

Anaerobik Rumen Funguslarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Kültür Koleksiyonunun Oluşturulması

Uğur Çömlekçioğlu*, İsmail Akyol, Bülent Kar, Emin Özköse, Mehmet Sait Ekinci

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kahramanmaraş

*e-posta: cugur@ksu.edu.tr; Tel: +90 (344) 223 7666 / 341; Faks: +90 (344) 223 0048

Özet

Rumen fungal populasyonunun endüstriyel ve zirai uygulamalarda kullanılabilir zengin ve henüz keşfedilememiş yeni enzimler içerdiği tahmin edilmektedir. Bu çalışmada biyoteknolojik açıdan son derece önemli olan bu mikroorganizmaların izolasyonunun gerçekleştirilmesi, tanımlanmasının yapılması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması hedeflenmiştir. Bu kapsamda Türkiye'nin çeşitli coğrafyalarından toplanan ruminant hayvanlara ait 100 adet dışkı örneği taranarak anaerobik fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Buradan 25 adet izolat başarı ile saflaştırılmış, kısmi morfolojik tanımlanmaları yapılmış ve sıvı azot içerisinde ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere stok kültürler oluşturulmuştur. Bu izolatlar içerisinde 16 adet *Neocallimastix* sp., 3 adet *Caecomyces* sp., ve 6 adet Polisentrik fungus yer almaktadır. Oluşturulan ruminal anaerobik fungus kültür koleksiyonu ile ülkemizin gen kaynaklarının korunması ve ileriki araştırmalar için bir temel oluşturması sağlanacaktır.

Anahtar kelimeler: Anaerobik fungus, ruminant, rumen, kültür koleksiyonu, biyoteknoloji

Isolation, Identification and Culture Collection Establishment of Anaerobic Rumen Fungi

Abstract

Rumen fungal population has novel enzymes which could be useful for industrial and agricultural applications. The aim of this study was to isolate, identify and to construct the culture collection of these biotechnologically important microorganisms. According to this purpose, 100 fecal samples belong to ruminants were obtained from different geographical regions of Turkey and screened to isolate anaerobic fungi. As a result of screening studies, 25 isolates were successfully purified, partially identified and preserved in liquid nitrogen as stock cultures for further studies. Anaerobic fungi culture collection was composed of 16 *Neocallimastix* sp., 3 *Caecomyces* sp. and 6 polycentric fungi. Gene sources of Turkey will be protected with this culture collection and a basic will be developed for further investigations.

Key words: Anaerobic fungi, ruminant, rumen, culture collection, biotechnology

Giriş

Rumen, büyük miktarlarda bitkisel materyalin uzun süreli tutulması ve bu materyalin mikrobiyal parçalanmaya uğramasını sağlamak üzere oldukça özelleşmiş bir sindirim kanalı bölümüdür (Selinger ve ark., 1996). Rumen redoks potansiyeli oldukça düşük olan anaerobik bir ortama sahiptir. Bu durum konak hayvan tarafından kullanılan enerjinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Rumendeki anaerobik koşullar fermentasyon sırasında açığa çıkan gazlar (karbon dioksit, metan, hidrojen) tarafından sağlanır. Besin içerisinde bulunan sınırlı miktardaki oksijen fakültatif anaerob mikroorganizmalar tarafından kullanılarak mükemmel bir anaerobik ortam oluşturulur (Kamra, 2005). Rumen, doğadaki en karmaşık mikrobiyal ekosistemlerden birisini içermektedir (Itabashi, 2004). Ruminantların sindirim kanalı fermentasyon için çok uygundur. Konak hayvan mikroorganizmalarının gelişebilmeleri için uygun bir habitat sağlarken,

mikroorganizmalar da hayvan için protein, vitamin ve kısa zincirli organik asitler sağlarlar. İnce barsağa ulaşan amino asitlerin % 90'ı mikrobiyal proteinden kaynaklanmaktadır ve kısa zincirli organik asitler (asetik, propionik ve bütirik asit) hayvan metabolizmasının temel faktörlerindedir (Russel ve Rychlik, 2001).

