<i>aberensis</i>	Sığır	Polisentrik	Tek	Küresel

<sup>1</sup>: *Neocallimastix frontalis*

<sup>2</sup>: *Piromonas communis*

<sup>3</sup>: *Ruminomyces elegans*

<sup>4</sup>: *Sphaeromonas communis*

<sup>5</sup>: *Neocallimastix joyonii*

<sup>6</sup>: *dumbonica & rhizinflata*

## 2.2. Rumen ve Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi

Otçul memelilerdeki sindirim sistemi yemek borusu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak ve körbağırsak dahilinde birçok organdan oluşmaktadır. İşkembeli otçullarda mideye ilaveten 4 alt bölüm daha vardır. Bunlar rumen, abomasum, retikulum ve omasumdur. Otçul hayvanlar iki değişik gruba ayrılabilir, geniş getirenler ve getirmeyenler ve bu iki grubun sindirim sisteminin mikroorganizmaları, yem malzemelerini yapısal değişikliğe uğratarak simbiyotik ilişki oluşturacak şekilde vücuda adapte olmaktadır (Hungate, 1966). Herbivorların her iki grubunda da ya sekum ya da ruminant mide, lifli bitki partiküllerinden besin olarak daha fazla faydalanmak için, yenilen bitkilerin tam olarak mikrobiyal parçalanmaya uğrayabilmesi amacıyla, bitkinin midede kalma süresini geciktirici şekilde modifiye olmuşlardır (Savage, 1977). Diğer taraftan, retikulo-rumendeki besin parçacıklarının daha uzun süre tutulma zamanı retikulo-rumenin kapasitesini sınırlayarak herbivorlardaki besin alımını kısıtlamaktadır. Mikroorganizmalar protein kazancına katkıda bulunurken ve selüloz gibi bitki polimerlerini (konak hayvan direkt olarak selülozu sindiremez) dimerlere (sellobiyoz) ve monomerlere (glikoz) parçalarken konak hayvanın da anaerobik şartları, su ve besin girişlerini sağlamasıyla, konak hayvan ve rumen mikroorganizmaları arasında mutualist bir ilişki gözlenmektedir (Gordon and Phillips, 1998).

Ruminantların düşük kaliteli bitki materyalini hayvansal ürünlere dönüştürmesi rumende bulunan mikroorganizmaların bitki polisakkaritleri olan selüloz ve hemiselüloz gibi yapısal maddeleri parçalama kabiliyetlerine bağlıdır. Rumen mikroflorası bitki hücre duvarını parçalayan enzimler üreten çok farklı anaerobik bakteri, fungus ve protozoa gibi mikroorganizmalardan oluşmuştur. Mikroorganizmalar, hayvanlar tarafından alınan yemin daha iyi değerlendirilmesi ve hayvanların ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin sağlanması için de genetik olarak işlenmektedir (Ekinci ve ark., 2005). Bu yüzden, rumen ekosisteminde hayati önemleri olan bakteriler, protozoonlar ve fungusların hem hayvansal dokuların gelişmesi hem de bitkisel bileşenlerin besinlere dönüştürülmesindeki rolleri önem kazanmış ve üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

### 2.2.1. Rumen mikroflorasının tespiti

Yeni doğan ruminantların rumenlerinde selülotik mikroorganizmalar eksiktir ve gerekli olan besinlerini aldıkları sütten sağlamaktadırlar. Ana besin kaynağı süt olan yenidoğan ruminantların, yaşamlarının erken dönemlerinde Streptokokuslar ve Laktobasilluslar sindirim kanallarında baskındırlar (Hobson and Wallace, 1982b). Yenidoğan ve genç hayvanların yemek borularında sadece laktik asit bakterileri yoktur, ayrıca olgun hayvanlarda bulunanlardan farklı olarak mikrobiota ailesinin diğer elemanları da bulunmaktadır. Fonty ve arkadaşları (1987), kuzuların ilk 2-10 günlükken rumenlerinde *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* ve *Clostridium* sporlarının baskın olduğunu rapor etmişlerdir. 2. günden sonra toplam fakültatif ve aerobik bakterilerin (çoğunlukla *Streptococci* ve *E. coli*) sayısı 10-100 kez daha düşük belirlenmesine rağmen zorunlu anaerobik bakteriler  $10^9$  kob (koloni oluşturan birim) / ml olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda baskın olarak bulunan *Ruminococcus* bakterileri, kuzular 7. günlükten itibaren gözlenmiştir ve sayıları da oldukça düşüktür ( $10^3$ - $10^4$  kob / ml) (Fonty et al., 1987).

Jayne-Williams (1979) yenidoğan buzağılardaki bakteri sayımları ile ilgili çalışmalar yapmış, 4. günden sonra bakteri sayısını  $10^9$ - $10^{10}$  kob / ml olarak belirlemiş ve buzağı 63 günlük olduğunda ilk kez selülotik bakterileri (*Ruminococcus*) gözlemlemiştir. Bu sonuçlar rumenin yaşamın ilk günlerinde fonksiyonel olmamasına rağmen hızlı olarak aerobik, fakültatif ve anaerobik bakteriler tarafından kolonize edildiğini göstermiştir. Bu bakterilerin erken dönemdeki rollerinin iyi tanımlanamamasına rağmen, erken dönemdeki sindirim fonksiyonlarında yer aldıkları farz edilmektedir.

Anaerobik sindirim funguslarının ortak habitatları, yetişkin ruminantların sindirim sistemidir, bununla birlikte anaerobik funguslar yavru hayvanlardan 7. günden önce izole edilememişlerdir. Fonty ve arkadaşları (1987) çiftlik şartlarında yetiştirilen (hazır yemle beslenen) ya da besinleri yetişkin hayvanlardan ayrılmış kuzuların rumenlerindeki mikrobiyal popülasyonu, 2 ila 110 günlük periyotlar içerisinde

tanımlamak için çalışmalar yapmıştır. *Neocallimastix* genusuna benzeyen anaerobik funguslar ilk kez kuzular 8 günlük iken gözlenmiştir ( $10^2$ - $10^3$  zoospor / ml) ve üç hafta içerisinde yetiştirme tarzına bakılmaksızın bütün kuzularda anaerobik funguslar belirlenebilmiştir (Fonty et al., 1987). Theodorou ve arkadaşları (1993) da anaerobik fungusları yenidoğan kuzu ve buzağuların 4-5 haftalıkken taze dışkılarında gözlemlemeyi başarmıştır. Elde edilen verilere göre, farklı olgunluktaki otçul hayvanların sindirim sistemi organlarında yer alan anaerobik fungus sayısının farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (Davies et al., 1993b) (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3).



**Çizelge 2.2.** Sığırların dışkılarındaki ve sindirim sistemi organlarının her birindeki pH ve kuru madde (KM) miktarları\* (Davies et al., 1993b)

ORGAN	Sağmal inek (a)		Genç boğa (b)		Olgun boğa (c)	
	pH	Organ başına toplam KM (g)	pH	Organ başına toplam KM (g)	pH	Organ başına toplam KM (g)
Retikulo-rumen	5,7±0,64	9656±1085	6,7±0,13	3881±584	6,5±0,21	6339±476
Omasum	6,3±0,32	463±244	6,6±0,17	329±97	6,6±0,12	1054±143
Abomasum	4,9±0,44	290±261	3,3±0,47	152±10	3,3±0,10	252±27
İnce bağırsak	7,0±0,34	1077±367	5,7±0,04	443±66	6,7±0,00	500±39
Sekum	6,7±0,06	269±114	7,0±0,12	169±5	6,7±0,06	179±70
Kalın bağırsak	6,6±0,09	290±85	6,9±0,05	151±32	6,7±0,00	277±69
Dışkı	6,5±0,17	hesaplanamaz	6,9±0,07	hesaplanamaz	6,7±0,00	hesaplanamaz

\*Hayvanlar: (a) Canlı ağırlığı ortalama 570 kg olan ve günlük 3 kg, arpa ağırlıklı *ad libitum* silaj ile beslenmiş Friesian/Holstein cinsi sağmal inek; (b) Canlı ağırlığı ortalama 244 kg olan 8 aylık ve günlük yemine %10 balık unlu besin maddesi eklenmiş *ad libitum* silaj ile beslenen Friesian/Holstein cinsi genç boğa; (c) Canlı ağırlığı ortalama 497 kg ve herhangi bir katkı maddesi olmadan *ad libitum* silaj ile beslenen 20 aylık Friesian/Holstein cinsi olgun boğa.

Hayvanlarda pre-gastrik organlar (retikulo-rumen ve omasum), post-gastrik organlar (sekum ve kalın bağırsak), ince bağırsak ve dışkı pH'sı nötral ve düşük pH aralığındadır. Gastrik yıkımın gerçekleştiği abomasum içerisindeki sindirim özütünün pH'sı oldukça asidiktir ve sağmal ineklerde 4,9 ve genç ve olgun boğalarda ise 3,3 civarındadır.

Bu grup hayvanların sindirim sistemlerindeki toplam kuru maddenin yaklaşık olarak %84'ü pre-gastrik organlarda, %10,6'sı abomasum ve ince bağırsakta ve %5,4'ü de post-gastrik organlarda bulunmaktadır.

**Çizelge 2.3.** Sığırlarda dışkı ve sindirim organları başına tallus oluşturan birim (tob) sayısı ve gram kuru madde (g KM) başına fungal tallus oluşturan birim sayıları. (Davies et al., 1993b)

ORGAN	tob (g KM) <sup>-1</sup>				Organ başına tob		
	Sağmal inekler	Genç boğalar	Olgun boğalar	Sağmal inekler	Genç boğalar	Olgun boğalar	
Retikulo-rumen	6,03x10 <sup>4</sup>	1,17x10 <sup>5</sup>	2,04x10 <sup>5</sup>	5,82x10 <sup>8</sup>	4,54x10 <sup>8</sup>	1,29x10 <sup>9</sup>	
Omasum	8,91x10 <sup>4</sup>	1,82x10 <sup>5</sup>	1,20x10 <sup>5</sup>	4,13x10 <sup>7</sup>	5,99x10 <sup>7</sup>	1,26x10 <sup>8</sup>	
Abomasum	2,69x10 <sup>3</sup>	5,75x10 <sup>3</sup>	3,02x10 <sup>4</sup>	7,80x10 <sup>5</sup>	8,74x10 <sup>5</sup>	7,61x10 <sup>6</sup>	
İnce bağırsak	8,31x10 <sup>2</sup>	2,18x10 <sup>2</sup>	1,29x10 <sup>4</sup>	8,95x10 <sup>5</sup>	9,66x10 <sup>4</sup>	6,45x10 <sup>6</sup>	
Sekum	7,08x10 <sup>3</sup>	2,88x10 <sup>4</sup>	1,41x10 <sup>4</sup>	1,90x10 <sup>6</sup>	4,87x10 <sup>6</sup>	2,52x10 <sup>6</sup>	
Kalın bağırsak	3,31x10 <sup>3</sup>	4,90x10 <sup>4</sup>	4,27x10 <sup>4</sup>	9,60x10 <sup>5</sup>	7,40x10 <sup>6</sup>	1,18x10 <sup>7</sup>	
Dışkı	6,03x10 <sup>3</sup>	2,10x10 <sup>4</sup>	9,77x10 <sup>4</sup>	hesaplanamaz	hesaplanamaz	hesaplanamaz	

Bu dağılım sağmal ineklerde 6,03x10<sup>4</sup> tob (g KM)<sup>-1</sup> ve olgun boğalarda 2,04x10<sup>5</sup> tob (g KM)<sup>-1</sup> arasında hesaplanmıştır.

Protozoa, rumende yer alan üç ana mikrobiyal gruptan biri olmasına rağmen yenidoğan kuzuların sindirim sistemlerinde nispeten geç gözlemlenmiştir. Fonty ve arkadaşları (1984) protozoayı (*Entodinium* genusu) yenidoğan kuzuların rumenlerinde, doğumdan sonraki 15 ila 20. günler arasında gözlemlemiştir. Aynı çalışmada *Polyplastron*, *Epidinium* ve *Eudiplodinium* genusları üyelerini 25 gün içerisinde ve *Isotrica* genusu üyelerini ise 50 günlük olduklarında gözlediklerini açıklamışlardır. 2. ayda toplam protozoa sayısı  $5,7 \pm 3,6 \times 10^5$  adet / ml olarak belirlenmiştir (Fonty et al., 1984).

Protozoa ve bakterilerin yetişkin hayvanlardan yavrulara geçişinin ya emzirmeyle, ya salyayla ya da ortak kullanılan su vasıtasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Çünkü geviş getirme esnasında bol miktarda rumen içeriği ağza taşınmakta ve burada kaldığı süre içerisinde rumen mikroorganizmaları salya ile temas etmektedir (Hobson, 1971). Anaerobik fungusların ise herbivorlar arasında gerek salya gerekse yeme bulaşmış olan dışkı yoluyla transfer oldukları ileri sürülmektedir (Lowe et al., 1987b; Milne et al., 1989). Theodorou ve arkadaşları (1990)'nın kurumuş dışkıdan 10 ay sonra anaerobik fungusları izole etmeleri bu düşünceyi destekler durumdadır.

### **2.2.2. Rumen mikroflorasının etkileşimi ve fonksiyonları**

Protozoanın temel foksionu, rumendeki bakteri ve funguslar yolu ile yiyecek olan bitkisel biyokütlenin parçalanmasına katılmalarıdır. Bununla birlikte bu mikrobiyal topluluk aynı zamanda sindirim organlarının aşağıda belirtilen hayati fonksiyonlarını sürdürmesine yardımcı olmaktadır.

Protozoa geçen yüzyılın başlangıcında ilk olarak rumende tanımlanmıştır. 15 genus ve 100 türden daha fazlasının hayvanların sindirim sisteminde yerleştiği bilinmektedir. Fakat sadece 20 kadarı laboratuvar şartları altında başarılı olarak kültüre alınabilmiştir (Williams and Coleman, 1997). Ruminantları, büyük miktarda nişasta içeren besinler ile beslemek laktik asit oluşumunun potansiyel gelişmesiyle rumendeki laktik asit üretiminde bir artışa sebep olmaktadır. Rumen siliat protozoonları bu laktik

asidi almada etkilidirler ve bu yüzden laktik asit asidosiz oluşumunu engellemede ve laktat metabolizmasını düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (Williams and Coleman, 1997). Bundan başka protozoanın rumende bulunması besinin rumende tutulma zamanını ve rumen içeriğindeki kuru madde miktarını, uçucu yağ asitlerinin derişimini ve oranını, fermentasyon ve çevresel pH'nın kararlılığını etkilemektedir (Leng and Nolan, 1984; Williams and Coleman, 1992; Williams and Coleman, 1997). Üstelik bakırın absorpsiyon ve tutulma zamanı protozoa bulundurmayan hayvanlarınkinden daha yüksek olduğundan dolayı rumenden protozoanın çıkarılması kronik bakır zehirlenmesine yol açabilmektedir (Ozkose, 2001).

Dışarıdan alınan bakteriler, rumen metabolizmasında protozoanın pozitif etkilerine zıt olarak konak hayvanın rumenindeki protein kullanılabilirliğini kötü yönde etkileyebilmektedir. Bu, hayvanların protein değeri olarak düşük besinlerle beslenmelerinden kaynaklanmaktadır (Williams and Coleman, 1997). Ek olarak yün büyümesinin ve hayvan performansının, protozoası çıkarılmış hayvanlarda arttığı da rapor edilmiştir. Simbiyotik ve parazitik yaşam stilleri özellikle protozoa ve bakteriler arasında da gözlemlenmesine rağmen rumen protozoası ve diğer rumen organizmaları arasında çok açık ve iyi bilinen ilişki av-avcı ilişkisidir. Tam mekanizma ve yapı iyi saptanamamasına rağmen, rumen protozoonları tarafından tuzağa düşürülen bakteri yutulmakta ve sitoplazmik vakuollerde parçalanmaktadır (Coleman, 1989; Williams and Coleman, 1992). Fungal tallusların ve zoosporların rumen protozoonları tarafından yutulup parçalanabileceği de hücre içi ve hücre dışı çalışmalarda bazı kanıtlarla da gösterilmiştir (Orpin, 1975; Joblin, 1990).

Rumendeki protozoal aktiviteler ve bunların rumen metabolizması üzerindeki etkileri, hayvanlara ve besinlerine göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Bundan başka daha kesin çalışmalar, rumen fonksiyonları üzerindeki protozoanın gerçek etkilerini tespit etmek için gereklidir. Rumen protozoonları, konak hayvanların büyütülmesi ve gelişmesi için esas olmamasına rağmen bunların rumendeki varlığı belirgin etkiler gösterebilir (Williams and Coleman, 1997).

