

Araştırma Makalesi

Tunceli Yöresindeki At Dışkısı Örneklerinden İzole Edilen Anaerobik Gut Funguslarının (*Piromyces* spp.) Saf Kültürdeki Fibrolitik Aktiviteleri ve Moleküler Tanımlanması

Bülent KAR 

Gönderim: 14.10.2024

Kabul: 22.11.2024

Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü, Tunceli, Türkiye; bkar@munzur.edu.tr

Özet: Bu çalışma, Türkiye'nin Tunceli ilindeki at dışkılarından anaerobik gut funguslarının (AGF) izolasyonu, karakterizasyonu ve enzim özelliklerine odaklanmaktadır. At dışkısından *Piromyces* cinsine ait iki izolat MUBAM_F1 ve MUBAM_F2, morfolojik ve moleküler teknikler kullanılarak izole edilmiş ve kısmen tanımlanmıştır. ITS bölgesinin Blast analizi, her iki izolatında *Piromyces* cinsi içerisinde bir tür olduğu doğrulamıştır (sırasıyla %98.24 ve %98.87 benzerlik). Enzimatik analizler, her iki izolat için de önemli ksilanaz ve karboksimetil selüloz aktivitesinin olduğunu göstermiştir. MUBAM_F1, toplam 47.13 ± 0.10 $\mu\text{mol/dak/ml}$ (spesifik aktivite: 2153.93 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) ksilanaz aktivitesi gösterirken, toplam 35.56 $\mu\text{mol/dak/ml}$ (spesifik aktivite: 1626.52 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) karboksimetil selüloz aktivitesi göstermiştir. MUBAM_F2, 57.53 ± 0.08 $\mu\text{mol/dak/ml}$ 'de daha yüksek toplam ksilanaz aktivitesi göstermiş (spesifik aktivite: 2630.11 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) ancak 23.93 ± 1.41 $\mu\text{mol/dak/ml}$ 'de daha düşük karboksimetil selüloz aktivitesine (spesifik aktivite: 1098.66 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen veriler, *Piromyces* sp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'nin ksilanaz ve karboksimetil selüloz enzimlerinin umut vadeden kaynakları olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Anaerobik gut funguslar; *piromyces* sp.; at; ksilanaz ve karboksimetil selüloz

Fibrolitic Activity and Molecular Identification of Anaerobic Gut Fungi (*Piromyces* spp.) in Pure Culture Samples, Isolated from Local Horse Faeces of Tunceli

Abstract: This study focuses on the isolation, characterization, and enzyme properties of anaerobic gut fungi (AGF) isolated from horse feces in Tunceli province, Turkey. Two *Piromyces* strains, MUBAM_F1 and MUBAM_F2, isolated from horse feces were identified using morphological and molecular techniques. Blast analysis of the ITS region confirmed that both isolates are belong to the genus *Piromyces* (98.24% and 98.87% similarity, respectively). Enzymatic analyses showed significant xylanase and carboxymethyl cellulase activities for both isolates. MUBAM_F1 showed total xylanase activity of 47.13 ± 0.10 $\mu\text{mol/min/ml}$ (specific activity: 2153.93 $\mu\text{mol/min/mg}$ protein) while total carboxymethyl cellulase activity of 35.56

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ (specific activity: $1626.52 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein). MUBAM_F2 was determined to have higher total xylanase activity at $57.53 \pm 0.08 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ (specific activity: $2630.11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) but lower carboxymethyl cellulase activity at $23.93 \pm 1.41 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ (specific activity: $1098.66 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein). The data obtained in the study indicate that *Piromyces* sp. MUBAM_F1 and MUBAM_F2 are promising sources of xylanase and carboxymethyl cellulase enzymes.

Keywords: Anaerobic gut fungi; *piromyces* sp.; horse, xylanase and carboxymethyl cellulase

1. Giriş

Herbivor canlılar arasında ruminant ve ruminant olmayan birçok hayvan bulunmaktadır. Bu herbivor canlıların sindirim kanalı da anatomik olarak farklılıklar göstermektedir. Ruminant hayvanların mideleri dört bölümden oluşmakta iken diğer hayvanların mideleri tek bölmeden oluşmaktadır [1]. Herbivorlar bitkisel besin tüketimi ağız, ösafagus, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak şeklinde bir sindirim kanalı yolu izlemekte ve ağız kısmının bitkisel ürünlerin mekanik olarak ilk sindirim yeri oldukları güçlü azı dişleri sayesinde sindirimin ilk basamağını gerçekleştirmektedir [2]. Atlar, mikrobiyal fermentasyon yoluyla bitki yapısal polisakaritlerinden enerji ve besin elde etmelerini sağlayan genişlemiş arka bağırsak adaptasyonu, otlak ortamlarında serbest dolaşan otçullar olarak evrimleşmiştir. Arka bağırsak (hindgut); birlikte sindirim kanalı hacminin üçte ikisini oluşturan iki ana fermentatif odadan, çekum ve kolondan oluşur. Arka bağırsağın toplam kapasitesi 200 L'nin üzerindedir [3] ve diyet parçacıklarının ortalama geçiş süresinin (23-48 saat) %75'ini oluşturur [4]. Arka bağırsak bakterilere, anaerobik funguslara, metanojenik arkelere ve protozoalara ev sahipliği yapar. Bunlardan anaerobik funguslar (*Neocallimastigomycetes*), eksiksiz ve çok etkili bitki hücre duvarı bozunma enzim setleri sayesinde bitki liflerini parçalama açısından en güçlü olanlardır [5-7]. Atın arka bağırsağında doğumdan [8] sonraki birkaç hafta içinde bulunmalarına rağmen, anaerobik funguslara ilişkin mevcut bilgilerin neredeyse tamamı ruminant hayvanlara dayalı çalışmalardan elde edilmektedir.