Rumen ekosisteminde zorunlu anaerob bakteri, protozoa, metanojenler ve fungusları içeren büyük populasyonlar bulunmaktadır ve bu mikroorganizma grupları arasında sayısız ilişkiler gözlemlenmiştir (Moharrery ve Das, 2001). Rumen mikrobiyal ekosisteminde bakteriler 50'den fazla cins, protozoalar 25 cins ve funguslar 6 cins ile temsil edilmektedir. Ruminant hayvanların besinlerini oluşturan bitki biyokütlesi temel olarak selüloz (280-500 g/kg), hemiselüloz (200-300 g/kg) ve lignin (180-300 g/kg)'den oluşmaktadır. Bazı bitki materyali hücre duvarlarında 100 g/kg'a kadar pektin ile eser miktarda

protein de bulunmaktadır (Theodorou ve ark., 1996). Ruminant hayvanlar bu polisakkaritleri parçalayacak fibrolitik enzim üretmezler ancak sahip olduğu geniş mikrobiyal ekosistem bu polisakkaritleri hazır enerji kaynaklarına dönüştürebilecek güçlü enzimlere sahiptir. Bu mikrobiyal ekosistem içerisinde rumen fungusları gerek yüksek enzim aktiviteleri ve gerekse fibrolitik materyali parçalama modlarının farklı olması nedeniyle ayrı bir yere sahiptir.

Anaerobik fungusların Orpin (1974; 1975) tarafından keşfedilmelerinden bu yana, bu funguslara ait *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomycetes* ve *Cyllumyces* olmak üzere 6 farklı cins tanımlanmıştır. Anaerobik funguslar, fibrolitik bakteri ve protozoanlar tarafından büyük ölçüde kolonize edilmiş bir ekosistem içerisinde yaşayabilmekte ve çoğalabilmektedir. Bu başarı, fungusların diğer rumen mikroorganizmaları tarafından kolaylıkla sindirilemeyen bitki dokularından faydalanabilmeleri ile ilişkili görülmektedir. Araştırmalar anaerobik fungusların lignoselülozik materyalin sindirilmesinde büyük rol oynadığını göstermiştir (Lowe ve ark., 1987). Bitki hücre duvarlarını oluşturan polimerlerin yıkımında, genetik mühendisliği yöntemleriyle suni olarak oluşturulmuş mutant *Trichoderma reesei* C30 suşundan bile daha başarılı oldukları bildirilmiştir (Wood ve ark., 1986).

Yukarıda anlatılanlar ışığında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı bünyesinde anaerobik fungus kültür koleksiyonu oluşturma çalışmaları başlatılmıştır. Dünyanın sayılı birkaç ülkesinde bulunan anaerobik fungus kültür koleksiyonlarına bir yenisini ekleyecek olan bu çalışma ile ülkemizin gen kaynakları da araştırılmış olacaktır. En kuvvetli selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimlerin üretim kaynağı olan bu mikroorganizmaların korunması ve etkin bir şekilde kullanımı ile ülkemizde hala önemli bir döviz kaybına neden olan ve endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimlerin elde edilmesinde kaynak oluşturacaktır.

Materyal ve Metot

Anaerobik Besiyeri

Anaerobik besiyeri Orpin (1976)'e göre hazırlanmıştır. Besiyeri 150 ml/lit rumen sıvısı, 6 g/lit NaHCO₃, 2.5 g/lit maya özütü, 10 g/lit peptone, 1 g/lit L-sistein hidroklorür, ve 1 mg/lit rezaurin içermektedir. Besiyerinde kullanılan mineral solusyonlar ayrı hazırlanmıştır ve 150 ml/lit oranında ilave edilmiştir. Mineral Solusyon I:

%0.3 K₂HPO₄; Mineral Solution II: %0.3 KH₂PO₄, %0.6 NaCl, %0.6 (NH₄)₂SO₄, %0.06 CaCl₂, ve %0.06 MgSO₄, içermektedir. Besiyeri içerisindeki oksijenin uzaklaştırılması amacıyla bir yandan CO₂ ile muamele edilirken aynı zamanda kaynama noktasına kadar ısıtılarak yine CO₂ (%99) gazı altında Hungate tüplerine aktarılmış ve otoklav ile steril edilmiştir.