Rumen ekosistemindeki bakteri ve funguslar arasındaki etkileşimler bilinmektedir. 1980'li yılların başlarında Bauchop ve Mountfort (1981) ve Mountfort ve arkadaşları (1982) tarafından rapor edilen öncü çalışmalar anaerobik funguslar ve metanojenik bakteriler arasındaki etkileşimi tanımlamıştır. Bu çalışmalardan birinde anaerobik bir fungus türü olan *Neocallimastix frontalis*'in, filtre kağıdını parçalamasının metanojenik bakterilerin varlığında daha fazla olduğu gösterilmiştir. Örneğin, *N. frontalis*'li yardımcı kültürdeki *Methanosarcina barkeri* ve *Methanobrevibacter* spp. filtre kağıdının kuru madde kaybını sırasıyla %53'ten %69'a ve %87'ye yükseltmiştir (Mountfort et al., 1982). Üç metanojenik türün bulunması durumunda *N. frontalis*, filtre kağıdı selülozunun hemen hemen tamamını (%98) çözmede başarılı olmuştur (Mountfort et al., 1982). *N. frontalis* ve *Caecomyces communis*, *Methanobrevibacter ruminantium* ve *Methanobrevibacter smithii* ile kültürlendiğinde fungal büyüme de tetiklenmektedir (Joblin, 1990; Bernalier et al., 1991). Metanojenik bakteri ile *P. communis*'in yardımcı kültürü iyonoforlara (monensin, lasalocid) karşı fungusun direncini de arttırdığı gözlenmiştir (Stewart and Richardson, 1989). İyonoforlar ruminal siliatların ve anaerobik fungusların gelişimini engellemektedir. *In vitro* çalışmalar, fungusların iyonoforlara oldukça hassas olduğunu göstermiştir (Taluğ ve Özkul, 1999).

Genelde fungusların gelişim hızı rumendeki bakterilerde olduğundan daha yavaştır ve fungal büyüme, selülotik olmayan rumen bakterileri (Bernalier et al., 1991) ve *Ruminococcus albus* ve *R. flavefaciens*'in bazı suşları ile sınırlandırılabilir. Bu faktörler rumendeki lif parçalanması için fungusun etkinliğini negatif yönde değiştirir (Joblin, 1990; Fonty and Gouet, 1994). Örneğin *P. communis* ve *S. ruminantium* içeren bir yardımcı kültür ile parçalanmış selülozun miktarı tek başına fungal monokültür ile parçalanandan %50 daha azdır (Bernalier et al., 1991). Bundan başka bu iki mikrobiyal popülasyonun saldırı modu ve kolonize ettikleri substratın fiziksel formu oldukça farklıdır. Anaerobik funguslar hücrelerin içine girerek substratları bozarken selülotik rumen bakterileri hücrenin yüzeyinden hücre duvarını aşındırırlar.

Anaerobik funguslar bitki materyallerinin bazı kısımlarına zarar vermesine rağmen (Bauchop, 1979; Ho et al., 1988) bunlar aynı zamanda sağlam bitki dokularına zarar vermeden de kolonize olabilirler (Ho et al., 1988).

### 2.3. Anaerobik Fungusların Kültüre Alınması

Rumen, redoks potansiyelinin -250 ve -450 mV arasında olmasından dolayı, oldukça yüksek bir anaerobik ortamdır (Hobson and Wallace, 1982b). Normal şartlar altında rumenin pH'sı 6,5 civarında ve sıcaklığı ise 39 °C'dir. Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda, rumenin şartlarının benzeri sağlanabilmiştir. Hobson (1969), Hungate (1966; 1969), Bryant (1972) ve rumen bakterileri ile ilgili çalışmalar yapanlar, rumen araştırmaları için birçok kültür teknikleri geliştirmişlerdir.

Anaerobik funguslar genel olarak ya 10 ml'lik Hungate tüplerinde ya da 60 ml'lik serum şişelerinde sıvı besiyerinde büyütülürler. Anaerobik fungusların büyütülmesinin, ayrıca sürekli çalkalamalı kültürlerde de yapılabileceği rapor edilmiştir (Zhu et al., 1996; 1997). Joblin (1981), anaerobik fungusların çoğaltılması ve izolasyonunun "roll tube" (dönen tüp) tekniği ile de yapılabileceğini göstermiştir. Hungate tüplerinde ya da serum şişelerinde yaklaşık olarak % 40'luk kullanılabilir bir boşluk bırakılır ve bu boşluk ya %100 CO<sub>2</sub> ya da %70 N<sub>2</sub> ve %30 CO<sub>2</sub> karışımıyla doldurulur.



Şekil 2.1. Hungate tüpü ve septalı kapakları



**Şekil 2.2.** 50 ml'lik serum şişeleri ve alüminyum güvenlik kapakları

Genel uygulama olarak besiyeri içerisine resazurin eklendikten sonra besiyeri açık sarı renk alıyorsa, oksijensiz; ya da koyu kahve renk alıyorsa oksijenlidir. Sodyum sülfat ya da sistein-HCl genellikle kimyasal indirgeyici olarak besiyerlerine eklenir. Besiyerinin pH'sı tampon görevi yapan  $\text{NaHCO}_3$  eklendikten sonra 6,5 ile 8,5 arasında sabitlenir. Fungal besiyerleri ayrıca mineral, protein ve vitamin kaynakları da içerirler (Orpin, 1976). Santrifüj edilmiş rumen sıvısı birçok besiyerinin önemli bir katkı maddesi olmasına rağmen, rumen sıvısı olmasa da anaerobik funguslar kültüre edilebilirler (Lowe et al., 1985). Besiyerlerinde karbon kaynağı olarak çözünebilir (glikoz, ksiloz veya sellobiyoz) ya da çözünemez (selüloz, büyük bitki parçacıkları) substratlar kullanılabilir. Besiyerlerinde çözünebilir hazır enerji kaynakları kullanıldığında durağan kültürlerin inkübasyon süreleri 1-3 gün; aksi halde selüloz veya buğday samanı gibi enerji kaynakları kullanıldığında ise 4-7 gün arasında değişmektedir (Özköse ve ark., 2003).

Bu inkübasyondan sonra funguslar mutlaka yeni besiyerlerine transfer edilmelidirler. Çünkü inkübasyon süresinin son dönemlerinde fermentasyonun son ürünleri olan özellikle uçucu yağ asitleri açığa çıkar ve ortamın pH'sı düşer. pH'nın fungusların yaşamı için uygun değerlerin dışına çıkmasıyla fungal yaşam önlenmektedir

(Joblin and Naylor, 1993). Bu nedenle funguslar belli bir büyüme oranına ulaştıktan sonra yeni besiyerlerine transfer edilmelidirler.

Laboratuvar şartları altında anaerobik funguslar kesikli kültürlerde 5-15 gün hayatta kalabilmişlerdir (Milne et al., 1989).

Anaerobik funguslar için optimum inkübasyon sıcaklığı 39 °C'dir ve 33 °C'nin altında ve 41 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kist oluşturamazlar (Lowe et al., 1987c).

#### **2.4. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü**

Anaerobik fungusların rumendeki yaşam döngüsü 2 aşamadan oluşur; a: rumen sıvısında serbest yüzen zoosporlar ve b: katı saman parçalarına bağlı vejetatif hal. Orpin (1975)'e göre; rumen sıvısındaki *Neocallimastix* sp'nin zoosporlarının serbest kalması hayvan beslendikten sonraki ilk 15-30 dk içinde maksimuma ulaşır, fakat *Sphaeromonas* ve *Piromonas* (daha sonra adları sırasıyla *Caecomycetes* ve *Piromycetes* olarak değişmiştir) için bu durum 1 saat kadar sürer (Orpin, 1977b). Son zamanlarda Ho ve Bauchop (1991) zoosporlardaki izolatların liberasyonunun, taze besiyeri içine kültürler transfer edildikten sonraki 17-30 dk içinde meydana geldiğini göstermişlerdir.

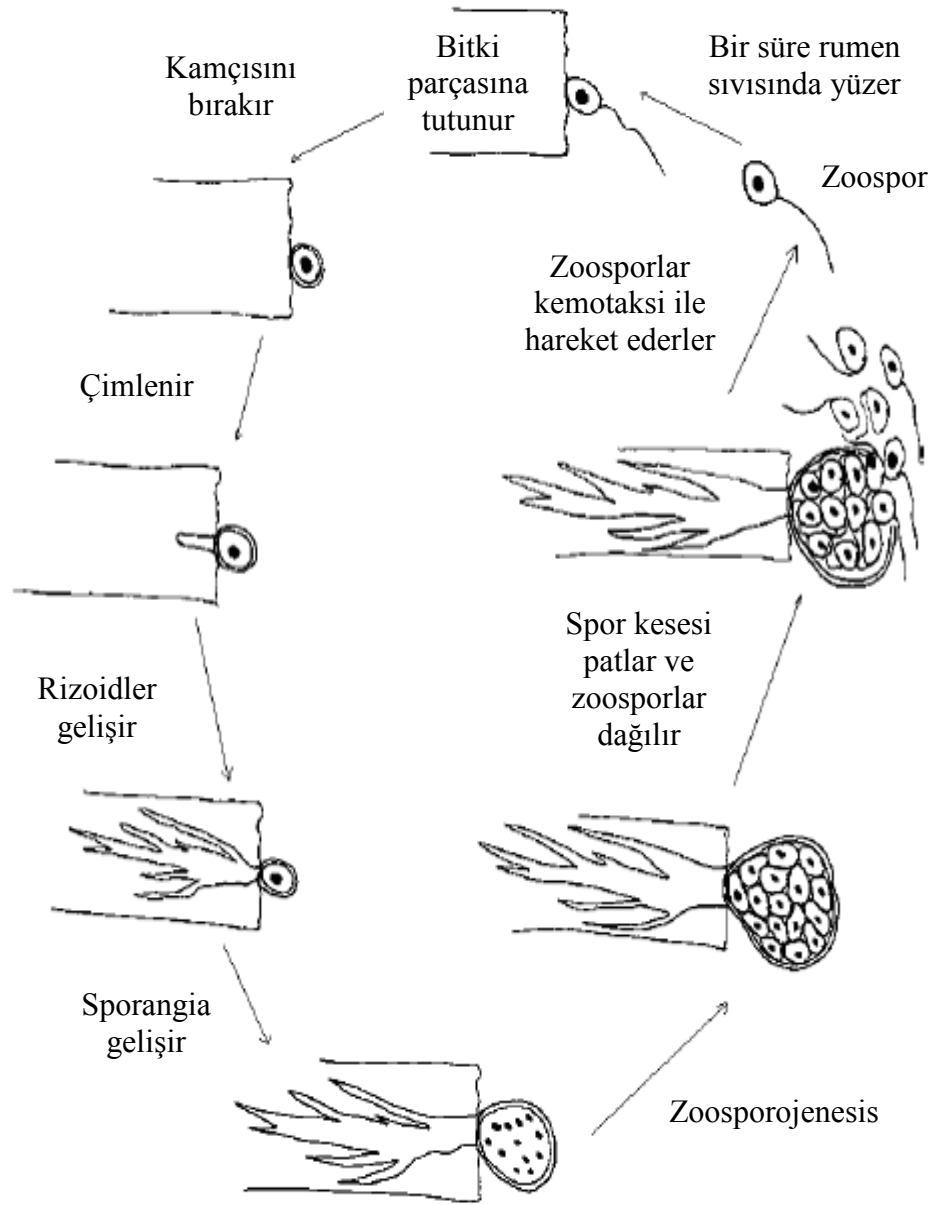
Joblin (1981) ve Lowe ve arkadaşlarına (1987a) göre *Neocallimastix* sp'nin yaşam döngüsü 24-32 saat sürer. Fakat sindirim sistemindeki yaşam döngüleri uygun şartlar altında 8 saat içinde tamamlanabilmektedir (Orpin, 1977c). Bunun yanı sıra Orpin ve Greenwood (1986) *Neocallimastix frontalis*'teki zoospor oluşumunun hem, hemin ve hematin ile uyarılabilir ve katalaz ve peroksidaz ile daha küçük bir alana indüklenebilir olduğunu göstermişlerdir. Polisentrik funguslar için taze besiyeri içine sporangiyumun transferi zoospor oluşumunu tetikler ve eğer yeni oluşmuş zoosporangiyum taze besiyerine transfer edilirse zoosporların maksimum hareketi gözlenebilir. Sonuç olarak optimum zaman ve fizyolojik durumda zoosporangiyumun transferi, kısa sürede zoospor oluşumu elde edilmesinde önemlidir (Ho and Bauchop, 1991).



### 2.4.1. Monosentrik fungusların yaşam döngüsü

Monosentrik anaerobik fungusların yaşam döngüleri Şekil 2.3.'te gösterilmiştir. Zoospor oluşumunun takibinde serbest yüzen zoosporlar işkembe sıvısında ve sıvı besiyerinde birkaç saat hareketli kalırlar (Orpin and Bountiff, 1978; Lowe et al., 1987a). Zoosporlar yeni yenmiş bitki parçalarına kemotaksi yoluyla yönelirler (Orpin and Bountiff, 1978). Substrat içerisine alınmadan hemen önce zoosporlar flagellalarını kaybederler. Substrat içine aldıktan sonra vejetatif büyüme başlar ve rizoidal yapılar gelişir. Rizoidal yapının büyümesi Lowe ve arkadaşları (1987a) tarafından *N. hurleyensis*'te, Orpin ve Munn (1986) tarafından *N. patriciarum*'da başarılı bir şekilde çalışılmıştır. Bu türlerde zoospor kist formuna dönüşmeden önce rizoid büyük ölçüde uzar. Kist büyümesi, gelişen zoosporanjiyanın büyümesiyle rizoidlerin dallanması ve büyümesiyle devam eder. Zoosporanjiyanın içindeki çekirdek iki veya daha fazla sayıda çekirdek ile sonuçlanacak olan mitotik bölünme için hazır hale gelir ve son olarak zoosporlar sporangiyum duvarından serbest bırakılırlar (Munn et al., 1988; Munn, 1994). Zoosporun farklılaşması tamamlandığında, zoosporangiyum duvarı zıt bir yönde parçalanır, septum ve zoosporlar ayrılır (Lowe et al., 1987a). Zoosporlar dağıldıktan sonra çekirdek içermeyen zoosporangiyum ve tallus parçalanır (Lowe et al., 1987a).

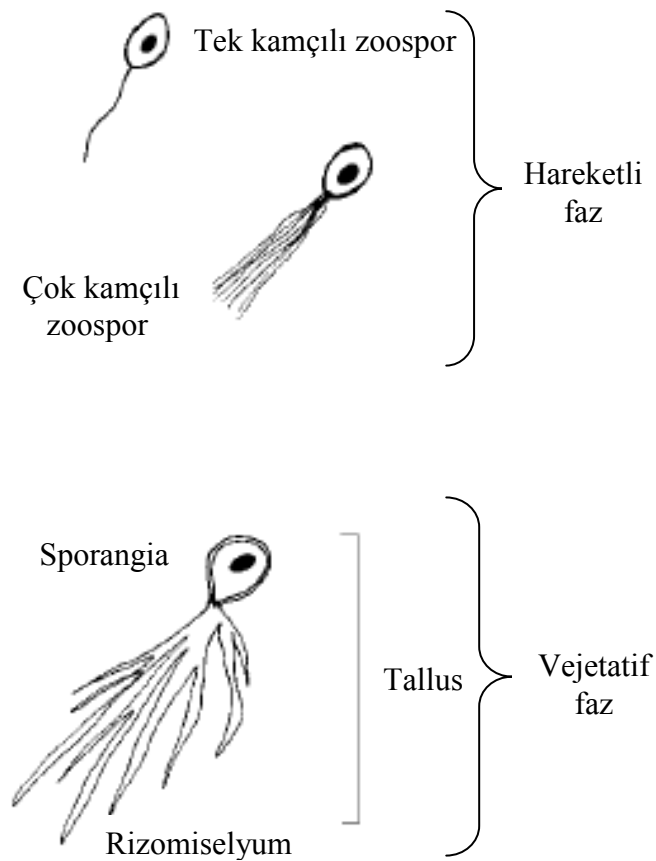
Monosentrik fungal gelişimde, kapsüllü zoospor nükleusta kalır ve zoosporangiyum içinde büyür. Bu süreye “endojenyus zoosporangiyal” gelişme denir. Çekirdek bir germ tüpüne veya rizomiselyuma doğru, zoosporun dışına göç ettiğinde ekzojenyus zoosporangiyal gelişme de mümkündür ve zoosporangiyal gelişme bu kısımda meydana gelir (Barr et al., 1989; Ho et al., 1993c). Monosentrik yaşam döngüsünde fungal tallus başına sadece bir zoosporangiyum oluşturulur, çekirdek zoosporangiyumla sınırlanır ve rizoidal yapı bulunmaz (Trinci et al., 1994).



Şekil 2.3. Monosentrik anaerobik fungusların yaşam döngüsü (Wulff, 2001).