Anaerobik fungusların 20 cinsi, filamentli monosentrik (*Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Buwchfawromyces*, *Ghazallomyces*, *Aklioshbomyces*, *Agriosmyces*, *Capellomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces*, *Tahromyces*, *Aestipascumyces*, *Paucimyces*), filamentli polisentrik (*Orpinomyces*, *Anaeromyces* ve *Pecoromyces*) ve soğanlı (*Caecomyces* ve *Cyllamyces*) miselyum içerenler de dahil olmak üzere, yetiştirilen temsilcilere dayanarak geçerli bir şekilde tanımlanmıştır [5,9], yakın zamanda yeni monosentrik cins *Feramyces* [10] ve *Liebetanzomyces* [11] ile genişletilmiştir. Bununla birlikte, bu cinsler, *Neocallimastigomycetes* içindeki potansiyel olarak yeni, henüz kültürlenmemiş kuşaklara ait olan veri tabanlarındaki çok sayıda ve giderek artan sayıda kopyalanmış İnternal Transcribed Spacer (ITS1) bölge 1 dizilerinin gösterdiği gibi anaerobik fungus çeşitliliğinin yalnızca bir kısmını temsil etmektedir. Anaerobik Gut Fungus (AGF)'ların filogenetik analizi yapılırken en fazla kullanılan dizilim metodudur. ITS bölgesi korunaklı olmakla beraber AGF'lar arasındaki farklılıkları bu bölge üzerindeki çalışmaların önemini artırmıştır. ITS bölgesi için her canlıya ait özel primer tasarlanmaya gerek olmaması ve kromozomal kütüphaneye gerek duyulmaması da bu bölgenin tercih edilmesinde önemli bir etkidir. Yetiştirilen anaerobik fungus cinsleri, at örneklerinde sınırlı olarak bulunmuştur

(*Caecomyces*'in %4-12'si, *Neocallimastix*'in %2'si, *Piromyces*'in %0.3'ü, *Anaeromyces*'in %0.1-0.3'ü). Bu sonuçlar, atların sindirim sisteminin büyük ölçüde yeni, henüz kültüre edilmemiş anaerobik funguslar tarafından işgal edildiğini ve bunların daha önce ön bağırsak otçullarından tanımlananlardan farklı olduğunu göstermektedir. *Piromyces*, otçulların sindirim kanallarında bulunan anaerobik gut fungusların bir cinsidir. AGF'lar, ruminant hayvanların bitki materyallerinin sindirmesinde katkıda bulunurlar [12]. Şimdiye kadar *Piromyces* üzerine yapılan araştırmaların birçoğu tür tanımlama, metabolik yolları ve enzim aktivitelerini kapsamaktadır. *Piromyces mae* ve *Piromyces dumbonica*, sırasıyla sporangium üzerindeki papilla benzeri yapılar ve C şeklinde uzun bir sirkumflagellar halka gibi benzersiz morfolojik özelliklerle ayırt edilen ilk tanımlanan türler olarak ortaya çıkmaktadır [13]. Sahra eşşeklerinin kurtulmuş dışkılarından izole edilen başka bir tür olan *Piromyces rhizinflata*, morfolojik ve ultra yapısal özellikleri bakımından farklılık gösteren bir türdür [14]. Atların kör bağırsağından izole edilen ve diğerlerinden belirgin morfolojik ve metabolik özelliklere sahip yeni bir anaerobik mantar olan *Piromyces citronii*'dir [15]. *Piromyces polycephalus*, ayırt edici küresel ila oval bazal gövdesi ve çok sporangiatlı sporangiyumlarıyla karakterize edilen bir diğer yeni türdür [16,17]. Atların anaerobik gut fungus çeşitliliğinin moleküler bazlı analizi (ITS1 bazlı klon kütüphaneleri) dışkı numuneleri üzerinde gerçekleştirilmiştir [18]. Ancak hala, at gibi tek toynaklı otoburlarda tanımlanması gereken birçok AGF bulunmaktadır. Ayrıca *Piromyces* türlerinin metabolik ve enzimatik yetenekleri, konakçılarının sindirim süreçlerindeki önemlerini ve biyoteknolojideki potansiyelleri hakkında eksik bilgiler bulunmaktadır. Yukarıda belirtilen durumlar göz önüne alındığında at gibi tek toynaklı (*Perissodactyla*) otoburlardan izole edilen AGF'lar hakkındaki bilgiler çok azdır. Bu açıdan bu çalışmada Tunceli bölgesindeki çiftliklerde bulunan at dışkı örneklerinden AGF izolasyonu yapılarak morfolojik, moleküler tanımlanması ve fibrolitik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Dışkı örneklerinin toplanması

Dışkı örnekleri, Tunceli bölgesinde bulunan halk elinde yük hayvanı olarak kullanılan atlardan (10 farklı örnek) alınmıştır. Yaklaşık 20 gram taze dışkı örnekleri toplanmıştır. Numuneler etiketli plastik kaplara yerleştirilerek laboratuvara nakledilmiş ve izolasyona tabi tutulmuştur. Kullanılmayan örnekler tekrar kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. Anaerobik besi ortamının hazırlanması