Anaerobik Fungusların İzolasyonu

Anaerobik fungus izolasyonu Theodorou ve ark. (1993)'nın seyreltme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre 10 gr dışkı örneği 100 ml bazal besiyeri içerisinde, CO₂ gazı altında çözülmüş ve buradan 10 ml alınarak içinde buğday samanı olan boş Hungate tüplerine aktarılmıştır. İlk seyreltilen örnekten 1 ml alınarak yeni 9 ml besiyeri içerisinde seyreltilmiş ve buğday samanı içeren boş Hungate tüplerine aktarılmıştır. Bu şekilde 10⁻¹, 10⁻² ve 10⁻³ oranlarında seyreltilerek samanlı Hungate tüplerine aktarılan dışkı örneği 3-10 gün süre ile 39 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Anaerobik ortamda muhtemel bakteri gelişimini engellemek için antibiyotik karışımı (Kloramfenikol: 100 µg/ml, Ampisilin: 100 µg/ml, Streptomisin: 140 µg/ml, Eritromisin: 200 µg/ml) kullanılmıştır.

Anaerobik Fungusların Saflaştırılması

Anaerobik fungusların saflaştırılması için, temeli Hungate (1969)'a dayanan Joblin (1981)'in Roll Tüp metodu kullanılmıştır. Hungate tüpleri içerisinde bulunan % 0.5 (w/v) glikoz ve % 1.5 (w/v) agar içeren bazal anaerobik besiyeri eritilip, yaklaşık 45 °C'ye soğutulmuştur. Bu besiyeri içerisinde daha önceden üretilmiş fungus kültüründen steril ortamlarda 0.5 ml enjekte edilmiş ve hemen soğuk su dolu küvet içerisinde çevrilerek besiyerinin donması sağlanmıştır. Fungusların gelişmesi için 39 °C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen fungus kolonileri, koloni morfolojilerine göre seçilmiş ve glikozlu sıvı besiyerine aktarılmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlandıktan sonra saf kültürler elde edilmiştir.

Anaerobik Fungusların Tanımlanması

Saflaştırılması tamamlanan anaerobik fungusların cins düzeyinde tanımlanması Olympus BX51 ışık mikroskopunda yapılmıştır. Rumen fungusları Orpin (1994)'e göre tanımlanmıştır (Çizelge 1).

Anaerobik Fungusların Stoklarının Oluşturulması

Saflaştırılan kültürler enerji kaynağı olarak buğday

samanı içeren Hungate tüplerine ekilmiştir. Yeterli miktarda gelişme gösteren kültürlerden saman içerisine filizlenmiş funguslar saman ile beraber alınarak, steril karyovial tüplerine anaerobik şartlarda aktarılmıştır. Karyoviallerin içerisine 1 ml %15'lik (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Karyoviallerin ağzı kapatıldıktan sonra önce -20 °C'de dondurulmuş daha sonra sıvı azot içerisine bırakılarak uzun süreli stoklarının oluşturulması sağlanmıştır. Sıvı azotta saklanan kültürlerin canlandırılması için sıvı azottan çıkarılan stok kültür önce oda sıcaklığında eritilmiş, ardından samanlı besi yerlerine aktararak 39 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Anaerobik funguslar ilk defa geçtiğimiz yüzyılın başlarında Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından gözlemlenmiş ancak bu organizmaların kamçılı protozoa oldukları düşünülmüştür. Orpin (1974; 1975) yaptığı çalışmalar sonucunda bu organizmaların anaerobik fungus olduklarını ve rumen sıvısında geçirdikleri hareketli bir zoospor evresi ile bitki parçalarını kolonize ettikleri bir vejetatif evre olmak üzere iki temel kısımdan oluşan yaşam döngüleri olduğunu bildirmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda rumen fungusları rumen, omasum, abomasum, ince barsak, sekum ve kalın barsaktan başarı ile izole edilebilmiştir (Davies ve ark., 1993). Theodorou ve ark. (1990)'nın anaerobik fungusları dışkıdan izole etmeleri bu fungusların yaşam döngüsünde oksijene ve farklı sıcaklıklara dayanıklı üçüncü bir aşamanın da olduğunu göstermiştir. Herbivor hayvanların dışkı örneklerinin kolayca toplanabilmesi, taşınabilmesi ve saklanabilmesi bu organizmaların dışkıdan daha kolay izole edilebilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada kullanılmak üzere Türkiye'nin değişik bölgelerinden farklı hayvanlara ait dışkı örnekleri kağıt örnek kaplarına alınmak sureti ile toplanmış ve sonraki