### 2.4.2. Polisentrik anaerobik fungusların yaşam döngüsü

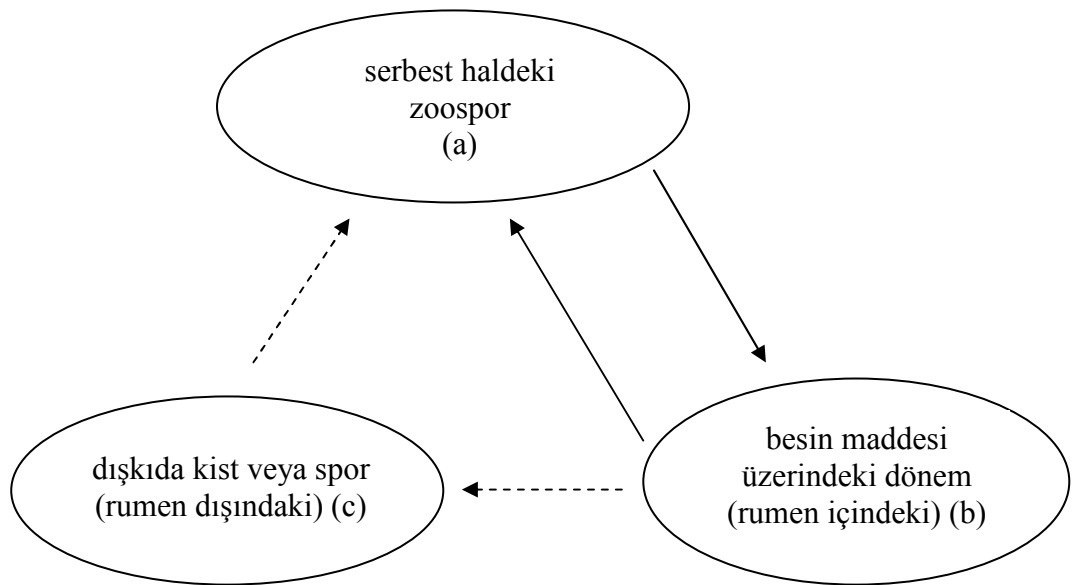
Polisentrik türlerin yaşam döngüleri monosentrik türlere göre daha az çalışılmıştır. Polisentrik funguslarda kapsüllü zoosporlar substrat parçacıkları üzerinde çimlenir ve rizoidal yapılar üretir. Çekirdek rizoidlerin içine, kapsüllü zoosporların dışına (ekzojenyus zoosporangial gelişme) göç eder ve zoosporlar gereksiz olur (Breton et al., 1989). Göç eden çekirdekler, birçok çekirdeği üretmek için mitotik bölünmeye maruz kalır (Ho et al., 1990). Sonuç olarak tallus başına birçok zoosporangia oluşur. Böylece polisentrik funguslarda hem zoosporangia hem de rizomiselyum çekirdek içerir (Trinci et al., 1994).



**Şekil 2.4.** Anaerobik fungusların hareketli ve vejetatif fazları (Wulff, 2001).

### 2.4.3. Hayatta kalabilen yapılar (Kist)

Anaerobik funguslar, zorunlu anaerobik olmaları ve oksijene karşı toleranslı olmamalarına (Orpin, 1975) rağmen taze dışkıdan izole edilebilmekte (Lowe et al., 1987b; Wubah et al., 1991a) ve kuru dışkıda da 10 ay hayatta kalabilmektedirler (Milne et al., 1989; Theodorou et al., 1990). Bu sonuçlar, anaerobik fungusların oksijene toleranslı olan yaşamsal bir forma sahip olabileceğini göstermektedir (Davies et al., 1993a, b). Bu sindirim funguslarının dışkıda hayatta kalabilme kabiliyetinden dolayı, Davies ve arkadaşları (1993b) şöyle bir sonuca varmıştır: Anaerobik fungusların yaşam döngüleri üç kısımdan oluşur a) serbest zoosporlar, b) vejetatif tallus (rumen içindeki), c) hayatta kalabilen yapılar (rumen dışındaki).



**Şekil 2.5.** Anaerobik fungusların yaşam döngüleri (Davies et al., 1993b). Sürekli oklar normal yaşam halkasını gösterirken, kesikli oklar dışkıdaki oksijene dayanıklı alternatif halkayı göstermektedir.

Bunların yanı sıra bitki partiküllerine yapışmış olan fungal zoosporangia, dışkıdan yeniden izole edilip, yıkanıp, kurutulup ve birkaç gün havada tutulduktan sonra taze kültür ortamına inoküle edilmiş ve bu zoosporangiyumlar tekrar üretilebilmiştir (Nielsen et al., 1995).

#### 2.4.4. Anaerobik fungusların spor formları

Spor terimi, yeniden üretilebilir anlamını karşılayan geniş bir terimdir fakat bu terimi tanımlamak sanıldığı kadar kolay değildir. Buna rağmen sınırlı ve kesin bir tanımdan daha ziyade genel bir tanım birçok mikolog tarafından yapılmıştır. Gregory (1966)'nin tanımına göre bir spor, düşük su içeriği ve düşük bir metabolik hıza sahip, hayatta kalabilme özelliği olan yapıdır. Alexopoulos ve Mims (1979)'e göre bir spor, aynı türün yeni bireylerinin üretiminde görev alan, bir embriyo olmaksızın, basit bir üreme birimidir.

Funguslar tarafından üretilen sporları zenospor (xenospor) ve memnospor olarak iki ana grupta toplamak mümkündür. Zoospor, conidia, sporangiospor ve basidiosporlar tarafından temsil edilen zenosporlar genel olarak kısa süreli yaşarlar ve yeni bir fungus oluşumu için uzaklara yayılırlar. Buna karşılık oospor, zygospor ve chlamydosporlarca temsil edilen memnosporlar orijinlerinden uzaklaşmazlar ve kötü çevre şartları esnasında fungusun gelecek generasyonu için hayat hakkı sağlarlar (Özköse ve ark., 2003). Bilinen bütün anaerobik funguslar zenospor (örneğin zoosporlar) üretirler ve bu konu detaylı olarak tanımlanmıştır. Fakat memnosporların anaerobik funguslar tarafından üretimlerinin gözlenmesi oldukça yenidir (Brookman et al., 2000a; Ozkose, 2001). Memnosporlara benzer yapıları Ho ve arkadaşları (1988) su mandalarının sindirim sisteminde, Wubah ve arkadaşları (1991a) ise laboratuvarında durağan kültürlerde gözlemlemiş fakat bu araştırmalarda gözlemlenen yapılar gelecek generasyonda canlılık bulamamıştır. İlk defa sığırdan izole edilmiş olan *Anaeromyces* genusuna ait izolelerde gözlenmiş olan sporlar fungusun durağan kültürlerde buğday samanı üzerinde yetiştirildiklerinde maksimum 15 gün olan (Milne et al., 1989) canlılık süresini yaklaşık bir yıla kadar uzatmıştır (Ozkose, 2001).

## 2.5. Anaerobik Fungusların Dağılımı

### 2.5.1. Sindirim sistemi organlarındaki anaerobik funguslar

Anaerobik funguslar Asya fillerinden antilopa kadar birçok otçulun sindirim sisteminden veya dışkı örneklerinden izole edilmiştir (Trinci et al., 1994). Anaerobik fungusların spesifik konakçı mikroorganizmalar olmamasına rağmen işkembesiz otçullardan izole edilebildiği henüz rapor edilmemiştir. Rumenin, anaerobik funguslar için temel habitat olduğu farzedilir. Fakat bitki biyokütlesinin sindirimi esnasında, bitki parçalarına yapışmış olan hem zoosporların hem de tallusun retikulumun dışına; ince ve kalın bağırsağın içine aktığı da farzedilir (Dehority and Orpin, 1997). Bu tahmin Davies ve arkadaşları (1993b) tarafından ispatlanmıştır. Davies'in raporlarına göre anaerobik funguslar; retikulo-rumenin omasum, abomasum, ince bağırsak, sekum ve kalın bağırsak bölümlerini içeren bütün sindirim kısımlarından izole edilebilmiştir.



**Şekil 2.6.** Koyun rumeninin soldan görünüşü. **1.** Atrium ruminis, **2.** Saccus dorsalis, **3.** Saccus ventralis, **4.** Recessus ruminis, **5.** Saccus cecus caudodorsalis, **6.** Saccus cecus caudoventralis, **7.** Sulcus cranialis, **8.** Sulcus longitudinalis sinister, **9.** Sulcus coronarius dorsalis, **10.** Sulcus coronarius ventralis, **11.** Sulcus caudalis, **12.** Sulcus accessorius sinister, **13.** Insula ruminis, **14.** Sulcus ruminoreticularis, **15.** Retikulum, **16.** Abomasum, **17.** Özefagus, **18.** Dalak. Retikulo-rumen kas kese, kranial kese, ventral kese, ventral kör kese, ve retikulumun birleşiminden oluşur.

Anaerobik fungusları çamur, atık su ve lağım pisliği gibi sindirim sistemi dışındaki habitatlardan izole etmek için çok az sayıda çalışma yapılmıştır (Orpin, 1976; Orpin and Joblin, 1988) ve bu çalışmaların hiçbiri başarılı olamamıştır.

### **2.5.2. Anaerobik fungusların dünya genelinde dağılımları**

Anaerobik funguslar ilk olarak Orpin (1975) tarafından İngiltere’de izole edilmiştir. Bu keşiften sonra dünyanın farklı bölgelerinde yaşayan işkembeli ve işkembesiz otçullardan anaerobik funguslar izole edilebilmiştir. Bilinen raporlara göre Bauchop (1979) tarafından Yeni Zelanda’da; Akin ve arkadaşları (1983) tarafından A.B.D.’de; Orpin ve arkadaşları (1985) tarafından Norveç’te; Novazamska (1987) tarafından Çekoslovakya’da; Ho ve arkadaşları (1988) tarafından Malezya’da; Gold ve arkadaşları (1988) tarafından Kanada’da; Ushida ve arkadaşları (1989) tarafından Japonya’da; Phillips ve Gordon (1989; 1992) tarafından Avustralya’da; Morrison ve arkadaşları (1990) tarafından Güney Afrika Cumhuriyeti’nde; Kostyukovsky ve arkadaşları (1991) tarafından Rusya’da; Teunissen ve arkadaşları (1991a,b) tarafından Hollanda’da; Breton ve arkadaşları (1991) tarafından Tanzanya’da; Gaillard-Martinie ve arkadaşları (1995) tarafından Fransa’da; Ozkose ve arkadaşları (2001) tarafından İngiltere’de; Cheng ve arkadaşları (2007) tarafından Tayvan’da; Şili ve Çin’de izolasyonlar yapılmıştır.

### **2.6. Durağan Kültürlerde Gelişimin Belirlenmesi ve Anaerobik Fungusların Sayımı**

Bakterilerin özellikle çözünebilir enerji kaynakları üzerinde ve sıvı kültürlerde gelişimini belirlemek amacıyla optik yoğunluğu ölçme metodu uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Fakat misel oluşturan veya bitki parçaları üzerinde yaşayan mikroorganizmaların gelişimlerini tayin etmede bu yöntem sağlıklı sonuç vermemektedir. Bu nedenle anaerobik fungusların büyümelerini belirlemede genel olarak durağan kültürlerde besin maddesinin kuru ağırlık kaybının ölçülmesi veya çözünebilir durumdaki bir-birkaç son ürünün tayini kullanılmaktadır. Kullanılan bu

yöntemlerin hem uzun zaman alması, hem sağlıklı sonuç alabilmek için çok sayıda tekrara ihtiyaç olması, hem de özellikle yıkım ürünlerinin az miktarda olduğu ilk dönemlerdeki gelişimin belirlenememesi gibi problemleri vardır. Bu problemler durağan kültürdeki fermentasyon sonucu açığa çıkan gazın ölçülmesiyle kısmen çözülmüş ve bu yöntem Theodorou ve arkadaşlarının gaz basıncını % 0,1-2 (25 °C’de) duyarlılıkta ölçen “Pressure Transducer” aletini kullanmalarıyla oldukça basit, hızlı ve duyarlı hale gelmiştir (Özköse ve ark., 2003).

Rumende ve besiyerinde hem hareketli zoosporlar hem de vejetatif tallus olmak üzere iki forma sahip olduklarından dolayı anaerobik fungusların sayımı zordur. Hareketli zoosporların sayımı hem ışık mikroskobu altında serbest zoosporların direkt sayılması ile (Orpin, 1976, 1977a) hem de dönen tüplerdeki (roll tube) zoosporların kültürel olarak sayılması ile yapılabilir (Joblin, 1981). Ushida ve arkadaşları (1989) rumende inkübe edilen agar şeritleri kullanarak fungal populasyonları gözlemlemiş ve daha sonra ışık mikroskobu altında incelemişlerdir. Fakat bu yöntemleri kullanarak, çimlenmiş fungusları saymak veya dışkı numunelerindeki fungusları tahmin etmek zordur. Bu yüzden bu yöntemlerin hiçbiri tam olarak tatmin edici değildir ve günümüzde en etkili yöntem “En Muhtemel Sayı” (EMS) tekniğidir. EMS yöntemi, sadece kesikli kültürde değil aynı zamanda dışkı ve rumen atıklarındaki anaerobik fungusları saymak için Theodorou ve arkadaşları (1990) tarafından adapte edilmiştir. Bu yöntem çimlenmiş fungusları ve hareketli zoosporları birbirinden ayırmaksızın tallus oluşturan birimler olarak bütün fungusları sayar. Bu yüzden EMS tekniği dışkı ve rumenin sindirim özütündeki fungal populasyonların miktarını belirlemek ve karşılaştırmak için kullanılabilmesine rağmen bu bir minimum sayma yöntemidir ve hareketli ve vejetatif yapılar arasındaki farkı belirlemek için yeterli değildir (Theodorou et al., 1993; Davies et al., 1993b).

## **2.7. Anaerobik Fungusların Taksonomisi**

Anaerobik fungusların tanımlanması ve sınıflandırılması, açık olarak tanımlanmış morfolojik karakteristik özelliklerin eksikliğinden dolayı zordur. Sonuç



olarak yaklaşık 30 yıl önce rapor edilmelerine rağmen anaerobik fungusların çeşitliliği hakkında çok az şey bilinmektedir. Günümüzde yayınlanan tanımları tallus morfolojisi ve zoospor ince yapısı ile ilgili olan bilgilere dayandırılır. Kullanılan özelliklerin bazıları çevresel şartlardan etkilenebilir (Heath, 1988). Bu yüzden daha kesin ve hızlı metotlar bütün anaerobik fungal çeşitliliği ve bunların taksonomideki pozisyonlarını belirlemede gereklidir. Son yıllarda GC (guanin-sitozin) ya da AT (adenin-timin) oranları (Brownlee, 1989), ITS1 sekansları (Brookman et al., 2000b) ya da 18S rRNA sekansları (Dore and Stahl, 1991) gibi moleküler teknikler anaerobik fungal sınıflandırmayı tespit etmede konvansiyonel metotları artırmak için kullanılmaktadır.

Gen dizilerinin çıkarılması ve PCR-RFLP analizini temel alan teknikler, anaerobik fungusların filojenilerinin belirlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine aynı şekilde anaerobik fungusların enzim sistemlerinin incelenmesinde (ticari öneme sahip olduklarından) moleküler teknikler oldukça yaygın bir kullanım olanağı bulmuştur. Fakat bu tekniklerin anaerobik fungal filojenide kullanımı oldukça sınırlıdır. Yazılı kayda geçen en önemli yayın Brookman ve arkadaşları (2000b) tarafından 4 farklı cinse ait türlerin yer aldığı ve sadece ITS1 bölgesinin sekans verilerine dayanan rapordur. Daha önce Li ve Heat ayrıca takiben Li ve arkadaşları, kısmi 18S ve ITS1 bölgelerinin sekans analizi verilerini kullanmışlar fakat bu çalışmalar anaerobik fungusların da yer aldığı Chytridiomycota grubunun filojenisini belirlemeye yönelik olmuştur. Özköse ve arkadaşlarının 2002 yılında, RFLP ve sekans analizi verilerini kullanarak yaptığı çalışma anaerobik fungusların farklı cinsleri arasındaki taksonomik uzaklığı belirlemek amacıyla yapılmış ilk çalışma konumundadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; PCR-RFLP analizi anaerobik fungusların cins düzeyinde ayrılmasında başarılı olmuştur. Fakat tek kesme enziminin uygulanmasıyla elde edilen DNA paterni, anaerobik fungusların ITS bölgelerine göre tür düzeyinde belirlenmesini mümkün kılmamıştır (Özköse ve ark., 2002). Yine ilk defa Özköse ve arkadaşları (2002) tarafından tüm cinslere ait sekans verilerinden elde edilmiş soy ağacı oluşturulmuştur. Böylece anaerobik fungusların taksonomik pozisyonları tür düzeyine kadar belirlenmiştir.

Bütün zoosporik funguslar eskiden Sparrow (1973)'un fungal sınıflandırmasında, Eumycota sınıfının Mastigomycotina alt sınıfında bulunmaktaydı. Mastigomycotina alt sınıfı Chytridiomycetes içeren, filogenetik olarak ilişkisiz sınıflar barındırır ve bunlar zoosporların üretimi ile sınıflandırılırdı (Barr, 1988). Anaerobik funguslar Heath ve arkadaşları (1983) tarafından Spizellomycetales takımında ilk kez sınıflandırılmıştır.

18S rRNA'nın moleküler analizi anaerobik fungusların yeni bir sınıfı için inandırıcı kanıtlar sağlamış ve yeni takım olan Neocallimasticales (Neocallimastigales) Li ve arkadaşları (1993) tarafından önerilmiştir. Hidrogenesom ve kinetosomun varlığı, plazma membran yüzeyi veya glikojen parçalarının varlığının farzedilmesi gibi bazı farklılıklara ek olarak Munn (1994) da anaerobik funguslar için yeni bir takım önermiştir; Spizellomycetales yerine Anaeromycetales. *N. hurleyensis*, *A. elegans* gibi bazı türlerin konumu ve *C. equi* gibi yeni türlere de şüpheyle bakılmıştır.