Anaerobik fungus ortamı daha önceden tarif edildiği gibi (150 ml/L rumen sıvısı, 6 g/L NaHCO₃, 2,5 g/L yeast extract, 10 g/L pepton, 1 g/L L-sistein hidroklorür ve 1 mg/L resazurin, 150 ml/L) mineral çözeltisi I: %0,3 K₂HPO₄, 150 ml/L mineral çözeltisi II: %0,3 KH₂PO₄, %0,6 NaCl, %0,6 (NH₄)₂SO₄, %0,06 CaCl₂ ve %0,06 MgSO₄) tamamen oksijensiz formda hazırlanmıştır [52]. Anaerobik besi yeri Hungate tüpleri (16 x 125 mm, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, U.S.A.) içerisine son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde enerji kaynağı (glukoz, selüloz, ksilan ve buğday samanı) koyulması ile elde edilmiştir. Samanlı besi ortamı 121 °C'de 15 dk, glukozlu besi ortamı ise 110 °C'de 10 dk otoklav edilmiştir [19].

2.3. Anaerobik fungus izolasyonu, saflaştırması, alt kültüre alması ve morfolojik tanımlanması

Toplanan dışkı örneklerinden AGF izolasyonu için anaerobik teknikler kullanılarak 39°C'lik inkübasyon sıcaklığı sağlanmıştır. Besi ortamlarında bakteriyel kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla antibiyotik karışımı (kloramfenikol: 100 µg/ml, ampisilin: 100 µg/ml, streptomisin: 140 µg/ml, eritromisin: 200 µg/ml) kullanılmıştır. İzolasyon Theodorou ve ark.'nın [20] seyreltme yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre 10 g dışkı örneği anaerobik ortamda 100 ml bazal sıvı besiyerinde eritilerek 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} da seyreltmeler yapılmış ve içlerinde buğday bulunan Hungate tüplerine aktarılmıştır ve inkübatörde 39°C'de 3–20 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üreme görülen kültürler, Hungate yöntemi esas alınarak Joblin'in "Roll Tube" yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işlemi her numune için üç kez tekrarlanmıştır. Cins düzeyinde saflaştırması tamamlanan AGF'nin tanımlanması için örneklerin koloni morfolojileri ile sıvı ve katı ortamdaki farklılıkları morfolojik olarak incelenmiştir. Saflaştırılmış olan anaerobik fungusların cins düzeyinde tanımlanması Leica ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Anaerobik fungusların morfolojik tanımlanması Çömlekçioğlu ve ark., [21] ve Bhagat ve ark., [22] göre yapılmıştır. Tanımlanan örnekler gerek ilerdeki çalışmalar gerekse çalışmada kullanılmak üzere uzun süreli stoklama için, saflaştırılan kültürler, enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren Hungate tüplerine aktarılmıştır. Yeterli miktarda üreme gösteren kültürlerden samanda çimlenen anaerobik funguslar pipetle birlikte alınarak anaerobik koşullar altında steril cryovial tüplere aktarılmıştır. Bu tüplere 1 ml %15 (h/h) gliserol eklenmiştir. Karyoviyallerin kapakları kapatıldıktan sonra önce -20°C'de dondurulmuş sonrasında ise sıvı nitrojen içerisinde konularak uzun süreli stoklar oluşturulmuştur.

2.4. DNA Ekstraksiyonu

DNA, üreticinin talimatlarına göre QIAamp DNA Tabure Mini Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak saf AGF kültürlerindeki hücre kısımlarından çıkarıldı. Ekstraksiyondan önce, her numunenin 200 mg'ı lizis tamponunda homojenize edildi ve özellikle mantar hücre duvarları için tam hücre lizisi sağlamak amacıyla boncuk dövme tekniği kullanılarak mekanik parçalanmaya tabi tutuldu [23]. Ekstrakte edilen DNA'nın varlığı ve konsantrasyonu agar jel elektroforezi ve bir NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Scientific, Wilmington, ABD) ile doğrulanmıştır.

2.5. AGF ITS bölgesi Amplifikasyonu ve Moleküler tanımlaması

AGF ITS bölgesi, fungus örneklerinin moleküler olarak belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu kullanılmıştır. Amplifikasyon için kullanılan primerler, anaerobik mantarların ribozomal DNA'sını hedeflemek üzere özel olarak tasarlanmış olan daha önceki çalışma [24] baz alınarak kullanılmıştır (Tablo 1). Bu primerler, özgüllükleri nedeniyle mantar ITS bölgesi amplifikasyonu için kullanışlı primerlerdir. PZR reaksiyonları, 20 µL PZR Master Mix (Thermo Scientific), her primerden 1 µL (10 µM), 1 µL şablon DNA ve 18 µL nükleaz içermeyen su içeren 40 µL reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. PZR döngü koşulları: 94°C'de 5 dakika boyunca ilk denatürasyon adımı, ardından 94°C'de 30 saniye boyunca 35 denatürasyon döngüsü, 58°C'de 30 saniye boyunca yapışma ve 72°C'de 1 dakika uzatma, son olarak 72°C'de 10 dakika uzatma adımı. Tüm PZR reaksiyonları bir Bio-Rad termal döngü cihazı (Bio-Rad, Hercules, ABD) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Her PZR numune örneği iki kez tekrarlandı ve daha sonra amplifikasyon örnekleri agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı.