çalışmalar için laboratuarda - 20 °C'de saklanmıştır. Alınan dışkılardan taze olmasına, hangi hayvana ait olduğuna ve havayaların besleme şekillerine özellikle dikkat edilmiştir. Bu çerçevede 100 adet dışkı örneği toplanarak laboratuvarımızda saklanmıştır. Çizelge 2'de toplanan dışkı örnekleri ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Anaerobik fungusların izolasyonu için 100 adet dışkı en az 2 defa taranmış ve 54 adet dışkıdan anaerobik fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Anaerobik fungusların izolasyonu ve alt kültürlere alınması işlemi enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren anaerobik sıvı besi ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Rumen funguslarının besin gereksinimleri, hızlı büyüme oranları, fermentasyon ürünlerinin birikmesi ve oksijene olan hassasiyetlerinden dolayı sürekli olarak alt kültürlere alınması gerekmektedir. Buğday samanı içeren besi ortamlarında yetiştirilen kültürlerin canlılıklarını koruyabilmeleri için 2-7 gün arasında alt kültürlere alınması gerekmektedir. Çözünür karbonhidratları içeren besi ortamlarında geliştirilen kültürlerin daha sık (1-2 gün) alt kültürlerinin yapılması gerekmektedir (Davies ve ark., 1993). İzole edilen fungusların alt kültürlerinin alınması sırasında 9 tanesi kaybedilmiştir. Geriye kalan 45 adet izolat rol-tüp metodu kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu teknik rumenden selülitik bakterilerin izolasyonu ve sayılması için geliştirilmiştir (Hungate, 1969) ancak anaerobik fungusların izolasyonu ve saflaştırılması için de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Joblin, 1981).

Chytridiomycetes içerisinde yer alan funguslar kısa hayat döngüsüne sahiptirler ve kültür koleksiyonlarının oluşturulması ve devam ettirilmesi için sıkça alt kültürlere alınmaları gerekmektedir. Rumen fungusları için mükemmel anaerobik şartların sağlanması bu fungusların yaşamlarını sürdürebilmeleri için zorunlu

Çizelge 1. Anaerobik fungusların cins düzeyinde tanımlama anahtarı

1	Vejetatif safha / monosentrik Polisentrik	2. maddeye gidilir 5. maddeye gidilir
2	Zoosporları > 4 kamçıya sahip olanlar Zoosporları 1-4 kamçıya sahip olanlar	<i>Neocallimastix</i> 3. maddeye gidilir
3	Vejetatif safhada küresel rizoidlere sahip olanlar Vejetatif safhada filamentli rizoidlere sahip olanlar	4. maddeye gidilir <i>Piromyces</i>
4	Vejetatif safhada monosentrik büyüme Vejetatif safhada polisentrik büyüme	<i>Caecomyces</i> <i>Cyllamyces</i>
5	Zoosporları tek kamçıya sahip olanlar Zoosporları çok kamçıya sahip olanlar	<i>Anaeromyces</i> <i>Orpinomyces</i>

Çizelge 2. Dışkı örneklerinin alındığı yerler, hayvanlar ve fungus üremesi gösteren örnek sayısı

Alındığı Yer	Örnek Sayısı	Fungus Elde Edilen Örnek Sayısı
Şanlıurfa	25	13
K.Maraş	26	18
Lalahan	10	3
Gürün	7	7
Kelkit	6	2
Samsun	6	4
Antalya	5	-
Gökyar	5	5
Gümüşhane	2	-
Elmalı	4	-
Sinop	2	-
Maçka	1	1
Trabzon	1	1
Toplam	100	54
Hayvan Türü		
Sığır-İnek	84	47
At	5	-
Koyun	4	2
Keçi	6	4
Deve	1	1
Toplam	100	54

olması nedeni ile büyük kültür koleksiyonlarının oluşturulması aerobik Chytrid'lere göre çok daha zaman alıcı ve zahmetlidir. Anaerobik fungusların uzun dönemli kültürlerini yapmanın en iyi yolu karyoprezervasyon metodudur (Gleason ve ark, 2007). Philips ve Gordon (1988) karyoprezervasyon için %10'luk gliserol, Yarlett ve ark. (1986) ise %5'lik dimetil sülfoksit (DMSO) kullanmışlardır. Laboratuvarımızda izole edilen funguslar %10'luk gliserol kullanılarak saklanmak üzere sıvı azot içerisine bırakılmıştır. Ancak sıvı azottan tekrar canlandırılmak üzere çıkarılan funguslardan 24 tanesi kaybedilmiş, 21 adet fungus başarı ile canlandırılmıştır. Bunun üzerine karyoprezervasyon için farklı konsantrasyonlarda gliserol denenmiş ve en başarılı sonuç %15'lik gliserol ile elde edilmiştir (Data sunulmamıştır).