Chytridiomycetes sınıfındaki türler arasında büyük morfolojik varyasyonlar vardır ve bu aynı zamanda anaerobik fungusların sistematiklerindeki büyük bir problemdir (Barr, 1988). Ek olarak morfolojik özelliklerin birçoğu farklı besiyeri ortamlarında sabit kalmasına rağmen hala bir olasılık vardır ki taksonomik çalışmalarda kullanılan bazı karakterler büyüme şartlarından etkilenebilir (Heath, 1988). Olgunluğun farklı evrelerinde bir kültürün tek bir kolonisi içinde bile karakteristik özellikler farklılık gösterebilir ve bu durum özellikle *Neocallimastix* ve *Piromyces* genusunun üyeleri için son derece geçerlidir. Bu sebeplerden dolayı Heath (1988) tarafından tanımlanan besiyeri, sınıflandırma amaçları için ve yeni izolatların tanımlanmasında kullanılmak üzere önerilmiştir. Fakat günümüzde yapılan tanımlar temel olarak tallus morfolojisi ve zoospor inceyapılarına dayandırılmış ve bu araştırmaların hiçbirisi Heath (1988) tarafından önerilen besiyeri kullanılarak uygulanmamıştır.

Yukarıda bahsedilen araştırmaların ışığında anaerobik fungusların şu andaki sınıflandırılması Çizelge 2.4'te gösterildiği gibidir (Barr, 1988; Barr et al., 1989; Li et al., 1993).

**Çizelge 2.4.** Anaerobik fungusların sınıflandırılması

Alem	Fungi
Filum	Chytridiomycota
Sınıf	Chytridiomycetes
Takım	Neocallimastigales
Familya	Neocallimastigaceae
Genus	<p><b>Monosentrik</b></p> <p><i>Neocallimastix, Piromyces, Caecomyces</i></p> <p><b>Polisentrik</b></p> <p><i>Orpinomyces, Anaeromyces, Cyllamyces</i></p>
Tür	<i>frontalis, mucronatus, aberensis, joyonii, mae</i> vd.

*N. frontalis* (Heath et al., 1983), çok kamçılı zoosporlar ve monosentrik rizomiselyal talluslar gösterdiğinden dolayı *Neocallimastix* genusunun tanımlanan ilk üyesidir. *N. frontalis*, *N. patriciarum*, *N. variabilis* ve *N. hurleyensis* isimli 4 tür şu ana kadar rapor edilmiştir. *N. patriciarum* ve *N. variabilis*, *N. frontalis* ile eş anlamlı olarak önerilebilir durumdadır ve bundan başka farklı bir tür olarak *N. hurleyensis*'in durumu sorgulanmıştır.

*Piromyces* genusunun ismi ilk kez Liebetanz tarafından *Piromonas* olarak rapor edilmiştir fakat *Piromonas* ismi protozoa ile karıştırıldığından dolayı geçersizdir. *Piromonas communis* ismi Orpin (1977a) tarafından ilk kez anaerobik funguslar için kullanılmıştır. Son zamanlarda *Piromonas* monosentrik rizomiselyal tallus ve tek kamçılı zoosporlu fungusları tutan *P. communis* tipi türlerle *Piromyces* olarak Gold ve arkadaşları (1988) tarafından geçerli bir şekilde tanımlanmış ve yeniden isimlendirilmiştir. Bu genus şimdi, bilinen 7 tür altında toplanır; *P. communis*, *P.*

*dumbonicus* (orijinali *dumbonica*), *P. mae*, *P. rhizinflatus* (orijinali *rhizinflata*), *P. minutus*, *P. spiralis* ve *P. citronii*.

Rizoidal talli ile iki polisentrik anaerobik fungus generusu rapor edilmiştir. Bunlardan ilki olan *Orpinomyces* (Barr et al., 1989), çok kamçılı zoosporlu fungusları içinde barındırır. *Orpinomyces* ilk kez Barr ve arkadaşları (1989) tarafından önerilmiş ve daha önce Breton ve arkadaşları (1989) tarafından *Neocallimastix joyonii* olarak isimlendirilen tür, Barr ve arkadaşları (1989) tarafından *Orpinomyces joyonii* olarak değiştirilmiştir. Daha sonra Li ve arkadaşları (1991) bu iki izolatin tanımlarının eş anlamlı olduğunu söylemiş ve türün ismi *Orpinomyces joyonii* olarak kalmıştır. *O. intercalaris* bu generusun diğer türüdür.

İkinci polisentrik generus olan *Anaeromyces*, *A. mucronatus* tipi türler ile Breton ve arkadaşları (1990) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu generus, tek kamçılı zoosporlarla polisentrik fungusları içinde bulundurur. *Ruminomyces* generusu *Anaeromyces* ile eş anlamlı olarak Ho ve arkadaşları (1990) tarafından rapor edilmiştir. Fakat *Anaeromyces* generusu daha önce rapor edildiğinden dolayı önceliğe sahiptir. Bu yüzden *Ruminomyces elegans* (Ho et al., 1990), Ho ve arkadaşları (1993d) tarafından *Anaeromyces elegans* olarak değiştirilmiştir.

Tallus morfolojisi dikkate alındığında en farklı generus *Caecomyces equi* (Gold et al., 1988) tipi türlerle *Caecomyces*'tir. Bu generus rizoidal ağları ve bulbous body (küresel) vücut yapısıyla değiştirilen fungusları kapsar ve onun zoosporları tek kamçılıdır. Bu generusun ismi Liebetanz tarafından, şimdi geçersiz olan, *Sphaeromonas* olarak ilk kez rapor edilmiş ve ilk tür olan *S. communis* de Orpin (1976) tarafından rapor edilmiştir. *Sphaeromonas communis*, Gold ve arkadaşları (1988) tarafından *Caecomyces communis* olarak değiştirilmiştir. Zoospor inceyapısı ve Latince isimlendirme *Caecomyces* generusunun yalnızca tam olarak tanımlanan türleri olan *Ca. equi* türleri için kaynak olarak kullanılmıştır. *Ca. communis*'i *Ca. equi*'den ayırmak için, yayınlanmış literatürde yeterli bilgi yoktur. Bu yüzden farklı türler olarak bu iki izolatin statüsü tartışılmıştır.

### Anaerobik fungusların morfolojilerine ve zoospor inceyapılarına göre sınıflandırılması:

İlki Orpin (1975) tarafından rapor edildiğinden beri anaerobik fungusların 6 genusuna ait 19 tür tanımlanmıştır. Bu tanımlamalar temel olarak, zoospor inceyapısına ve genus seviyesinde tallus morfolojisine dayandırılmaktadır. Genus seviyesinde, fungusları tespit etmek için kullanılan temel karakteristik özellikler; tallus morfolojisi (monosentrik ya da polisentrik), rizomiselyum yapısı (filamentli ya da küresel) ve zoosporlar üzerindeki flagellaların sayısı (uniflagellat -1'den 4'e kadar flagella- ya da poliflagellat - 4'ten fazla flagella -)'dir. Ek olarak zoosporların çapı ve şekli (küresel, eliptik, silindirik) taksonomik parametreler olarak kullanılan morfolojik karakterlerdir.

**Çizelge 2.5.** Anaerobik fungusların genus düzeyinde identifikasyon anahtarı (Orpin, C.G., 1994). (Ozkose ve arkadaşlarının 2001 yılında anaerobik fungus taksonomisine ekledikleri yeni genus olan *Cyllamyces* ve morfolojik özellikleri Çizelge 2.6.'ya eklenmiştir.)

1	Vejetatif büyüme / monosentrik polisentrik	2 5
2	7 flagelladan daha fazla flagellaya sahip zoosporlar; genellikle 7-15 1 ya da 4 flagellalı zoosporlar	<i>Neocallimastix</i> 3
3	Küresel rizoidli vejetatif büyüme vejetatif büyüme rizoidal filamentli	4 <i>Piromyces</i>
4	Küresel rizoidler bulunmaktadır	<i>Caecomyces</i>
5	Zoosporlar tek kamçılı Zoosporlar çok kamçılı	<i>Anaeromyces</i> <i>Orpinomyces</i>

**Çizelge 2.6.** Anaerobik fungusların genus düzeyinde morfolojik özellikleri (Akınalp, A.S., 2006)

Genus	Spor Kesesi	Rizoid Yapısı	Zoospor Kamçı Sayısı
<i>Neocallimastix</i>	Tek (Monosentrik)	Dallanmış rizoid	Çok (>4)
<i>Piromyces</i>	Tek (Monosentrik)	Dallanmış rizoid	Tek ( $\leq 4$ )
<i>Caecomyces</i>	Tek (Monosentrik)	Küresel rizoid	Tek ( $\leq 4$ )
<i>Anaeromyces</i>	Çok (Polisentrik)	Dallanmış rizoid	Tek ( $\leq 4$ )
<i>Orpinomyces</i>	Çok (Polisentrik)	Dallanmış rizoid	Çok (>4)
<i>Cyllamyces</i>	Çok (Polisentrik)	Küresel rizoid	Tek ( $\leq 4$ )

Tür seviyesinde fungusların sınıflandırılabilmesi için zoosporların incecıyapı özelliklerinin bilinmesi gereklidir. Anaerobik fungal zoosporların en farklı karakteristiklerinden birisi mitokondrinin olmaması fakat hidrogenosomların olmasıdır (burada anaerobik enerji metabolizması gerçekleşir). Anaerobik fungal hidrogenosomlar sabit bir şekle sahip değildirler ve yuvarlak, oval, ince uzun ve düzensiz şekillere sahip oldukları raporlarda belirtilmiştir (Munn et al., 1988; Gold et al., 1988; Webb and Theodorou, 1988; 1991). Ribozomlar helezon ve küresel toplulukların ortak olduğu sitoplazma boyunca dağılırlar.

Anaerobik fungal zoosporların sınıflandırılması için gerekli olan en önemli kriterlerden birisi kinetosomun yapısıdır.

## 2.8. Anaerobik Fungusların Tanımlanmalarına Yönelik Yapılan Çalışmalar

Barr (1980), Chytridiales (Kitritler)'in filojenisinde ve sınıflandırılmasının temelinde; tallus büyümesi, zoospor boyutu, zoospor incecıyapı karmaşıklığı ve organizasyonuyla, kamçı uzunluğunun gösterge olduğunu belirtmiştir.

Chytridiomycetes'in Spizellomycetales genusu, Barr (1980) tarafından rapor edilmiş, Chytridiomycetes'in altbölümünün farklı zoospor incecıyapıları hesaba katılarak,

her 2 genusun (Spizellomycetales ve Chytridiales) familya ve genusları arasında birçok benzerlikler olduğu sonucuna varılmıştır.

Anaerobik fungusların içinde yer aldığı Spizellomycetales'te familyalar, fungusların morfoloji ve tallus büyümesine göre sınıflandırılmakta iken genus sınıflandırılması öncelikle zoosporların inceyapıları göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (Barr, 1980; 1988).

Barr (1988), Eumycotina bölümünün alt bölümüne Mastigomycotina'yı yerleştirmiş ve bu fungusu Chytridiomycetes sınıfına atamıştır. Chytridiomycetes yeniden sınıflandırılmış ve yeni takım olarak Spizellomycetales, anaerobik fungus taksonomisine eklenmiştir.

Bununla beraber Munn (1994), net yapısal karakteristiğe dayanarak Neocallimasticales'in, tek kamçılı ve çok kamçılı özelliklerine bakılarak Spizellomycetales takımında değil de Anaeromyces takımında olmaları gerektiğini önermiş fakat bu öneri kabul görmemiştir.

### **2.8.1. *Neocallimastix* sp.**

Barr (1981), *Neocallimastix* genusunun yapısal tanımlamasında özellikle kamçı kaide cisimciği ya da dip taneciği olarak tanımlanan kinetozomların yapı şeklinin zoosporik fungusların geçerli taksonomisin temeli olduğunu belirtmiştir.

Heath ve arkadaşları (1983), *Neocallimastix* genusunun yapısal tanımlamasını *N. frontalis*'in zoosporlarının inceyapılarına dayandırarak yapmış ve *N. frontalis* olarak adlandırmıştır.

Orpin ve Munn (1986), *N. patriciarum*'u da kapsayan *Neocallimastix* genusunun ilk tanımlamasını düzeltmiş ve *Neocallimastix patriciarum*'un zoosporlarının, *N. frontalis*'inkinden farklı olduğunu belirterek, yeni tür olarak tanımlamasını

yapmışlardır. Buna göre, *Neocallimastix frontalis* (Orpin, 1975) olarak bilinen fungus türünün adlandırılması, *N. patriciarum* olarak değiştirilmiştir.

Webb ve Theodorou (1988), koyun dışkılarından izole ettikleri anaerobik fungusu, monosentrik oluşu ve tek kamçılı zoosporlarıyla karakterize etmişler ve adlandırmasını *Neocallimastix hurleyensis* olarak saptayarak, fungus taksonomisine dahil etmişlerdir.

Barr ve arkadaşları 1989 yılında yayınladığı çalışmasında, inceyapılı farklılıklarına dayanarak anaerobik fungusları Spizellomycetales takımının yeni familyası Necallimasticaceae'ye atamıştır. Gold ve arkadaşları (1988), bu familyanın altbölümlerinin içinde monosentrik türleri içeren 3 genusun bulunduğunu ileri sürmüştür; *Neocallimastix*, *Piromyces* (*Piromonas*) ve *Caecomonas* (*Sphaeromonas*).

Ho ve arkadaşları (1993a), sığırdan izole edip, karakterize ettikleri *Neocallimastix variabilis*'i tanımlamışlardır.

### **2.8.2. *Piromyces* sp.**

Barr ve arkadaşları (1989), sığır rumeninden; monosentrik ve spor keseleri üzerinde endojenyus ve ekzojenyus büyüme gösteren *Piromyces communis*'i izole etmişlerdir.

Li ve arkadaşları (1990), at dışkılarından *Piromyces mae*'yi, fil dışkılarından *P. dumbonicus* (*dumbonica*) ve *P. rhizinflatus* (*rhizinflata*)'u izole etmiş, ışık ve elektron mikroskopu ile inceleyerek; monosentrik yapısı ve tek kamçılı zoosporları vejetatif tallusları ile karakterize etmişlerdir.

Ho ve arkadaşları (1993c), geyikten, küçük spor kesesi, sağlam spor kesesi duvarları, düz-dallanmamış ana rizoidleri, seyrek dallanmış rizoidal sitemleri ile karakterize ettikleri *Piromyces minutus*'u izole etmişlerdir.



Ho ve arkadaşları (1993b) keçi rumeninden, endojenyus spor kesesiyle monosentrik olarak tanımladıkları *Piromyces spiralis*'i izole etmişlerdir.

### 2.8.3. *Caecomyces* sp.

Orpin, koyun rumeninden izole ettiği fungusları *Neocallimastix frontalis* (1975), *Sphaeromonas communis* (1976), *Piromonas communis* (1977a) olarak adlandırmıştır.

Gold ve arkadaşları (1988), at sekumundan izole ettikleri bir anaerobik fungus türünü ışık ve elektron mikroskopunda incelemiş ve bu yeni fungus türünü *Caecomyces equi* olarak adlandırmışlardır. Aynı çalışmalarında, Orpin'in adlandırmasını yaptığı monosentrik *Sphaeromonas communis* (1977a)'in, adlandırılmasını *Caecomyces communis* olarak düzeltmişlerdir.

Wubah ve arkadaşları (1991b), *Caecomyces communis*'in büyümesi ve morfolojisi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında; bu türün monosentrik bir fungus olduğunu, vejetatif hücre ya da miseloid tallusa eklenmiş bir ya da daha fazla spor kesesi içeren tallus formunda büyüdüğünü belirtmişlerdir.

### 2.8.4. *Orpinomyces* sp.

*Orpinomyces* genusunun ilk tanımlanması Barr ve arkadaşları (1989) tarafından yapılmış ve araştırmacılar *Orpinomyces bovis* türünü isimlendirmişlerdir.

Breton ve arkadaşları (1989), koyun rumeninden izole ettikleri polisentrik talluslu, çok kamçılı zoosporlarıyla teşhis ettikleri anaerobik fungus türünü *Neocallimastix joyonii* olarak adlandırmıştır. Daha sonra polisentrik tallus, geniş ve kapsamlı çok çekirdekli bir rizomiselyum, gama parçacıklarına benzer yapısıyla çok kamçılı zoosporları ile karakterize edilen ve kendilerinin *Neocallimastix joyonii* olarak tanımladıkları fungus genusunun doğru isimlendirilmesinin *Orpinomyces joyonii* olduğunu bildirmişlerdir.

### 2.8.5. *Anaeromyces* sp.

Breton ve arkadaşları (1990), koyun rumeninden izole ettikleri yeni suşu polisentrik tallusu, polinükleer rizomiselyumu, mucronat zoospor kesesi (spor kesesinin üst kısmında yer alan çıkıntı) ve çok kamçılı zoosporları ile karakterize etmişler, bu tanımladıkları yeni genusa *Anaeromyces mucronatus* ismini vererek, bu genusu ilk kez tanımlamışlardır.

Ho ve arkadaşları (1990) yaptıkları çalışmalarında, bu genusun *Ruminomyces* ile sinonim olduğunu belirtmişlerdir.

Ho ve arkadaşları (1993a) yayınladıkları düzeltme makalesinde, tanımlanmasını daha önceden *Ruminomyces elegans* (Ho et al., 1990) olarak yaptıkları fungusun adlandırmasının *Anaeromyces elegans* olduğunu rapor etmişlerdir.