Tablo 1. Anaerobik gut funguslardaki ITS bölgesinin PZR amplifikasyonunda kullanılmış olan primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'...3')	Tm (°C)	Uzunluk	Kaynak
ITS_F	5-CTA CCG ATT GAA TGG CTT AGT G-3	58	~830 bp	[24]
ITS_R	5-AGT TCA GCG GGT ACT CTT ATC TG-3	58		

2.6. AGF ITS bölgelerinin Dizilenmesi ve Filogenetik Analizi

İzole edilen ve morfolojik tanımlamaları gerçekleştirilen AGF örneklerinin PCR amplifikasyonları, ileri ve geri primerleri (Tablo 1) kullanılarak her iki yönde dizilendi. Dizileme reaksiyonları BigDye® Terminator v3.1 Döngü Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi ve bir ABI PRISM 3130 Genetik Analiz Cihazı (Applied Biosystems) üzerinde analiz edilmiştir. Elde edilen diziler, Clone Manager 10 ve Chromas yazılımı kullanılarak elle düzenlendi ve birleştirildi. Taksonomik tanımlama için, ITS dizileri Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak GenBank veritabanıyla karşılaştırılmıştır. %97'den fazla benzerliğe sahip diziler bilinen türler olarak kabul edilmiştir.

2.7. Filogenetik analizler

Anaerobik gut funguslar arasındaki evrimsel ilişkileri araştırmak için, ITS dizileri kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çoklu dizi hizalaması MUSCLE algoritması kullanılarak oluşturulmuş ve filogenetik analiz, MEGA'da (sürüm 6.0) uygulanan maksimum olasılık yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [25, 26]. Dallar için istatistiksel desteği değerlendirmek amacıyla 1000 tekrarlı önyükleme analizi gerçekleştirilmiştir.

2.8. Attan İzole Edilen AGF'lerin Enzim Aktiviteleri

İzole edilen, tüm *Piromyces* spp. samanlı, selüloz ve ksilan üzerinde yetiştirildikten sonra ksilanaz ve selülaz aktiviteleri belirlendi. Daha önceki çalışmalarda [27,28] belirtildiği gibi, DNS yöntemi [29] kullanılarak hücre örneklerinin, ksilanaz ve selülaz aktivitelerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri hesaplanmıştır. Tüm enzim analizleri iki tekrar ve üç paralel ile gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi birimi 1 dakikada elde edilen 1 µmol indirgenmiş şeker olarak kabul edilmiştir.

2.9. Protein Tahmin Yöntemi

Enzim preparatlarının protein konsantrasyonları, sığır serum albümini (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 ve 1000 mg/ml) içeren ticari bir protein analiz kiti (Favorgen Biotech. Corp.) kullanılarak belirlenmiş ve 595 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur.

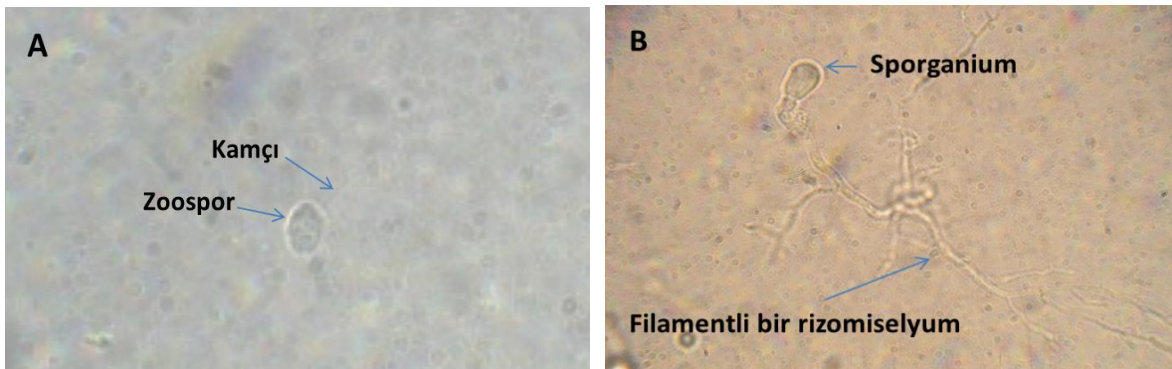
2.10. İstatistiksel Analiz

Deneyde kullanılan tüm işlemler üç tekrarlı olarak yapılmış olup, sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

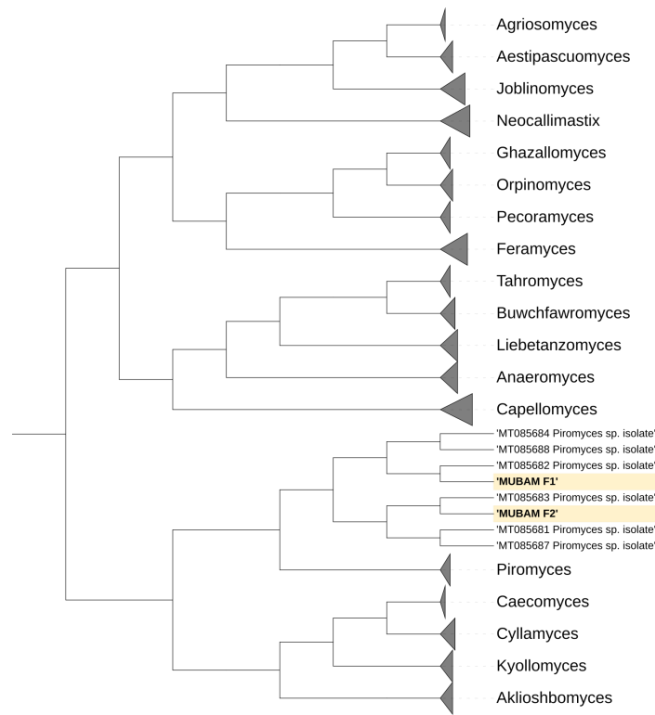
3.1. Anaerobik gut fungusların İzolasyonu, Morfolojik ve Filogenik özellikleri