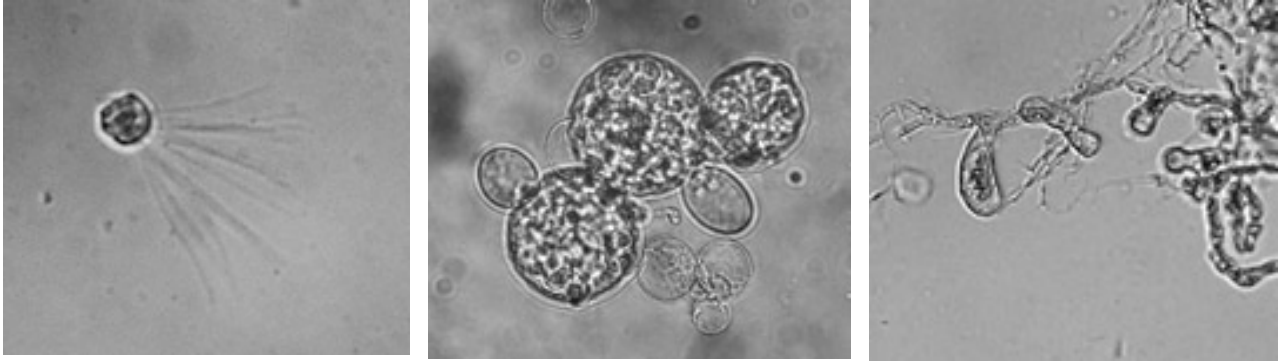
Rumen fungusları sistematikte *Chytridiomycetes* sınıfının altında Neocallimasticales takımı içerisinde yer almıştır (Li ve Heath, 1992; Li ve ark, 1993). Morfolojik özelliklere göre anaerobik funguslar monosentrik ve polisentrik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Monosentrik fungus sadece bir adet sporangium (spor kesesi) içerirken polisentrik funguslar birden fazla spor kesesi içermektedirler. Ayrıca

monosentriklerin spor keseleri boyut ve şekil bakımından farklılıklar göstermektedir (Li ve ark., 1997). Ayrıca rizoidlerinin filamentli veya küresel olması, zoosporlarının tek kamçılı veya çok kamçılı olması rumen funguslarını birbirinden ayıran özelliklerdir (Theodorou, 1996). Bu çalışmada saflaştırılan izolatlar, öncelikle agarlı besi ortamında koloni morfolojilerine göre monosentrik veya polisentrik olarak tanımlanmıştır. Küresel rizoide sahip olan monosentrik funguslar *Caecomyces* olarak teşhis edilmiştir. Filamentli rizoide sahip olan funguslar, glikoz içeren sıvı besi ortamında yetiştirilerek bol miktarda zoospor vermeleri sağlanmıştır. Zoosporların sahip oldukları kamçı sayısı tespit edilmiş ve Çizelge 1'de verilen kriterlere göre tanımlaması yapılmıştır.