### 2.8.6. *Cyllamyces* sp.

Ozkose ve arkadaşları (2001), sığır dışkılarından elde ettikleri anaerobik fungusu polisentrik yaşam döngüsü, küresel rizoidleri ve tek kamçılı zoosporlarıyla karakterize etmişler ve bu yeni türü *Cyllamyces aberensis* olarak tanımlamışlardır.

**Çizelge 2.7.** Anaerobik fungus genusları, türleri ve isimlendirmede kullanılan referanslar.

Genus	Tür	Referans
<i>Caecomyces</i>	<i>communis</i> <sup>1</sup>	Gold ve arkadaşları (1988)
	<i>equi</i>	Gold ve arkadaşları (1988)
	<i>sympodialis</i>	Cheng ve arkadaşları (2007)
<i>Piromyces</i>	<i>communis</i> <sup>2</sup>	Gold ve arkadaşları (1988)
	<i>mae</i>	Li ve arkadaşları (1990)
	<i>dumbonicus</i> <sup>7</sup>	Li ve arkadaşları (1990)
	<i>rhizinflatus</i> <sup>7</sup>	Breton ve arkadaşları (1991)
	<i>minutus</i>	Ho ve arkadaşları (1993c)
	<i>spiralis</i>	Ho ve arkadaşları (1993b)
	<i>citronii</i>	Gaillard-Martinie ve arkadaşları (1995)
<i>Neocallimastix</i>	<i>frontalis</i>	Heath ve arkadaşları (1983)
	<i>patriciarum</i> <sup>3</sup>	Orpin ve Munn (1986)
	<i>hurleyensis</i>	Webb ve Theodorou (1991)
	<i>variabilis</i>	Ho ve arkadaşları (1993a)
<i>Anaeromyces</i>	<i>elegans</i> <sup>4</sup>	Ho ve arkadaşları (1993d)
	<i>mucronatus</i>	Breton ve arkadaşları (1990)
<i>Orpinomyces</i>	<i>joyonii</i> <sup>5</sup>	Breton ve arkadaşları (1989)
	<i>intercalaris</i>	Ho ve arkadaşları (1994)
<i>Cyllamyces</i>	<i>aberensis</i>	Ozkose ve arkadaşları (2001)

**Orijinal isimleri;** <sup>1</sup>*Sphaeromonas communis* (Orpin, 1976); <sup>2</sup>*Piromonas communis* (Orpin, 1977a); <sup>3</sup>*Neocallimastix frontalis* (Orpin, 1975); <sup>4</sup>*Ruminomyces elegans* (Ho et al., 1990); <sup>5</sup>*Orpinomyces bovis* (Barr et al., 1989); <sup>6</sup>*Neocallimastix joyonii* (Breton et al., 1989); <sup>7</sup>*Piromyces dumbonicus*, <sup>7</sup>*Piromyces rhizinflatus* (Ho and Barr, 1995).

## 2.9. Anaerobik Kültür Teknikleri ve Fungusların Saklanması

Anaerobik fungusların kültüre alınması ve saklanması temel olarak Hungate (1969) ve Bryant (1972) tarafından tanımlanan yöntemlere dayandırılmaktadır. Besiyerinin bütün bileşenleri erlende, gerekli miktarda distile edilmiş suda çözülür ve

çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için yaklaşık olarak 3 saat önce ya elektrikli manyetik karıştırıcı kullanılarak yavaşça ısıtılır ya da CO<sub>2</sub> eşliğinde kaynatılır. Takibinde %100'lük CO<sub>2</sub> ya da %70 CO<sub>2</sub> + %30 N<sub>2</sub> karışımı altında besiyeri Hungate tüplerine aktarılır. Gaz boruları vasıtasıyla olası bakteriyel kontaminasyonu önlemek için gaz hortumlarının çıkış noktalarında filtrasyon amacıyla cam pamuğu kullanılır. Besiyeri içeren Hungate tüpleri plastik güvenlik kapaklarıyla tutulan bütül septum durdurucularla çabuk bir şekilde kapatılır ve derhal sterilize edilir. Bütün anaerobik fungus kültürleri ya sıvı besiyeri ya da agarlı besiyerinde, Hungate tüplerinde ya da serum şişelerinde korunur ve tekrar kullanılmaya kadar 39 °C'de inkübe edilir. Eldeki fungal kültürlerden 1 ml'lik örneklerin taze besiyerine, haftada 2 kez enjekte edilmesiyle fungal kültürler alt kültürleme yoluyla korunur ve 39 °C'de inkübasyona devam edilir.

Sürekli alt kültürleme yoluyla saklama yapıldığında bir süre sonra fungusların yaşamı ve enzim aktiviteleri bu durumdan etkilenebilir. Ekinci ve arkadaşları (2006) *Neocallimastix hurleyensis*'i farklı üç enerji kaynağı üzerinde yetiştirerek uzun süreli adaptasyonlarını incelemişlerdir. *N. hurleyensis* avisel, ksilan ve glikoz üzerinde 31 alt kültüre kadar yetiştirilmiştir. *N. hurleyensis*'in ksilan üzerindeki 31'inci alt kültürden sonraki ksilanaz aktivitesinde, avisel üzerindeki 31'inci alt kültürden sonraki aviselaz ve karboksimetilselülaz aktivitelerinde önemli miktarda artış olduğu gözlemlenmiştir. *N. hurleyensis*'in enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi ortamı üzerindeki 31'inci alt kültürden sonraki ksilanaz, aviselaz ve karboksimetilselülaz aktivitelerinde önemli düzeyde düşüşler belirlenmiştir.

### **Anaerobik Fungusların Uzun Süreli Saklanması:**

Bütün anaerobik fungal izolatların stok kültürleri 60 ml'lik serum şişelerinde veya bazen de Hungate tüplerinde, 2-3 gün içerisinde samanlı besiyeri kullanılarak üretilir. Yaklaşık olarak, fungal tallusların yapıştığı, 0,7 g buğday samanı anaerobik prosedürler kullanılarak steril olmayan 2 ml'lik kriyojenik vidalı kapaklı silindir deney tüpleri içerisine transfer edilir. Steril edilmiş suya 1 ml %10'luk gliserol eklendikten sonra, gerekli olana kadar sıvı nitrojende (-196 °C'de) saklanabilir. Sıvı nitrojende anaerobik fungusların dondurulması için (özellikle *Caecomyces* ve *Cyllamyces* türleri

için) aşağıdaki iki adımdan oluşan yöntem izlenir. 2 ml'lik kriyojenik tüpler içerisine fungal biyokütleler ve bunların yapışık olduğu bitki parçacıkları (saman parçacıkları) transfer edildikten ve 1 ml %10'luk gliserol eklendikten sonra 20 dk kadar buz kutusunda tutulurlar. İkinci adımda, 45 dk'lık periyotlar için bir dondurucuda -20 °C'de dondurulurlar ve daha sonra depolama için sıvı nitrojene transfer edilirler. Dondurma prosedürüne göre numuneler sıvı nitrojene transfer edilmeden önceki gece -80 °C'de tutulmalıdırlar.

Dondurulmuş fungal kültürler, taze besiyeri içine transfer edilmeden önce ya oda sıcaklığında (yavaş çözünme) ya da 39 °C'de (çabuk çözünme) çözülürler.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Sterilizasyonu

##### 3.1.1. Rumen sıvısının saflaştırılması ve saklanması

Bu tez çalışmasında kullanılan rumen sıvısı ESKAR Et Kombinasyonu'ndan, kasaplık olarak kesilen ineklerden ve koyunlardan elde edilmiştir. Rumen içeriği, rumenden çıkarıldıktan hemen sonra laboratuvara getirilerek bir süzgeç yardımıyla süzölmüş ya da alındığı yerde süzölerek hazır halde laboratuvara getirilmiştir. Daha sonra +4 °C'de, 15 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Rumen sıvısı 4 hafta kadar bir buzdolabında (+4 °C'de) depolanabildiğinden stok rumen sıvısı -20 °C'de depolanmış ve gerektiğinde oda sıcaklığında çözdürölerek kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** Sığır rumeninden rumen sıvısının alınması. Sindirim sistemi içeriği, rumenin içerisinden alınıp süzölerek santrifüjlenmek üzere laboratuvara götürölür.

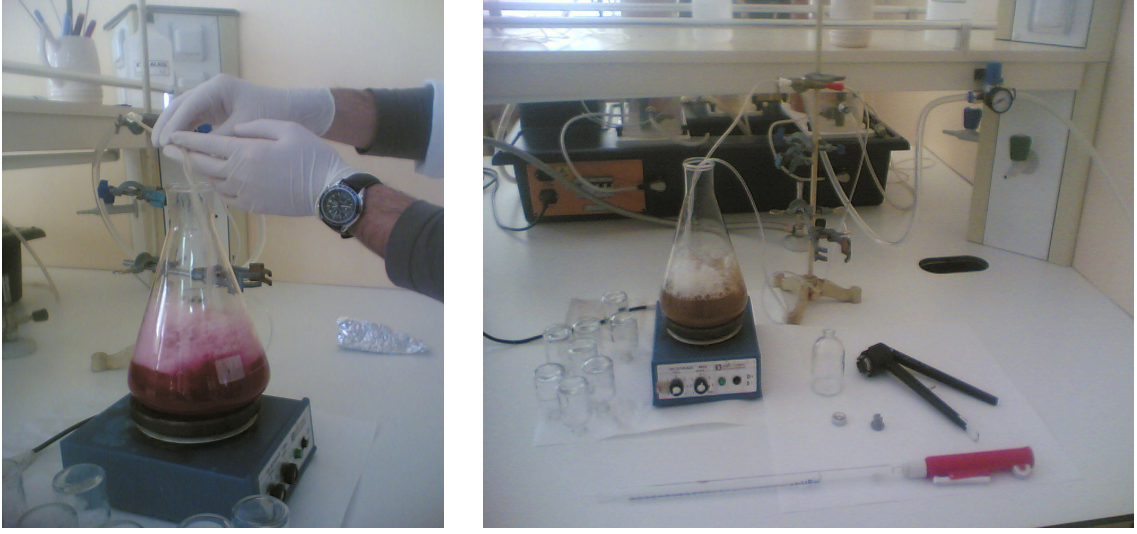


**Şekil 3.2.** Santrifüjlendikten sonra -20 °C’de depolanan stok rumen sıvısı.

### 3.1.2. Anaerobik besiyeri

Rumen mikrobiyolojisine ait, günümüzde kullanılan birçok anaerobik teknik ve besiyeri Hungate (1969) veya bu yöntemin biraz daha geliştirilmiş olan Bryant (1972) yöntemine dayanmaktadır.

Besiyerlerine konsantrasyonu 5 mg/ml (son konsantrasyon) olacak şekilde enerji kaynağı (glikoz, sellobiyoz, ksilan) ya da yaklaşık olarak 0,05 g buğday samanı (*Triticum aestivum*) eklenmiştir. Samanlar parçalandıktan sonra çapı 2 mm olan elekten geçirilmiştir.



**Şekil 3.3.** Anaerobik besiyerinin hazırlanması ve besiyeri hazırlamada kullanılan düzenek. Bu aşamada besiyeri hala oksijenli olduğu için pembe-mor renkte görünmektedir.



**Şekil 3.4.** 100 ml, 50 ml ve 25 ml'lik hacimlerde, serum şişelerinde hazırlanmış anaerobik besiyerleri.



**Çizelge 3.1.** Anaerobik fungus besiyeri içeriği.

		Besiyeri (100 ml)	Roll tüp agar (100 ml)
Mineral Solüsyon 1 *	ml	15	15
Mineral Solüsyon 2 **	ml	15	15
Rumen Sıvısı	ml	15	15
NaHCO <sub>3</sub>	g	0.60	0.60
Yeast Extract	g	0.25	0.25
Tryptone-Casitone	g	1.00	1.00
Resazurin (%1)	ml	0.10	0.10
Cystein HCl	g	0.10	0.10
Enerji Kaynağı ***	g	0.50	0.50
Agar	g	---	1.50
Saf Su	ml	55.0	55.0
[*] Mineral Solüsyon 1:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g	3.0
	Saf Su	ml	1000
[**] Mineral Solüsyon 2:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g	3.0
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g	6.0
	NaCl	g	6.0
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	g	0.6
	CaCl <sub>2</sub>	g	0.6
	Saf Su	ml	1000
[***] Enerji Kaynağı:	Glikoz; son konsantrasyon 5 g / l olacak şekilde Selüloz; her tüpe ~ 0.05 g saman		

Besi yerine konulacak tüm kimyasallar sırasıyla (sistein-HCl hariç) saf su, Mineral Solüsyon-1, Mineral Solüsyon-2 ve rumen sıvısı karışımı içerisinde çözülmüştür. Bu sırada besiyeri, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli ısıtılarak karıştırılmış ve her eklenen maddenin çözünmesi beklenmiştir. Besiyeri ısı etkisiyle kaynamaya başlayınca sistein-HCl ilave edilir ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edilirken, ortama CO<sub>2</sub> verilmiştir. Besiyeri hazırlanırken, ısı etkisiyle O<sub>2</sub>'nin ortamdan uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Isıtma sonrasında ortamda kalan O<sub>2</sub>'nin giderilmesi için sistein-HCl en son eklenmiştir. Resazurin indikatörünün etkisiyle, ısıtılmaya başlandığı andan itibaren mavi-mor olan besiyerinin rengi giderek pembeye,

ortamda O<sub>2</sub> kalmayınca da besiyerinin olması gereken orijinal rengi olan sarıya dönmeye başlamıştır.

Sadece dip kısmını kaplayacak şekilde (~0,05 g) saman ilavesi yapılan Hungate tüplerine CO<sub>2</sub> verilerek, tüplerin içerisindeki O<sub>2</sub> uzaklaştırılmıştır. Ortama CO<sub>2</sub> verilmeye devam edilerek, tüplere tüp hacminin % 60-70'i kadar besiyeri (6-8 ml) eklenmiş ve O<sub>2</sub> girişine müsaade etmeyecek şekilde hızlıca tüplerin ağzı kapatılmıştır.

Enerji kaynağı olarak saman kullanılan besiyerleri 121 °C'de 15 dk; glikoz, ksilan veya sellobiyoz gibi çözünebilir substratlar kullanılan besiyerleri ise 110 °C'de 10 dk otoklavlanmıştır ya da 0,22 µm gözenek çaplı membran filtrelerden geçirilerek besiyerine eklenmiştir. Aksi takdirde çözünebilir substratlar içeren besiyerleri yüksek sıcaklıkta karamelize olabilirler.

### **3.1.3. Anaerobik besiyerinde bakteri büyümesini engelleyici antibiyotik ilavesi**

Anaerobik ortamda olası bakteri büyümesini engellemek için, % 25'lik etanolde çözülmüş amfisilin (ampicillin) (50 mg/ml), streptomisin sülfat (streptomycin sulfate) (50 mg/ml), eritromisin (erythromycin) (50 mg/ml), kloramfenikol (chloramphenicol) (50 mg/ml) karışımı hazırlanmıştır. Antibiyotik karışımı izole edilen veya saflaştırılan anaerobik fungus ortamlarına ekim yapıldıktan sonra şırınga ile enjekte edilmiş (son konsantrasyon 25 µg/ml olacak şekilde) ve bu şekilde bakteriyel gelişimin engellenmesi sağlanmıştır.

## **3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması**

### **3.2.1. Anaerobik fungusların izolasyonu**

Anaerobik fungusların izolasyonu Theodorou ve arkadaşları (1993)'nın seyreltme yöntemine dayanılarak gerçekleştirilmiş ve uygulanan metodoloji aşağıda belirtilmiştir.

Dışkı örneği (yaklaşık olarak yaş ağırlık 10 g), 50 ml besi yeri içerisinde, CO<sub>2</sub> uygulaması altında homojenize edilmiştir. Seyreltilen örnekten yaklaşık olarak 6 ml alınarak, içinde buğday samanı olan boş Hungate tüpleri içine aktarılmıştır. İlk seyreltilen örnekten 10 ml alınarak yine 40 ml besi yeri içinde seyreltilmiş ve içinde saman olan boş Hungate tüplerine aktarılmıştır. Bu şekilde yapılan seyreltme ile 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-6</sup> ve aralarındaki konsantrasyonlarda ekimi yapılan anaerobik funguslar, 3 ila 10 gün arasında 39 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Ortamda rumen mikroflorasının diğer elemanlarının gelişmesini engellemek amacıyla tüplere antibiyotik ilavesi yapılmıştır (son konsantrasyon 25 µg/ml).



**Şekil 3.5.** 39 °C’de inkübe edilen anaerobik fungus kültürleri.



Şekil 3.6. CO<sub>2</sub> tüpü ve CO<sub>2</sub>'li inkübatör



Şekil 3.7. Samanlı besiyeri içeren anaerobik fungus kültür tüpleri.

### 3.2.2. Anaerobik fungusların saflaştırılması

Anaerobik fungusların saflaştırılmasında, temeli Hungate (1969) yöntemine dayanan Joblin (1981)'in Roll tube yöntemi kullanılmıştır.