Tunceli ilindeki çiftçilerdeki yük hayvanı olarak kullanılan 10 farklı at dışkısı örneğinden sadece 2 adet AGF izolasyonu yapılmıştır. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2 şeklinde adlandırılan AGF örnekleri stoklanmış ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Anaerobik mantarlar (Neocallimastigomycota) atların arka bağırsağında yaygın olarak bulunsa da [30], dışkılardan izolasyon sınırlı sayıda olmuştur [31,32]. Morfolojik tanımlama, anaerobik gut funguslarının cins düzeyinde belirlenmesinde kullanılabilir bir yöntemdir. At midesinden izole edilen AGF'nin morfolojik tanımlaması cins düzeyinde tanımlama anahtarları kullanılarak yapılmıştır [21,22]. Atların dışkı örneklerinden izole edilen her bir fungusun farklı çaplarda olduğu ve çok hızlı çoğaldığı belirlenmiştir. Önceki çalışmalar atlardan izole edilen *Piromyces* spp. örneklerinin 15 günden daha kısa, çok daha hızlı bir büyüme oranına sahip olduğunu da göstermiştir [33]. AGF izolatlarının (Munzur Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Merkezi Fungusları: MUBAM_F1 ve MUBAM_F2) 39°C'de anaerobik sıvı besiyerinde bir ay ekimden sonraki mikroskobik morfolojileri Şekil 1'de gösterilmektedir. Sonuçlar, izole edilen iki farklı AGF'nin benzer morfolojilere de sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1). Saflaştırılmış koloni örneklerini daha ayrıntılı olarak tanımlamak için floresans mikroskop (Leica floresans mikroskobu) kullanılmıştır. Zoosporlarının tek kamçılı, vejetatif formlarının filamentli rizomiselyumları olduğu görülmüştür (Şekil 1A-B). *Piromyces*, monoflagelle zoosporlara ve filamentli rizoit sistemine sahip monosentrik bir mantardır [34]. Bu morfolojik özellikler, 1990'larda ITS1 dizi verilerinin filogenetik analizine dayanarak cinsin polifiletik olduğu bildirilmesine rağmen, cinsin tanımlayıcı bir özelliği olarak kabul edilir. Benzer özelliklere sahip 2015'ten beri yeni fungus cinsleri olan *Buwchfawromyces*, *Oontomyces*, *Pecoromyces*, *Liebetanzomyces*, *Agriosomyces*, *Aklioshbomyces*, *Capellomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces* ve *Tahromyces* [35,36] tanımlanmış olması morfolojik özellikleri üzerinden tanımlama yapılırken dikkatli olunmasını gerektirmektedir. Mikroskobik olarak, *Piromyces* cinsindeki türler çoğunlukla tek kamçılı zoosporlar üretir (Şekil 1 A), ancak ara sıra iki kamçılı zoosporlar da üretebilirler. *Piromyces*, hem endojen hem de ekzojen (Şekil 1 B) sporangiyumlara sahip monosentrik bir tallusa sahiptir [34]. Bahsi geçen morfolojik özellikler MUBAM_F1 ve MUBAM_F2 örneklerinde de görülmüştür.



Şekil 1. Buğday samanı üzerinde kültüre edilmiş filamentli bir rizomiselyuma sahip monosentrik anaerobik bir mantarın ışık mikroskobu görüntüsü (A: Zoospor, B: Gelişmekte olan AGF).

Çalışma sonunda izole edilen ve morfolojik olarak tanımlanması yapılan AGF örneklerinin DNA izolasyonu başarı ile yapılmış ve ITS bölgesine ait primerler kullanılarak yaklaşık 830 bp uzunluğunda bir bölge elde edilerek DNA dizileme işlemi yapılmıştır. Moleküler tanımlama ve filogenetik analizler için ham veriler düzeltilmiş ve NCBI-BLAST analizi yapılmıştır. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2 suşlarının ITS bölgelerine ait BLAST analiz sonuçları sıralıyla, %98.24 (Ac. No. MT085685.1) ve %98.87 (Ac. No. MT085679.1) oranında *Piromyces* sp. olduğu belirlenmiştir. NCBI veri bankasındaki daha önceki ITS bölgeleri kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçta çalışmada izole edilen AGF'lerin *Piromyces* cinsi içerisinde olduğunu açıkça göstermektedir (Şekil 2). Başka bir ifadeyle her iki izolatta yüksek destek değerleri göstererek, monofiletik gruptan oluşan en azından cins düzeyinde daha önce tanımlanmış AGF cinsleri içerisinde kendilerine yer bulmuşlardır (Şekil 2). At'lar üzerine yapılan daha önceki çalışmalarda bu çalışmayı dolayısıyla at dışından *Piromyces* sp. örneklerinin izole edilmesini destekler niteliktedir. Bugüne kadar at bağırsağından en az altı cins izole edilmiş ve tanımlanmıştır. (*ces* , *Orpinomyces* , *Neocallimastix* , *Anaeromyces* , *Caecomyces* ve *Khoyollomyces*) [15,37]. Ayrıca yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesiyle birlikte, yeni birkaç türün varlığı ortaya çıkarılmış ancak tanımlanması yapılmamıştır [38]. Hess ve ark. [39] tarafından şimdiye kadar belirlenen AGF genom verileri değerlendirilerek yapılan bir çalışmada, atlarda yaygın olarak *Piromyces finnis*'in [40] bulunabileceğini göstermişlerdir.