Çizelge 3. Kültür koleksiyonumuzda yer alan anaerobik fungusların listesi

Sıra No	İzolat Adları	Cins	Örnek Yeri	Hayvan
1	GMLF 1	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Sığır
2	GMLF 2	<i>Neocallimastix</i> sp.	Maçka	Sığır
3	GMLF 3	<i>Neocallimastix</i> sp.	Kelkit	Sığır
4	GMLF4	<i>Neocallimastix</i> sp.	Ş.Urfa	Sığır
5	GMFL 5	Polisentrik	Gürün	Sığır
6	GMLF 6	Polisentrik	K.Maraş	Sığır
7	GMLF 7	<i>Neocallimastix</i> sp.	Lalahan	Sığır
8	GMLF 8	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Dağ Keçisi
9	GMLF 9	<i>Neocallimastix</i> sp.	Trabzon	Sığır
10	GMLF 10	<i>Neocallimastix</i> sp.	Samsun	Sığır
11	GMLF 11	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Sığır
12	GMLF 12	<i>Caecomyces</i> sp.	K.Maraş	Sığır
13	GMLF 13	<i>Caecomyces</i> sp.	K.Maraş	Sığır
14	GMLF 14	<i>Caecomyces</i> sp.	K.Maraş	Sığır
15	GMLF 15	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Sığır
16	GMLF 16	Polisentrik	Gürün	Koyun
17	GMLF 17	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Sığır
18	GMLF 18	Polisentrik	Gürün	Koyun
19	GMLF 19	Polisentrik	Gürün	Sığır
20	GMLF 20	<i>Neocallimastix</i> sp.	Lalahan	Sığır
21	GMLF 21	Polisentrik	Lalahan	Sığır
22	GMLF 22	<i>Neocallimastix</i> sp.	Lalahan	Sığır
23	GMLF 23	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Keçi
24	GMLF 24	<i>Neocallimastix</i> sp.	Lalahan	Sığır
25	GMLF 25	<i>Neocallimastix</i> sp.	K.Maraş	Sığır

Polisentrik funguslar besi ortamına zoospor bırakmadıkları için fungal rizoidler hızlıca çalkalanarak kırılmaya çalışılmış ve zoosporlarının serbest kalması



A

B

C

Şekil 1. Bazı fungal izolatların mikrografları. *Neocallimastix* sp.'e ait zoospor (a), *Caecomyces* sp. (b) ve *Orpinomyces* sp. (c) görülmektedir.

amaçlanmıştır. Ancak polisentrik fungusların ait oldukları cinsi belirlemek için yeteri kadar zoospor sayılamadığı için bu funguslar sadece polisentrik olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).

Laboratuar koşullarına uyum gösterebilen 21 adet anaerobik fungus izolatu tanımlandıktan sonra suş numaraları verilerek ileride yapılacak olan filogenetik analizler, enzim denemeleri ve biyoteknolojik uygulamalar için tekrar sıvı azotta stok kültürler şeklinde saklanmışlardır. Çizelge 3'de kültür koleksiyonumuzda bulunan anaerobik fungusların listesi açıklanmıştır.

Çizelge 3'de görüldüğü gibi Türkiye'nin farklı bölgelerinden anaerobik fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Dışkı kaynağı olarak at dışında tüm hayvanlardan fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Atlardan fungus elde edilememesinin nedeni olarak besinlerin içeriği (arpa ezmesi, yulaf ezmesi, havuç, sığır besi yemi) düşünülmüştür. Çünkü rumendeki anaerobik fungus popülasyonunun varlığını etkileyen en kritik faktör hayvana verilen besinin fibril ve lignoselülozik içeriğidir (Gordon ve Philips, 1998). Rumen fungusları yüksek fenolik içeriği bulunan lignoselülozik bitki dokularını hızlıca kolonize ederek sahip oldukları güçlü fibrolitik enzimler ile bu dokuların degradasyonunu sağlar (Theodorou ve ark., 1996). Yüksek enerjili ancak düşük fibril içerikli rasyonlar rumendeki bakteri popülasyonunun hızlı bir şekilde artmasına ve rumen pH'sının hızlı bir şekilde düşmesine neden olmaktadır. Düşük pH'da ise anaerobik funguslar büyük ölçüde elimine olmaktadır.

Sonuç

Şu ana kadar bilinen en aktif pek çok enzimi üreten

ruminant hayvanların sindirim sisteminin mikrobiyal ekosistemi konusunda ülkemizde yapılan çalışmalar oldukça yetersiz düzeydedir. Oluşturulan kültür koleksiyonu anaerobik fungusların araştırılması için önemli bir başlangıç oluşturmaktadır.

Burada kültür koleksiyonumuza başlangıç olarak kazandırılan 16 adet *Neocallimastix* sp., 6 adet polisentrik fungus, 3 adet *Caecomyces* sp. suşları ileride yapılacak çalışmalar için temel oluşturacaktır. Bu fungusların sistemattikte yerleri PCR-RFLP, RAPD vs. gibi moleküler teknikler kullanılarak belirlenecektir. Bununla beraber salgıladıkları güçlü fibrolitik enzimlerin çeşitleri ve aktiviteleri tespit edilecektir. Bu enzimleri kodlayan genler çeşitli mikroorganizmalara aktarılacak ve amacına göre faydalanılacaktır. Bu enzimlerin ülke ekonomisine katkı sağlaması umulmaktadır.