İçeriğinde % 5 w/v glikoz ya da sellobiyoz bulunan besiyerine % 1,5 w/v agar ilave edilmiştir. 48 °C'deki sıcak su banyosunda eritilen katı besi yeri, CO<sub>2</sub> altında Hungate tüplerine konulmuş (2–3 ml) ve otoklavlanmıştır. Hazırlanan katı besiyerleri kullanılacağı zaman sıcak su banyosunda eritilerek, fungusların tolere edeceği sıcaklığa dek soğutulmuştur. Her bir tüpe, fungus üremiş sıvı besiyerinden 0,5 ml enjekte edilmiştir. Antibiyotik ilavesi sonrasında, soğuk su dolu bir küvet içerisinde sıvı halde ve içinde fungus bulunan agarlı besiyerinin Hungate tüpü içinde homojen şekilde karışarak, besiyerinin tüpün çeperlerinde donması sağlanmıştır (roll tube method). Funguslar 39°C'de 3–4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fungus kolonilerinden alınan örnekler, içinde buğday samanı bulunan sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Bu işlem 3 sefer tekrarlandıktan sonra saf kültür elde edilmiştir.



**Şekil 3.8.** Üreme görülen tüplerdeki samanların öze yardımıyla taze besiyerine aktarılması.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Eskişehir dahil olmak üzere farklı bölgelerden koyun, keçi, sığır, at ve geyik olmak üzere 5 farklı herbivordan alınan 24 dışkı ve 1 rumen sıvısı örneklerinden izolasyonlar yapılmış, izole edilen anaerobik fungusların tanımlanması için gerekli prosedürler izlenmiştir. İzolasyon aşaması sırasında toplam 12 örnekte anaerobik fungus üreme belirtileri gözlemlenmiş, ancak 5 sığır ve 1 koyun dışkı örneklerinden 6 anaerobik fungus izolatu elde edilebilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen ve uzun süre alt kültürleme yoluyla laboratuvarımızda saklanan anaerobik fungus kültürlerinin bir kısmı bakteriyel kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiş, bir kısmı da tanımlanamamıştır. Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular aşağıda, Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Anaerobik fungus izolasyon çalışmalarının sonuçları.

Örnek Cinsi	İzolasyon Kaynağı	İzolasyon Tarihi	Sonuç	Genus
1. Rumen sıvısı	Sığır	10.03.2007	Üreme var.	Tanımlanamadı
2. Dışkı	Geyik	16.06.2007	Üreme yok.	-----
3. Dışkı	Geyik	16.06.2007	Üreme yok.	-----
4. Dışkı	Sığır	13.07.2007	Üreme yok.	-----
5. Dışkı	Koyun	20.07.2007	Üreme var.	Tanımlanamadı
6. Dışkı	Koyun	02.08.2007	Üreme yok.	-----
7. Dışkı	Koyun	03.08.2007	Üreme var.	Tanımlanamadı
8. Dışkı	Sığır	10.08.2004	Üreme var.	Tanımlanamadı
9. Dışkı	Sığır	13.08.2007	Üreme yok.	-----
10. Dışkı	Koyun	13.08.2007	Üreme var.	Tanımlanamadı
11. Dışkı	At	08.11.2007	Üreme var.	Tanımlanamadı
12. Dışkı	Sığır	08.11.2007	Üreme yok.	-----
13. Dışkı	Koyun	08.11.2007	Üreme yok.	-----
14. Dışkı	At	13.11.2007	Üreme yok.	-----



15.	Dışkı	At	13.11.2007	Üreme yok.	-----
16.	Dışkı	Sığır	15.11.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
17.	Dışkı	Koyun	19.11.2007	Üreme yok.	-----
18.	Dışkı	Sığır	23.11.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
19.	Dışkı	Keçi	25.11.2007	Üreme yok.	-----
20.	Dışkı	Koyun	02.12.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
21.	Dışkı	Sığır	02.12.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
22.	Dışkı	Sığır	12.12.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
23.	Dışkı	Sığır	12.12.2007	Üreme var.	<i>Neocallimastix</i> sp.
24.	Dışkı	Koyun	26.12.2007	Üreme yok.	-----
25.	Dışkı	Koyun	26.12.2007	Üreme yok.	-----

Anaerobik fungusların saflaştırılması için 3 kere tekrar edilmesi gereken katı besiyerinden samanlı sıvı besiyerine aktarımlar esnasında ve bu aşamaların sonunda, besiyerlerinden alınan örnekler, ışık mikroskobu altında morfolojik karakterleri bakımından incelenmiştir. Ancak mikroskobik incelemeler esnasında gerek kültür tüplerinin gerekse hazırlanan preparatların sıcaklığının sabit tutulmamasından ve anaerobik fungusların sıcaklık değişiminden etkilenmesinden dolayı, özellikle fungus zoosporlarının morfolojik olarak değişime uğradıkları gözlenmiştir. Mikroskobik incelemeler sırasında spor kesesi içeren rizomiselyumlar ve serbest halde yüzen zoosporlar kolaylıkla gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir. Bilinen tüm anaerobik funguslar zenospor (örneğin zoosporlar) üretirler ve zenosporların orijinlerinden uzaklaşarak yayılmalarından dolayı hayvan sindirim sisteminin tüm kısımlarından izole edilebilmişlerdir.

Anaerobik fungusların izolasyonu için kullanılan besiyerleri, rumen mikrobiyologları tarafından zamanla değiştirilerek geliştirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız besiyeri Çizelge 3.1.'de (bkz s.40) gösterildiği gibidir. Bu besiyeri halen günümüzde kullanılmakta ve rumen şartlarına en yakın olan halidir. Besiyeri

içeriğindeki rumen sıvısı vitamin, protein ve bir takım mineraller için kaynak olarak kullanılmıştır. Rumen sıvısı olmadan da besiyeri hazırlanabilmektedir. Ancak, çalışmamızda rumen sıvısı kullanımının daha pratik oluşu ve içerdiği iz miktardaki besinlerin varlığının garanti edilmesi nedeniyle tercih edilmiştir. pH, genel olarak fungusların yaşamında önemli bir etkidir ve belirli bir aralığın dışına çıkması istenmez. Bu yüzden besiyeri içerisine pH'yı 6,5-6,8 arasında tutmak amacıyla tampon çözelti olarak NaHCO<sub>3</sub> eklenmiştir. Karbon ve enerji kaynağı olarak besiyerlerine buğday samanı, glikoz ya da sellobiyoz eklenmektedir. Hızlı bir fungal gelişim istendiğinde, enerji kaynağı olarak selülozun daha alt birimleri olan glikoz ya da sellobiyoz kullanılmıştır. Besiyeri hazırlamada dikkat edilmesi gereken en önemli husus besiyerinden oksijenin tamamen uzaklaştırılmasıdır. Bunu sağlamak amacıyla besiyeri içerisine oksijen indirgeyici olarak sistein-HCl katılır. Herhangi bir oksitlenme olup olmadığının anlaşılabilmesi için oksijen indikatörü olarak %1'lik rezazurin çözeltisi eklenmiştir. Katı besiyeri hazırlanmasında besiyerine %1-1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Belirtilen bu koşullar altında anaerobik fungus izolasyonu, zoosporların ve vejetatif yapıların gözlemlenmesiyle sonuçlanmıştır.

Inverted mikroskop samanlı besiyeri içeren kültür tüplerindeki fungusların vejetatif hallerini incelemeye kullanılmıştır. Objektiflerin mikroskop tablasının altında olması, saman parçaları üzerinde gelişme gösteren fungusların tüplerin içerisinde gözlenmesini sağlamıştır. Bu çalışma esnasında Prior marka inverted mikroskop kullanılmıştır.

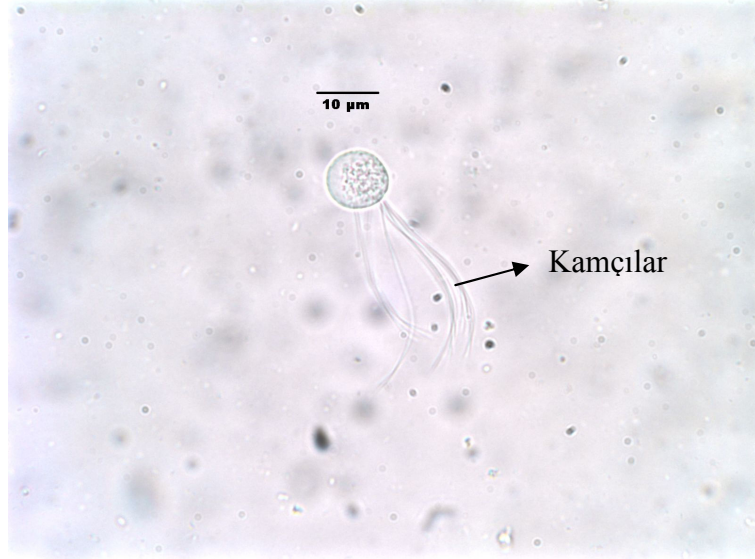
Bu prosedür doğrultusunda yapılan çalışmalar sonucu beş farklı sığır dışkısından ve bir koyun dışkısından izole edilen fungusların *Neocallimastix* sp. olduğuna karar verilmiştir. Bu sonuca, izole edilen fungusun monosentrik olması, rizoidlerinin dallanmalar göstermesi ve zoosporlarının 4'ten fazla kamçıya sahip olması gibi özellikleri değerlendirilerek varılmıştır. *Neocallimastix* sp.'ye ait zoosporların ve vejetatif yapıların görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.1-4.18). Bu tezde yayınlanan mikroskopik görüntülerin bir kısmı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü BİGEM (Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği) Laboratuvarında Olympus BX51 marka mikroskop kullanılarak, bir kısmı da Eskişehir



Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji Laboratuvarında Olympus CH40 marka mikroskop kullanılarak çekilmiştir. Önceki çalışmalar ve yayınlanmış literatürler incelendiğinde, *Neocallimastix* genusunun ilk isimlendirilen ve bu yüzden üzerinde çok sayıda çalışma yapılan genus olduğu dikkati çekmektedir. Şimdiye kadar izole edilen ve bilinen rumen fungusları arasında en yaygın genusun *Neocallimastix* olduğu görülmüş ve bu veri çalışmamızın güvenilirliğini desteklemiştir.

Anaerobik fungusların izolasyonu için kaynak olarak rumen sıvısı, rumen içeriği, salya ya da dışkı kullanılmaktadır. Rumen sıvısından izolasyon yapabilmek için, alınan örneğin anaerobik şartlarda, sıcaklığının rumen iç sıcaklığı ile aynı tutularak bir an önce işleme alınması gerekmektedir. Çünkü anaerobik fungusların rumen sıvısındaki ve rumen içeriğindeki formları oksijene ve sıcaklık değişimlerine oldukça duyarlıdır. Anaerobik şartların sağlanamaması ve sıcaklığın sabit tutulamamasından dolayı rumen sıvısı kullanılarak yapılan çalışmanın bu yüzden sonuç vermediği düşünülmektedir. Wubah ve arkadaşları (1991b), Ho ve arkadaşları (1993a, b, c), Li ve arkadaşları gibi rumen mikrobiyologları rumen içeriği kullanarak başarılı çalışmalar yapmışlar hatta Ho ve arkadaşları rumen içeriği kullanarak yaptıkları çalışmalarında *Neocallimastix variabilis* (1993a) ve *Piromyces spiralis* (1993b) türlerini, Cheng ve arkadaşları (2007) da *Caecomycetes sympodialis* türünü keşfetmişlerdir. Davies ve arkadaşlarının (1993a, b), anaerobik fungusların oksijene toleranslı olan yaşamsal bir forma sahip olabildiklerini göstermesiyle izolasyon çalışmaları daha çok dışkı örnekleri kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. Bu yüzden çalışmamızda örnek cinsi olarak dışkı kullanılmış ve başarılı izolasyonlar yapılmıştır. Davies ve arkadaşları (1993a, b), Lowe ve arkadaşları (1987b), Milne ve arkadaşları (1989), Nielsen ve arkadaşları (1995), Wubah ve arkadaşları (1991b) gibi birçok rumen mikrobiyoloğu dışkı örnekleri kullanarak başarılı çalışmalar yapmışlardır. Dışkıda bulunan kist formunun, oksitlenme ve sıcaklık değişimi gibi çevresel şartlardan kaynaklanan ve anaerobik funguslar için olumsuz etkileri olan durumları tolere edebildiği bildirilmektedir. Anaerobik şartların sağlanamamasından dolayı çalışmamızda hayvan salyasından izolasyon denemesi yapılmasına gerek duyulmamıştır. Fakat salya kullanılarak yapılan başarılı çalışmalar kayıtlara geçmiştir (Lowe et al., 1987b; Milne et al., 1989).

İzole edilen anaerobik funguslar, Joblin (1981)'in roll tp metodu kullanılarak saflaştırdıktan sonra %10'luk gliserol zltisi içeren kriyotplerde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmıştır.



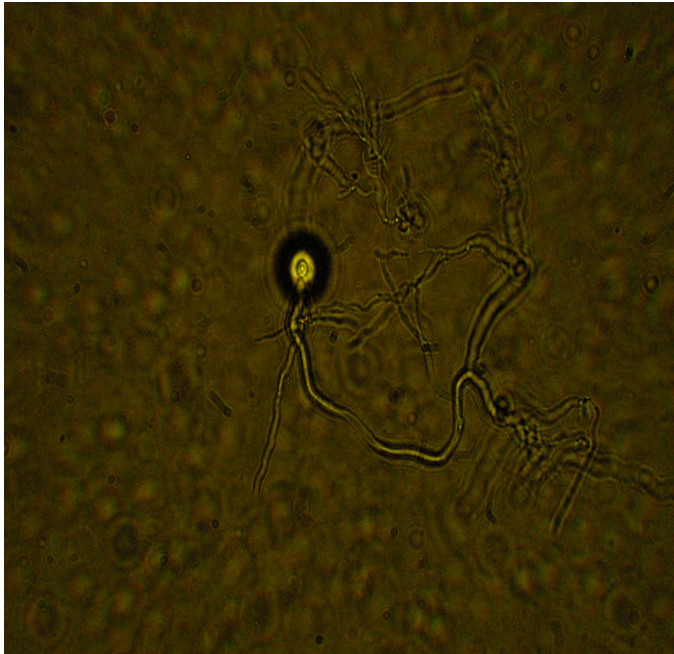
şekil 4.1. İdentifikasyon amacıyla gözlenen canlı zoospor ve kamçıları (400X).



şekil 4.2. Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler (600X).



**Şekil 4.3.** *Neocallimastix* sp.'nin vejetatif görüntüsü. Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler (400X).