Şekil 2. Filogenetik ağaç dizileri

Önceki çalışmalarda belirlenen AGF cinslerindeki türlerin ITS bölgelerinin DNA dizileri, bu çalışmada tanımlanan AGF suşları MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'nin ITS dizileriyle birlikte analiz edildi. Jukes-Cantor modeli ve maksimum olabilirlik yöntemi kullanılarak 1000 önyükleme tekrarı ile bir

filogenetik ağaç oluşturuldu. Bu çalışmadan elde edilen ITS dizileri ağaçta sarı renkle vurgulanmıştır ve daha önce tanımlanan AGF ITS bölgeleriyle benzerlikleri gösterilmiştir.

3.2. Tanımlanan Anaerobik gut fungusların enzimatik potansiyeli

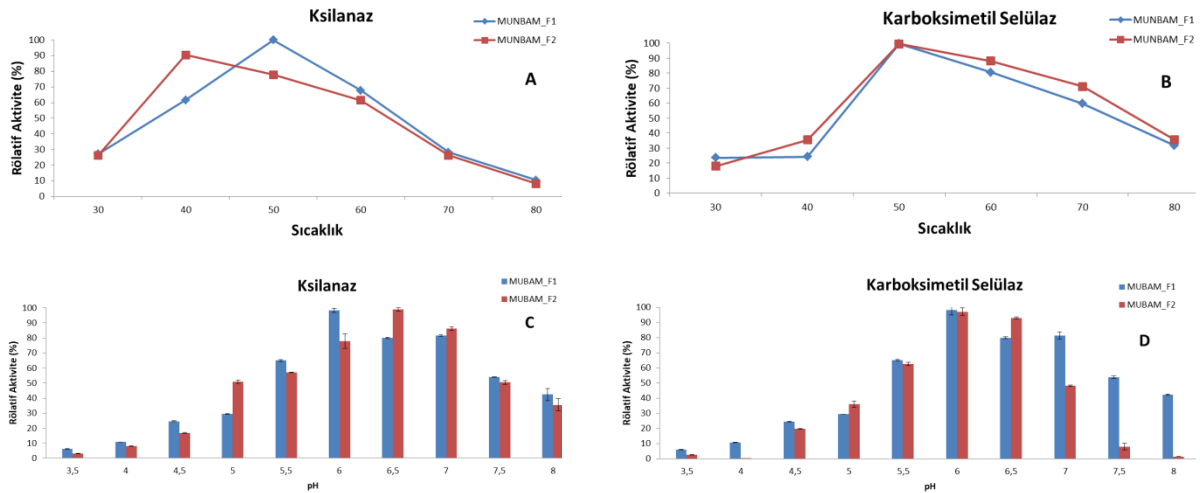
At dışkısından izole edilen *Piromyces* sp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2, bitki hücre duvarı polisakaritlerinin parçalanması için önemli enzimlerden olan ksilanaz ve karboksimetil selüloz aktiviteleri göstermektedir. Tablo 2’de özetlendiği gibi, çalışmada elde edilen anaerobik gut fungus izolatlarının önemli ksilanaz ve karboksimetil selüloz aktiviteleri sergilediği görülmüştür. Ancak, MUBAM_F1 her iki enzim açısından daha yüksek spesifik aktivite sahip olduğu, bunun sonucunda MUBAM_F2'ye kıyasla birim protein başına daha fazla aktif enzim ürettiğini göstermektedir. Bunun sebebi, *Piromyces* sp. MUBAM_F1’i tarafından üretilen enzimlerin yapısındaki farklılıklar, ifade seviyeleri veya translasyon sonrası modifikasyonlar gibi faktörlerden olabilir [41]. *Piromyces* gibi anaerobik gut mantarlar, karmaşık enzim sistemleri nedeniyle lignoselülozik biyokütleyi parçalama konusundaki olağanüstü yetenekleriyle bilinirler [42,43]. Otçulların sindirim kanallarından izole edilen *Piromyces* türleri üzerine yapılan çalışmaların birçoğunda bakteri veya diğer fungus türleriyle ko-kültür yapılarak elde edilen enzim kapasitesini [44], bu çalışmadaki izolatlar tek başlarına göstermiştir. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2 sırasıyla 47,13 $\mu\text{mol/dak/ml}$ ve 57,53 $\mu\text{mol/dak/ml}$ toplam ksilanaz aktiviteleri göstermektedir (Tablo 2). Bu değerler benzer mantar suşları için daha önce bildirilen aralıklardan önemli ölçüde daha yüksektir. Bu, izolatların at sindirim sistemindeki spesifik adaptasyonları, suşa özgü gen düzenlemesindeki farklılıkları, enzim performansını artıran translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle üstün ksilanaz üretimi sergilediği söylenebilir [45]. Yine diğer AGF ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, koyun rumeninden izole edilen *Neocallimastix frontalis*'in iki suşunda selüloz üretiminden ve sığır rumeninden izole edilen *Caecomyces* cinsinde karboksimetil selüloz (CMCase) ve ksilanaz aktivitelerinden fazla olduğu görülmüştür [46,47].