Ülkemizin çok çeşitli bölgelerinden dışkı örnekleri toplanacak ve izolasyon çalışmaları sürekli olarak devam edecektir. Böylece kültür koleksiyonumuz sürekli genişletilerek ülkemiz gen kaynakları araştırılmış ve korunmuş olacaktır. Ayrıca rumende ve tek mideli herbivorların sindirim sistemlerinde henüz keşfedilmeyi bekleyen yeni fungusların bulunabileceği Rumen Mikrobiyologları'nın ortak görüşüdür. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile anaerobik funguslar ile ilgili aydınlatılmamış pek çok konunun araştırılması için bir zemin hazırlanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (Proje No: 2003/7-59 ve 2004/3-7) ve TÜBİTAK (104 O 296) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Braune, R., 1913. Untersuchungen über die in Wiederkäuern vorkommenden Protozoen. *Archiv Protistenk* 32: 111-170.
- 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.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I., Trinci, A.P.J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology* 139: 1395-1400.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P. 1992. Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUTC-30 on Hemicellulose Substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 315-322.
- Gleason, F.H., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Boyle, D.G., Hyatt, A.D. 2007. Preservation of Chytridiomycota in culture collections. *Mycological Research* 111: 129-136.
- Gordon, G.L.R., Philips, M.W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews* 11: 133-168.
- Ho, Y.W., Bar, D.J.S. 1995. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia* 87: 655-677.
- Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: *Methods In Microbiology*, 3B (J.R. NORRIS and D.W. RIBBONS editor). Academic Press. London: 117-132.
- Itabashi, H. 2004. Recent topics in rumen microbiology with particular reference to animal production in Japan. *Microbes Environment* 19(4): 270-275.
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 1119-1122.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89 (1): 124-135.
- Li, J., Heath, I.B. 1992. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticeae) and the chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 70: 1738-1746.
- Li, J., Heath, I.B., Packer, L. 1993. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticeae) and the chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of the Neocallimasticales ord. nov. *Canadian Journal of Botany* 71: 393-407.
- Li, X.L., Chen, H., Ljungdahl, L.G. 1997. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-Terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12): 4721-4728.
- Liebetanz, E. 1910. Die parasitischen protozoen des wiederkäuermagens. *Archiv Protistenk* 19: 19-80.
- Lowe, S.E., Griffith, G.W., Milne, A., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J. 1987. Life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *J.Gen.Microbiol.* 133: 1815-1827.
- Moharrey, A., Das, T.K. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 513-529.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 711-729.
- Orpin, C.G. 1974. The rumen flagellates *Callimastix frontalis* and *Monas communis*- zoospores of phycomycete fungi. *Journal of Applied Bacteriology* 37: IX-X.
- 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. 1977. 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. 1994. Anaerobic fungi: Taxonomy, biology and distribution in nature. *Anaerobic Fungi* eds. Mountfort, D.O. and Orpin, C.G., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-45.
- Phillips M.W., Gordon G.L.R. 1988. Sugar and polysaccharide fermentation by rumen anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *BioSystems* 21: 377-383.
- Russel, J.B., Rychlik, J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292: 1119-1122.
- Selinger, L.B., Forsberg, C.W., Cheng, K.J. 1996. The rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe* 2: 263-284
- Theodorou, M.K., Davies, D.R., Jordon, M.G.C., Trinci, A.P.J., Orpin, C. 1993. Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological Research* 97: 1245-1252.

- Theodorou, M.K., Mennim, G., Davies, D.R., Zhu, W.Y., Trinci, A.P.J., Brookman, J.L. 1996. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proceedings of the Nutrition Society* 55: 913–926.
- Wood, T.M., Wilson, C.A., McCrea, S.I., Joblin, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 37-40.
- Yarlett, N.C., Yarlett, N., Orpin, C.G., Lloyd, D. 1986. Cryopreservation of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Letters in Applied Microbiology* 3: 1–3.