**Şekil 4.4.** *Neocallimastix* sp.'nin vejetatif görüntüsü. Monosentrik spor kesesi ve dallanmış rizoidler (400X).

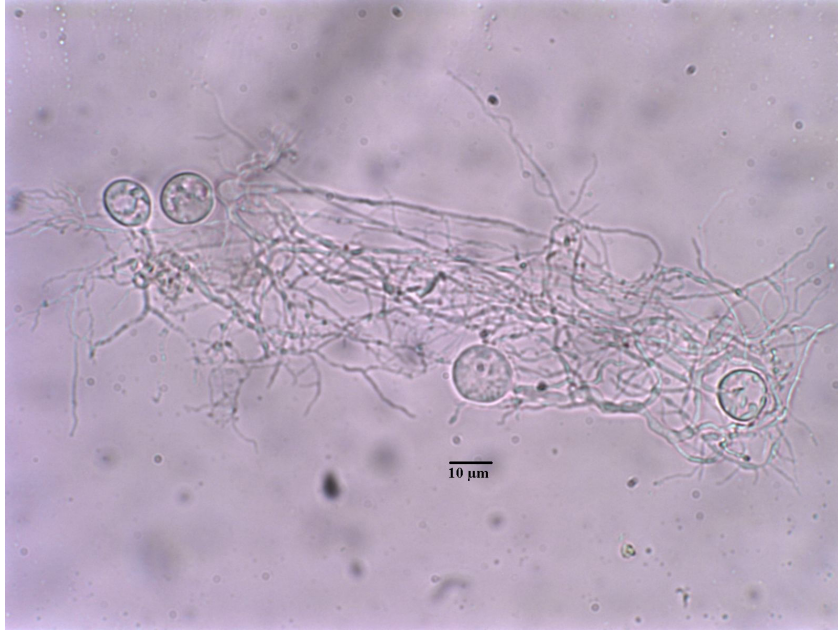


**Şekil 4.5.** Sığır dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'nin vejetatif görüntüsü (600X).

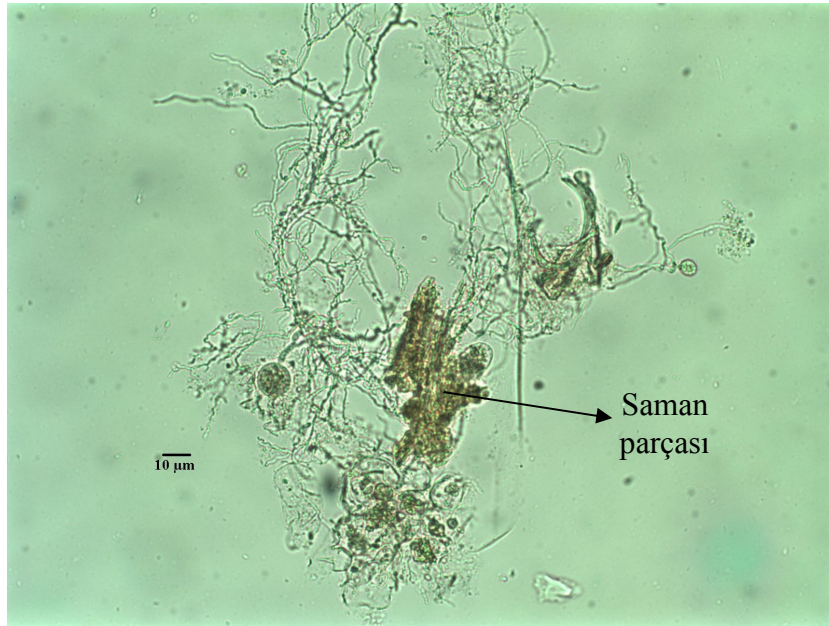


**Şekil 4.6.** Sığır dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'nin vejetatif görüntüsü (1000X).

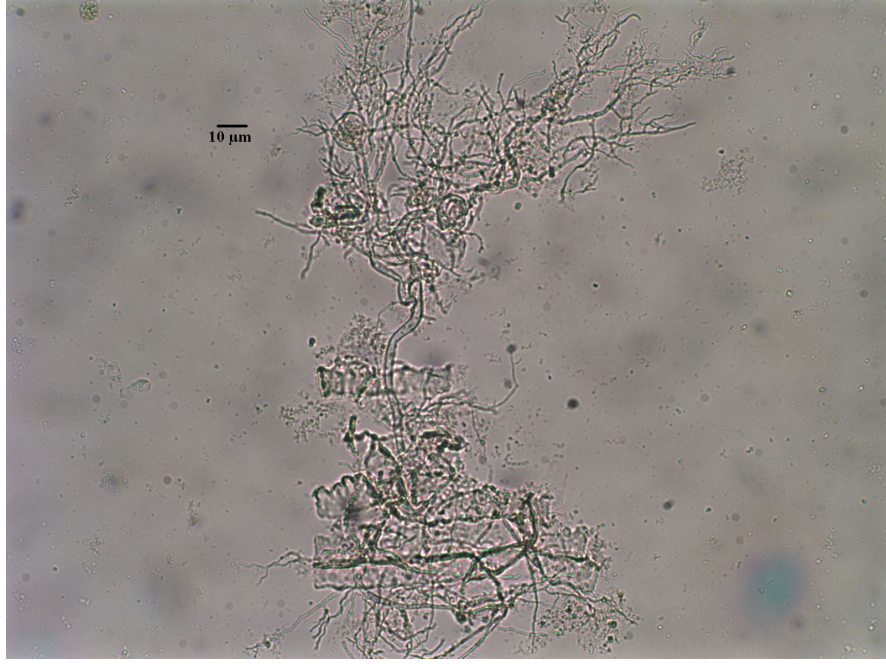




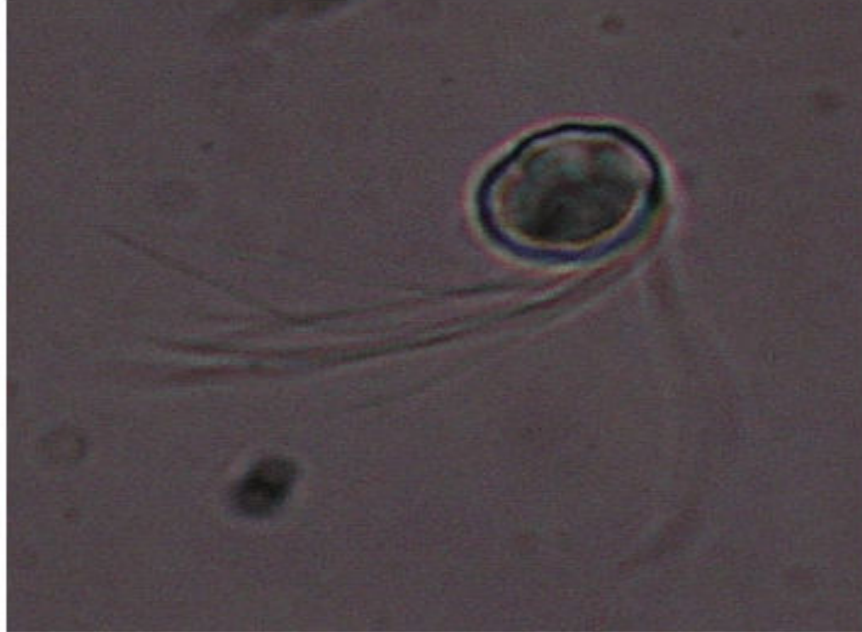
**Şekil 4.7.** Sığır dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'nin vejetatif görüntüsü. Dallanmış rizoidlere sahip 4 farklı fungus bir arada görülüyor (600X).



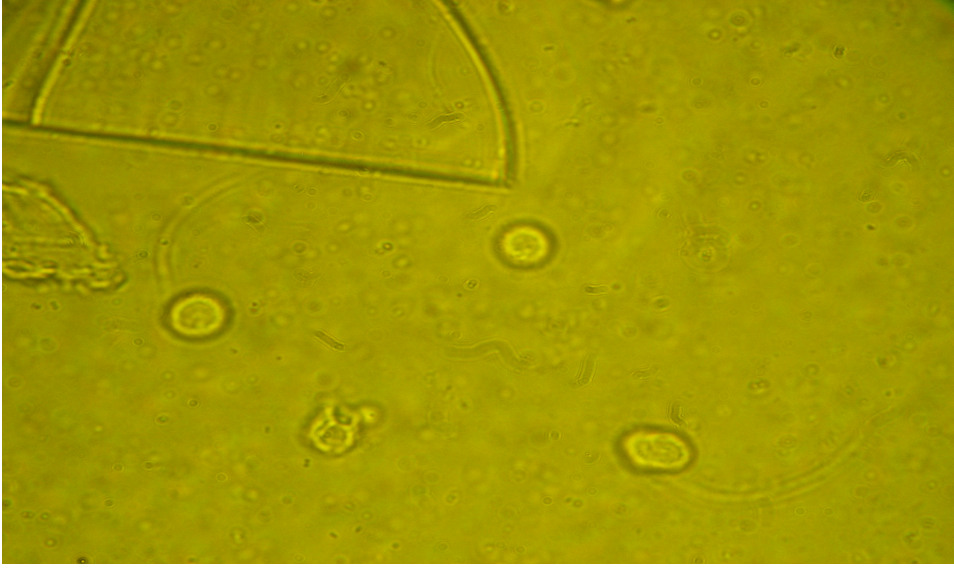
**Şekil 4.8.** *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü (400X).



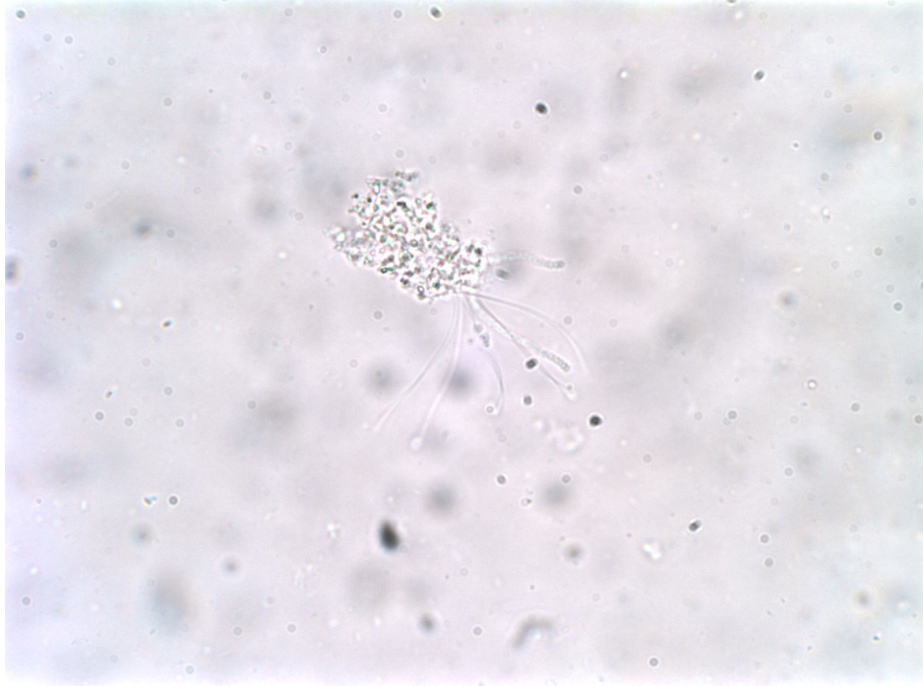
**Şekil 4.9.** *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü (400X).



**Şekil 4.10.** *Neocallimastix* sp.'ye ait zoosporun görüntüsü ve 4'ten fazla sayıda kamçılar (1000X).

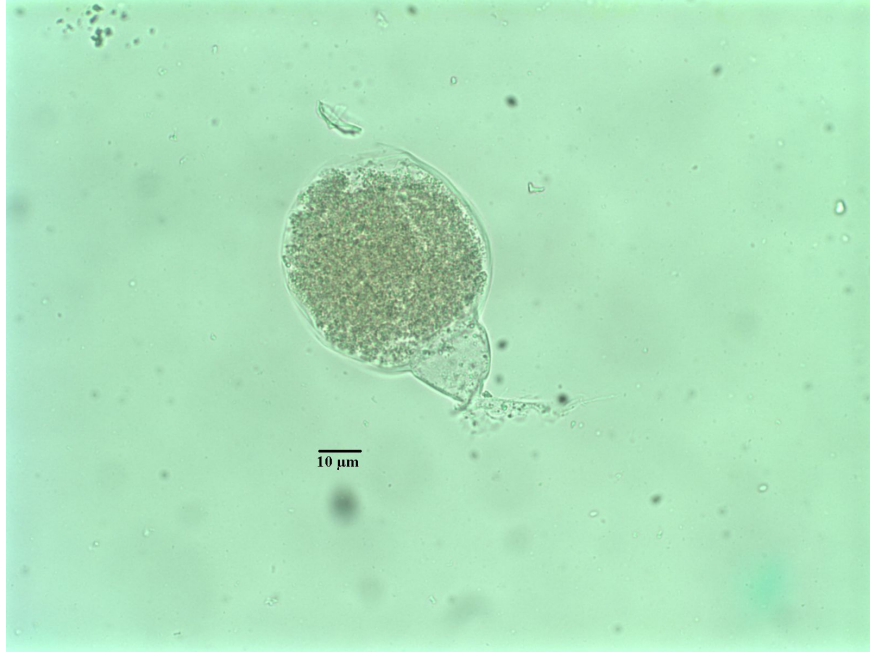


**Şekil 4.11.** *Neocallimastix* sp'ye ait farklı zoosporların görüntüleri. Fotoğrafta kamçılarıyla birlikte 3 adet zoospor görülüyor (400X).

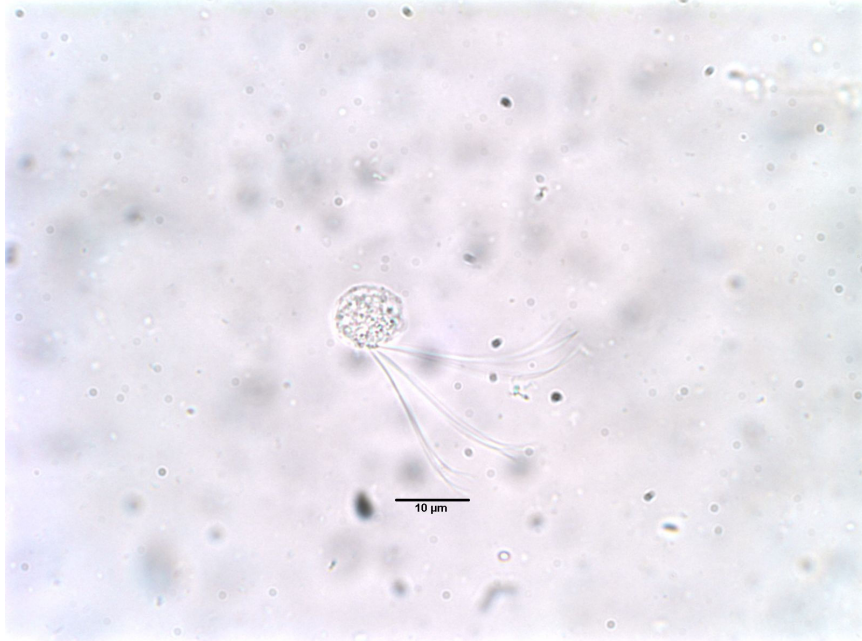


**Şekil 4.12.** Deforme olmuş zoospor (400X).





Şekil 4.13. Deforme olmuş spor kesesi (600X).



Şekil 4.14. Koyun dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'ye ait zoosporun görüntüsü (400X).

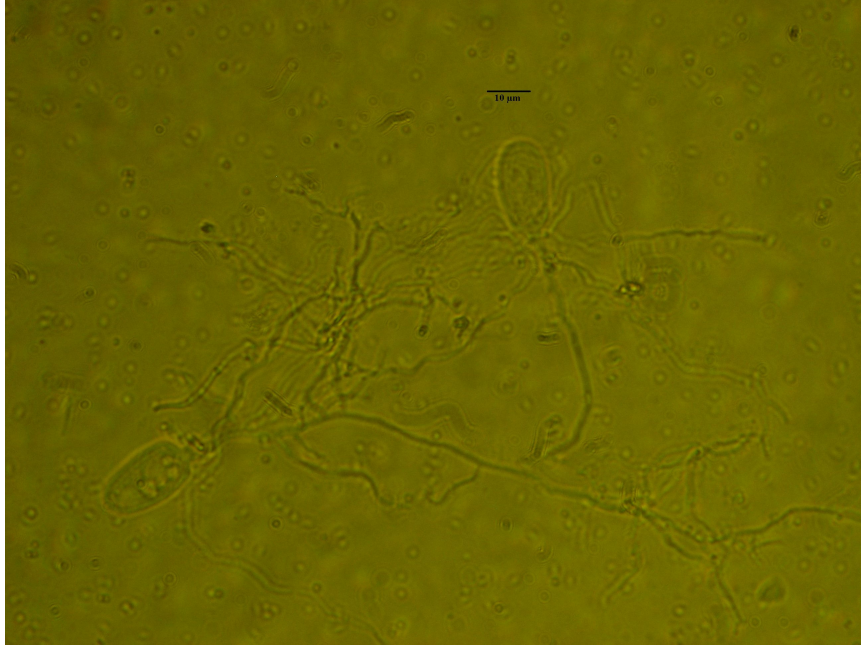




**Şekil 4.15** Koyun dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü(400X).



**Şekil 4.16.** Koyun dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü (1000X).



**Şekil 4.17** Sığır dışkılarından izole edilen *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü (600x).



**Şekil 4.18** *Neocallimastix* sp.'ye ait vejetatif görüntü (400X).

Ruminantların ve tek mideli herbivorların sindirim sistemlerinde şu ana kadar keşfedilen funguslardan çok daha fazlasının keşfedilmeyi beklediği rumen mikrobiyologlarının ortak görüşüdür. Dolayısıyla farklı türden herbivorların gerek dışkılarının gerekse sindirim sistemi içeriklerinin ayrıntılı mikroskopik incelemeye tabi tutulmaları, yeni fungusların kültüre alınmalarını sağlayacağı oldukça yüksek bir ihtimaldir (Özköse ve ark., 2003). Keşiflerinden bu yana taksonomideki yerlerinin ve isimlerinin birçok defa değiştirilmiş olması, taksonomideki yerlerinin belirlenirken morfolojik özellikleri değil de genetik karakteristiklerinin kullanılmasının daha uygun olacağının kanıtıdır. Bunu gerçekleştirebilmek için de şu ana kadar tanımlanmış olan anaerobik fungusların gen dizilimlerinin belirlenmesi ve yeni izole edilen fungusların bu verilerle karşılaştırılarak taksonlara yerleştirilmesi gerekir. Bu amaçla anaerobik fungusların PCR-RFLP analizleri, 18S rRNA ve ITS1 bölgelerinin sekanslanması çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca elde edilen genetik veriler ileriki çalışmalar için veri oluşturacak ve ülkemizin sahip olduğu gen kaynakları hakkında da bize fikir verecektir.