Tablo 2. At dışkularından izole edilen *Piromyces* sp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'nin hücresel toplam ($\mu\text{mol/dak/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dak/mg protein}$) ksilanaz ve karboksimetil selüloz aktiviteleri

İzolasyonlar	Ksilanaz		Karboksimetil selüloz	
	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite
MUBAM_F1	47.13±0.10	2153.93±101.97	35.56±0.27	1626.52±93.10
MUBAM_F2	57.53±0.08	2630.11±134.26	23.93±1.41	1098.66±118.80

Piromyces MUBAM_F1 ve MUBAM_F2 örneklerinin ksilanaz ve karboksimetil selüloz enzimler için sıcaklık ve pH optimum değerleri incelendiğinde, her iki izolat da 50°C'de optimum karboksimetil selüloz aktivitesi gösterirken, ksilanaz yönünden MUBAM_F1 50 °C'de, MUBAM_F2 ise 40 °C'de optimum aktivite göstermektedir (Şekil 3A ve 3B). Ksilanaz aktivitesi için optimum pH, MUBAM_F1 için yaklaşık 6.0 ve MUBAM_F2’de yaklaşık 6.5 olarak belirlenmiştir. Karboksimetil selüloz aktivitesi için optimum pH her iki suş için de yaklaşık 6.0'dır. Ksilanaz ve karboksimetil selüloz için pH optimumları izolatlar arasında bariz bir farklılık görülmemiştir. Bu enzimler için pH

optimumu 5,5 ile 7,0 arasındadır ve bağırsak ortamının hafif asidik ila nötr koşullarını yansıtmaktadır [48]. İzolatlarımızın enzim aktivite profilleri atlardaki sindirim sisteminin fizyolojik koşullarına iyi adapte olduklarını doğrular [49]. Ayrıca her iki suşun pH aktivite profilleri (Şekil 3C ve 3D) incelendiğinde, her iki enzim için de belirgin optimum pH aralıkları ile karakteristik çan eğrileri gösterdiği görülür. Bu bulgular, her izolatin enziminin belirli bağırsak koşulları altında optimum şekilde işlev göreceği şekilde evrimleştiğini göstermektedir (49). *Piromyces rhizinflata* ile yapılan bir çalışmada [50] iki farklı selüloz gen bölgesinin (Cel5B ve Cel6A), optimum aktivite koşulları, Cel5B' için pH 6,0 ve 50 °C ve Cel6A' için pH 6,0 ve 37–45 °C olarak belirlemişlerdir. Yine başka bir çalışmada *Piromyces rhizinflata* ait [51] gen bölgesi CelcdN'C' için optimum aktivite koşulları pH 5,5 ve 50°C olarak bulunmuştur. Çalışmada elde edilen veriler, *Piromyces* spp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'nin ksilanaz ve karboksimetil selüloz enzimlerinin umut vadeden kaynakları olduğunu göstermektedir. Ayrıca aktiviteleri ve değişen koşullara uyum sağlayabilmeleri göz önüne alındığında, biyokütle bozunumu, biyoyakıt üretimi ve gıda işleme gibi endüstriyel uygulamalar için potansiyel adaylar haline getirmektedir. Gelecekteki çalışmalarda, bu enzimlerin kinetik özellikleri ve kararlılıkları da dahil olmak üzere daha fazla karakterizasyonu, belirli uygulamalarda kullanımlarını optimize etmek için önemli olacaktır.



Şekil 3. *Piromyces* sp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'ye ait ksilanaz (A) ve karboksimetil selüloz (B) enzimlerinin farklı inkübasyon sıcaklıklarında gösterdiği aktiviteler. Yine aynı funguslara ait ksilanaz (C) ve karboksimetil selüloz (D) enzimlerinin farklı pH aralıklarındaki aktiviteleri

4. Sonuç ve Tartışma

Sonuç olarak, bu çalışma, atlardaki anaerobik gut mantar toplulukları hakkındaki bilgimize önemli bir katkıda bulunmaktadır. Bulgular, kültürlenmemiş AGF türlerinin rolleri ve sindirim sürecindeki etkileri konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. *Piromyces* sp. MUBAM_F1 ve MUBAM_F2'den elde edilen veriler, bilimsel literatürde bildirilen diğer izolatlarla karşılaştırıldığında daha yüksek enzimatik özellikler sergilemektedir. Çalışmada atlardan izole edilen bu AGF'lerin ksilanaz ve selüloz aktiviteleri daha önce tanımlanan *Piromyces* sp. suşlarından daha yüksek aktiviteye sahip olması, biyoteknolojik uygulamalar için potansiyelini vurgulamaktadır. Gele-

cekteki genomik ve proteomik analizler, bu yüksek enzimatik aktivitenin altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarabilir ve bunun bir sonucu olarak endüstriyel kullanılmalarının önünü açabilir.

Çıkar Çatışması

Yazar bu makaleyle ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını bildirir.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yazar bu çalışmanın araştırma ve yayın etiğine uygun olduğunu beyan eder.