Anaerobik fungusların, biyoteknolojide ve zirai uygulamalarda kullanılabilen daha farklı enzimlere ve metabolitlere sahip olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla farklı bölgelerden toplanan örneklere izolasyonlar yapılmaya devam edilmeli, bunlar tanımlanmalı ve kültür koleksiyonları oluşturulmalıdır. Özellikle ekonomik değere sahip enzimleri kodlayan genlerin izolasyonu ve bu genlerin farklı organizmalara ekspresyonu ile hızlı şekilde enzim üretimi sağlanmalıdır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akin, D.E., Gordon, G.L.R. and Hogan, J.P., 1983, Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur, Applied and Environmental Microbiology, 46: 738-748.
- Akinalp, A.S., 2006, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W., 1979, Introductory Mycology, Third edition, John Wiley & Sons, New York.
- Barr, D.J.S., 1980, An outline for reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales, Canadian Journal of Botany, 58: 2380-2394.
- Barr, D.J.S., 1981, Ultrastructure of the *Gaertneriomyces* zoospore (Spizellomycetales, Chytridiomycetes), Canadian Journal of Botany, 59: 83-90.
- Barr, D.J.S., 1988, How modern systematic relates on the rumen fungi, Biosystems, 21: 351-356.
- Barr, D.J.S., Kudo, H., Jakober, K.D. and Cheng, K.J., 1989, Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp. *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov., Canadian Journal of Botany, 67: 2815-2824.
- Bauchop, T., 1979, The rumen anaerobic fungi: Colonizers of plant fibre, Annales de Recherches Veterinaires, 10: 246-248.
- Bauchop, T. and Mountfort, D.O., 1981, Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens, Applied and Environmental Microbiology, 42: 1103-1110.
- Bauchop, T., 1983, The gut anaerobic fungi: Colonizers of dietary fibre. In Fibre in Human and Animal Nutrition, (edt. G. Wallace and L. Bell), Royal Society of New Zealand, Wellington, p. 143-148.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bernalier, A., Fonty, G. and Gouet, P.H., 1991, Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria, *Animal Feed Science Technology*, 32: 131-136.
- Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B. and Gouet, P.H., 1989, Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*, *FEMS Microbiology Letters*, 58: 309-314.
- Breton, A., Bernalier, A., Drusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B. and Guillot J., 1990, *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus, *FEMS Microbiology Letters*, 70: 177-182.
- Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L. and Presier, G., 1991, *Piromyces rhizinflata* nov. sp., a strictly anaerobic rumen fungus from the faeces of the saharian ass; a morphological, metabolic and ultrastructural study, *FEMS Microbiology Letters*, 82: 1-8.
- Brookman, J.L., Ozkose, E., Rogers, S., Trinci, A.P.J. and Theodorou, M.K., 2000a, Identification of spores in the polycentric anaerobic gut fungi which enhance their ability to survive, *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 261-267.
- Brookman, J.L., Mennim, G., Trinci, A.P.J. and Theodorou, M.K. and Tuckwell, D.S., 2000b, Identification and characterization of anaerobic fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA, *Microbiology*, 146: 393-403.
- Brownlee, A.G., 1989, Remarkably AT-rich genomic DNA from the anaerobic fungus *Neocallimastix*. *Nucleic Acids Research*, 4: 1327-1335.
- Bryant, M.P., 1972, Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria, *Annals of Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cheng, H., Chen, Y. and Tsai, S., 2007, *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*, *Mycologia*, 99(1): 125-130.
- Clarke, R.T.J. and DiMenna, M.E., 1961, Yeasts from the bovine rumen, *Journal of General Microbiology*, 25: 113-117.
- Coleman, G.S., 1978, The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoa *Eudiplodinium maggii*, *Journal of General Microbiology*, 107: 359-366.
- Coleman, G.S., 1989, Protozoal-bacterial interection in the rumen. In: *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*, (edt. J.V. Nolan, R.A. Leng, D.I. Demeyer), Penambul Books, Armidale, Australia, p.13-28.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Brooks, A.E. and Trinci, A.P.J., 1993a, Influence of drying on the survival of anaerobic fungi in rumen digesta and faeces of cattle, *FEMS Microbiology Letters*, 106: 59-64.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I. and Trinci, A.P.J., 1993b, Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces, *Journal of General Microbiology*, 139: 1395-1400.
- Dehority, B.A. and Orpin, C.G., 1997, Development of and natural fluctations in rumen microbial populations. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, (edt. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Blackie Academic & Professionel, London, p. 196-245.
- Dore, J. and Stahl, D.A., 1991, Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparison, *Canadian Journal of Botany*, 69: 1964-1971.
- Ekinci, M.S., Akyol, İ., Karaman, M. ve Özköse, E., 2005, Hayvansal biyoteknoloji uygulamalarında güncel gelişmeler, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2): 89-95.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ekinci, M.S., Özköse, E. and Akyol, İ., 2006, Effects of sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*, Turkish Journal of Biology, 30: 157-162.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Senaud, J. and Gouet, P.H., 1984, The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months., Canadian Journal of Animal Science, 64: 165-166.
- Fonty, G., Gouet, P.H., Jouany, J.P. and Senaud, J., 1987, Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs, Journal of General Microbiology, 133: 1835-1843.
- Fonty, G. and Gouet, P.H., 1994, Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. In: Microorganisms in Ruminant Nutrition, (edt. R.A. Prins and C.S. Stewart), Nottingham University Press, Nottingham, p. 97-112.
- Foster, J.W., 1949, Chemical Activities of the Fungi, Academic Press, New York.
- Gaillard-Martinie, B., Breton, A., Dusser, M. and Julliard, V., 1995, *Piromyces citronii* sp. nov. a strictly anaerobic fungus from the equine caecum: a morphological metabolic and ultrastructural study, FEMS Microbiology Letters, 130: 321-326.
- Gold, J.J., Heath, I.B. and Bauchop, T., 1988, Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomyces equi* gen. nov., sp. nov. assigned to the Neocallimasticaceae, BioSystems, 21: 403-415.
- Gordon, G.L.R. and Phillips, M.W., 1998, The role of anaerobic gut fungi in ruminants, Nutritional Research Review, 11: 133-168.
- Gregory, P.H., 1966, The fungus spore: What it is and what it does. In: The Fungus Spore, (edt. M.F. Madelin), Butterworths, London, p. 1-13.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Heat, I.B., Bauchop, T. and Skipp, R.A., 1983, Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure, *Canadian Journal of Botany*, 61: 295-307.
- Heat, I.B., 1988, Recommendations for future taxonomic studies of gut fungi, *BioSystems*, 21: 417-418.
- Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S., 1988, Colonization of Guinea grass by anaerobic rumen fungi in swamp buffalo and cattle, *Animal Feed Science Technology*, 22: 161-171.
- Ho, Y.W., Bauchop, T., Abdullah, N. and Jalaludin, S., 1990, *Ruminomyces elegans* gen. et. sp. nov., a polycentric anaerobic rumen fungus from cattle, *Mycotaxon*, 38: 397-405.
- Ho, Y.W. and Bauchop, T., 1991, Morphology of three polycentric rumen fungi and a description of the procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in culture, *Journal of General Microbiology*, 137: 213-217.
- Ho, Y.W., Barr, D.J.S., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Kudo, H., 1993a, *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle, *Mycotaxon*, 46: 241-258.
- Ho, Y.W., Barr, D.J.S., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Kudo, H., 1993b, *Piromyces spiralis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of goat, *Mycotaxon*, 48: 59-68.
- Ho, Y.W., Barr, D.J.S., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Kudo, H., 1993c, A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia, *Mycotaxon*, 47: 285-293.
- Ho, Y.W., Barr, D.J.S., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Kudo, H., 1993d, *Anaeromyces*, an earlier name for *Ruminomyces*, *Mycotaxon*, 47: 283-284.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S., 1994, *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle, *Mycotaxon*, 50: 139-150.
- Ho, Y.W. and Barr, D.J.S., 1995, Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia, *Mycologist*, 87: 655-677.
- Hobson, P.N., 1969, Rumen Bacteria. In: *Methods in Microbiology*, 3B, (edt. J.R. Norris and D.W. Ribbons), Academic Press, London, p. 133-149.
- Hobson, P.N., 1971, Rumen microorganisms, *Progress in Industrial Microbiology*, 9: 42-77.
- Hobson, P.N. and Wallace, R.J., 1982a, Microbial ecology and activities in the rumen: Part I, *Critical Reviews in Microbiology*, 9: 165-225.
- Hobson, P.N. and Wallace, R.J., 1982b, Microbial ecology and activities in the rumen: Part II, *Critical Reviews in Microbiology*, 9: 253-320.
- Hungate, R.E., 1966, *The Rumen and Its Microbes*, Academic Press, London, U.K.
- Hungate, R.E., 1969, A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: *Methods In Microbiology*, 3B, (edt. J.R. Norris and D.W. Ribbons), Academic Press, London, p. 117-132.
- Jayne-Williams, D.J., 1979, The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves, *Journal of Applied Bacteriology*, 47: 271-284.
- Joblin, K.N., 1981, Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes, *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 1119-1122.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Joblin, K.N., 1990, Bacterial and protozoal interactions with ruminal fungi. In: Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants, (edt. D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson and P.J. Harris), Elsevier Science Publishing Co., p. 311-324.
- Joblin, K.N. and Naylor, G.E., 1993, Inhibition of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* by fermentation products, Letters in Applied Microbiology, 16: 254-256.
- Kostyukovsky, V.A., Okunev, O.N. and Tarakanov, B.V., 1991, Description of two anaerobic fungal strains from the bovine rumen and influence of diet on the fungal population *in vivo*, Journal of General Microbiology, 137: 1759-1764.
- Leng, R.A. and Nolan, J.V., 1984, Nitrogen metabolism in the rumen, Journal of Dairy Science, 67: 1072-1089.
- Li, J., Heath, I.B. and Bauchop, T., 1990, *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycetes fungi from the hindgut of the horse and elephant, Canadian Journal of Botany, 68: 1021-1033.
- Li, J., Heath, I.B. and Cheng, K.J., 1991, The development and zoospore ultrastructure of a polycentric chytridiomycete gut fungus, *Orpinomyces joyonii* comb. nov., Canadian Journal of Botany, 69: 580-589.
- Li, J., Heath, I.B. and Packer, L., 1993, The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of the Neocallimasticales ord. nov., Canadian Journal of Botany, 71: 393-407.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J., 1985, The utilisation of straw cellulose and related soluble carbon sources by a rumen anaerobic fungus, Journal of Applied Bacteriology, 59: XV.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lowe, S.E., Griffith, G.W., Milne, A., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J., 1987a, Life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus, *Journal of General Microbiology*, 133: 1815-1827.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J., 1987b, Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *Journal of General Microbiology*, 133: 1829-1834.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J., 1987c, Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development, *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1210-1215.
- Milne, A., Theodorou, M.K., Jordan, M.G.J., King-Spooner, C. and Trinci, A.P.J., 1989, Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva and in pure culture, *Experimental Mycology*, 13: 27-37.
- Morrison, M., Mackie, R.I. and Kistner, A., 1990, Evidence for cellulolysis by an anaerobic ruminal fungus in catabolite regulated by glucose, cellobiose and soluble starch, *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3227-3229.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A. and Bauchop, T., 1982, Fermentation of cellulose to methane and carbondioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*, *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 128-134.
- Munn, E.A., Orpin, C.G. and Greenwood, C.A., 1988, The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic Chytridiomycete fungi from the rumen of sheep, *BioSystems*, 21: 67-82.
- Munn, E.A., 1994, The ultrastructure of anaerobic fungi. In: *The Anaerobic Fungi*, (edt. C.G. Orpin and D.O. Mounfort), Marcel Dekker, New York, p. 47-105.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Nielsen, B.B., Zhu, W.Y., Trinci, A.P.J. and Theodorou, M.K., 1995, Demonstration of zoosporangia of anaerobic fungi on plant residues recovered from faeces cattle, *Mycological Research*, 99: 471-474.
- Novazamska, K, 1987, Isolation of an anaerobic cellulolytic fungus from the sheep rumen, *Folia Microbiologica*, 32: 519.
- Orpin, C.G., 1974a, The rumen flagellates *Callimastix frontalis* and *Monas communis* – zoospores of phycomycete fungi, *Journal of Applied Bacteriology*, 37: IX-X.
- Orpin, C.G., 1974b, The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur? *Journal of General Microbiology*, 84: 395-398.
- Orpin, C.G., 1975, Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*, *Journal of General Microbiology*, 91: 249-262.
- Orpin, C.G., 1976, Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*, *Journal of General Microbiology*, 94: 270-280.
- Orpin, C.G., 1977a, The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen, *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
- Orpin, C.G., 1977b, Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*, *Journal of General Microbiology*, 98: 423-430.
- Orpin, C.G., 1977c, On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*, *Journal of General Microbiology*, 101: 181-189.
- Orpin, C.G. and Bountiff, L., 1978, Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*, *Journal of General Microbiology*, 104: 113-122.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Orpin, C.G., Matheiesen, S.D., Greenwood, Y. and Blix, A.S., 1985, Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic *Svalbard Reinder*, Applied and Environmental Microbiology, 50: 144-151.
- Orpin, C.G. and Greenwood, Y., 1986, The role of haems and related compounds in the nutrition and zoosporegenesis of the rumen chytridiomycete *Neocallimastix frontalis* H8, Journal of General Microbiology, 132: 2179-2185.
- Orpin, C.G. and Joblin, K.N., 1988, The rumen anaerobic fungi. In: The Rumen Microbial Ecosystem, (ed. P.N. Hobson), Elsevier, London, p. 129-150.
- Orpin, C.G. and Munn, E.A., 1986, *Neocallimastix patriciarum* sp. nov. a new member of the Neocallimasticaceae inhabiting the rumen of sheep, Trans British Mycology Society, 86: 178-181.
- Orpin, C.G., 1994, Anaerobic fungi: taxonomy, biology and distribution in nature. In: The Anaerobic Fungi, (ed. C.G. Orpin and D.O. Mountfort), Marcel Dekker, New York, p. 1-47.
- Ozkose, E., 2001, Morphology and molecular ecology of Anaerobic Fungi, PhD Thesis, University of Wales Aberystwyth, U.K.
- 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 sporangiophores isolated from cattle, Canadian Journal of Botany, 79: 666-673.
- Özköse, E., Ekinci, M.S. ve Kamalak, A., 2002, *Cyllamyces aberensis*'in taksonomideki yerinin moleküler teknikler kullanılarak belirlenmesi, III. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, 167.
- Özköse, E., Ekinci, M.S. ve Akyol, İ., 2003, Biyoteknolojik potansiyel olarak anaerobik funguslar: Kültüre alınmaları ve morfolojileri, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6: 129-139.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Pettipher, G.L. and Latham, M.J., 1979, Characteristics of enzyme produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls, *Journal of General Microbiology*, 110: 21-27.
- Phillips, M.W. and Gordon, G.L.R., 1989, Growth characteristics on cellobiose of three different anaerobic fungi isolated from the ovine rumen, *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1695-1702.
- Phillips, M.W. and Gordon, G.L.R., 1992, Fungistatic and fungicidal effects of the ionophores monensin and tetronasin on the rumen fungus *Neocallimastix* sp. LM1, *Letters in Applied Microbiology*, 15: 116-119.
- Savage, D.C., 1977, Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Animal Review Microbiology*, 31: 107-133.
- Sparrow, F.K., 1973, Mastigomycotina (zoosporic fungi). In: *The Fungi*, (ed. C.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman), Academic Press, New York and London, p. 61-73.
- Stewart, C.S. and Richardson, A.J., 1989, Enhanced resistance of anaerobic rumen fungi to the ionophores monensin and lasalocid in the presence of methanogenic bacteria, *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 85-93.
- Taluğ, A.M. ve Özkul, H., 1999, Ruminantların beslenmesinde iyonofor kullanımı, *Hayvansal Üretim*, 39-40; 72-80.
- Teunissen, M.J., Op den Camp, H.J.M., Orpin, C.G., Huis, T. and Veld, J.H.J., 1991a, Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a novel defined medium, *Journal of General Microbiology*, 137: 1401-1408.
- Teunissen, M.J., Smits, A.A.M, Op den Camp, H.J.M. and Vogels, G.D., 1991b, Fermentation of cellulose and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivores, *Archives Microbiology*, 156: 290-296.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Theodorou, M.K., Gill, M.K., King-Spooner, C. and Beever, D.E., 1990, Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: a novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem, *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1073-1078.
- Theodorou, M.K., Davies, D.R., Jordon, M.G.C., Trinci, A.P.J. and Orpin, C., 1993, Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants, *Mycological Research*, 97: 1245-1252.
- Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Rickers, A. and Theodorou, M.K., 1994, Anaerobic fungi in herbivorous animals, *Mycological Research*, 98: 129-152.
- Ushida, K., Tanuka, H. and Kajima, Y., 1989, A simple in situ method for estimating fungal population size in the rumen, *Letters in Applied Microbiology*, 9: 109-111.
- Webb, J. and Theodorou, M.K., 1988, A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus, *BioSystems*, 21: 393-401.
- Webb, J. and Theodorou, M.K., 1991, *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov. an anaerobic fungus from the ovine rumen, *Canadian Journal of Botany*, 69: 1220-1224.
- Williams, A.G. and Coleman, G.S., 1992, *The Rumen Protozoa*, Springer-Verlag, New York.
- Williams, A.G. and Coleman, G.S., 1997, *The Rumen Protozoa*. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, (edt. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Blackie Academic & Professional, London, p. 73-139.
- Wubah, D.A., Fuller, M.S. and Akin, D.E., 1991a, Resistant body formation in *Neocallimastix* sp., an anaerobic fungus from the rumen of the cow, *Mycologia*, 83: 40-47.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wubah, D.A., Fuller, M.S. and Akin, D.E., 1991b, Isolation of monocentric and polycentric fungi from the rumen and faeces of cows in Gerogia, Canadian Journal of Botany, 69: 1232-1236.
- Wulff, C., 2001, Untersuchungen zum thiamin-und thiaminderivatgehalt im pansesaft des rindes nach verfütterung von mit *Mucor racemosus fresenius* verpilztem heu (in vitro), Doktorin der Veterinärmedizin, Hannover.
- Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., Longland, A.C., Nielsen, B.B., Dijkstra, J. and Trinci, A.P.J., 1996, Growth and survival of anaerobic fungi in batch and continuous-flow cultures, *Anaerobe*, 2: 29-37.
- Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., Nielsen, B.B. and Trinci, A.P.J., 1997, Dilution rate increases production of plant cell wall degrading enzymes by anaerobic fungi in continuous-flow culture, *Anaerobe*, 3: 49-59.