Kaynaklar

- [1] Hungate, R.E., (1966). The Rumen and Its Microbes. Academic Press, London, 28-31s.
- [2] Kutlu, H. R., Gorgulu, M., Celik, L. B. (2005). General animal feeding. Lecture notes. Cukurova University Faculty of Agriculture Department of Animal Science Department of Feed and Animal Nutrition, Adana.
- [3] Frape, D. (2010). Equine nutrition and feeding. John Wiley & Sons.
- [4] Van Weyenberg, S., Sales, J., Janssens, G. P. J. (2006). Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. *Livestock science*, 99(1), 3-12.
- [5] Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Mcallister, T. (2014). Anaerobic Fungi (Phylum Neocallimastigomycota): Advances in Understanding Their Taxonomy, Life Cycle, Ecology, Role and Biotechnological Potential. *FEMS microbiology ecology*, 90(1), 1-17.
- [6] Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., and O'Malley, M. A. (2014). Anaerobic Gut Fungi: Advances in isolation, Culture and Cellulolytic Enzyme Discovery for Biofuel production. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1471-1482.
- [7] Yazdıç, F. C., Yazdıç, F., Kar, B., Özköse, E., Ekinçi, M. S. (2021). Anaerobik funguslarda hidrojenozomlar: Hidrojen üreten organeller. *Mantar Dergisi*, 12(2), 190-208.
- [8] Julliand, V., De Vaux, A., Villard, L., Richard, Y. (1996). Preliminary studies on the bacterial flora of faeces taken from foals, from birth to twelve weeks. Effect of the oral administration of a commercial colostrum replacer. *Pferdeheilkunde*, 12, 209e212.
- [9] Edwards, J. E., Forster, R. J., Callaghan, T. M., Dollhofer, V., Dagar, S. S., Cheng, Y., ... & Smidt, H. (2017). PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities. *Frontiers in microbiology*, 8, 1657.
- [10] Hanafy, R.A., Johnson, B., Elshahed, M.S., Youssef, N.H., (2018). *Anaeromyces contortus*, sp. nov., a new anaerobic gut fungal species (Neocallimastigomycota) isolated from the feces of cow and goat. *Mycologia*, 110(3), 502-512.

- [11] Joshi, A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Griffith, G.W., Dagar, S.S., (2018). *Liebetanzomycespolymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from the rumen of a goat. *MycKeys*, (40),89.
- [12] Karaman, A., Yücel, H., Ekinçi, K., Cömertpay, S. (2022). Comparing Cellulotic Enzyme Activities of *Neocallimastix* sp. in Orpin's and Menke's Media. *Mantar Dergisi*, 13(1), 55-61.
- [13] Li, J., Heath, I., Bauchop, T. (1990). *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. *Botany*, 68, 1021-1033.
- [14] Breton, A., Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L., Prensier, G. (1991). *Piromyces rhizinflata* nov. sp., a strictly anaerobic fungus from faeces of the Saharian ass: a morphological, metabolic and ultrastructural study. *FEMS microbiology letters*, 66 1, 1-8.
- [15] Gaillard-Martinie, B., Breton, A., Dusser, M., 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.
- [16] Chen, Y. C., Hseu, R. S., Chien, C. Y. (2002). *Piromyces polycephalus* (Neocallimastigaceae), a new rumen fungus. *Nova Hedwigia*, 75(3-4), 409-414.
- [17] Yücel, H., Ekinçi, K., Karaman, A., (2022). The effect of carbohydrate active enzyme (cazymes) in *Pyromyces* sp and *Anaeromyces* sp in the digestion channel of ruminants. 8th International mardin artuklu scientific researches conference (pp.1030-1038). Mardin, Turkey
- [18] Liggenstoffer, A.S., Youssef, N.H., Couger, M.B., Elshahed, M.S., (2010). Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. *The ISME journal*, 4(10), 1225-1235.
- [19] Orpin, C.G., (1976). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2), 270-280.
- [20] Theodorou, M.K., Davies, D.R., Jordan, M.G., Trinci, A.P., Orpin, C.G., (1993). Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological research*, 97(10), 1245-1252.
- [21] Çömlekçioğlu, U., Akyol, İ., Kar, B., Özköse, E., vd. (2008). Anaerobik Rumen Funguslarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Kültür Koleksiyonunun Oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49(2).
- [22] Bhagat, N. R., Kumar, S., Kumari, R., Bharti, V. K. (2023). A review on rumen anaerobic fungi: current understanding on carbohydrate fermentation and roughages digestion in ruminants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59(3), 231-249.
- [23] Mura, E., Fliegerová, K., Kopečný, J., et al. (2012). Diversity of Anaerobic Fungi Population (Phylum Neocallimastigomycota) in the Horse Hindgut. Università degli Studi di Sassari.

- [24] Kar, B. (2013), Anaerobik Rumen Funguslarının Filogenetik Analizi ve Lipit Metabolizmasındaki Rollerinin İncelenmesi (Doktora Tezi), KSÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni ABD, Kahramanmaraş
- [25] Edgar RC. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1792–1797.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28(10):2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121. Epub May 4. PMID: 21546353; PMCID: PMC3203626.
- [27] Çömlekcioğlu, U., Yazdıç, F. C., Keser, S., Kelleçidoğru, B. M., Battaloğlu, G., Özköse, E. (2012). Effects of carbon sources on enzyme production of *Neocallimastix* sp. and *Orpinomyces* sp.
- [28] Kar, B., Torcan, B. (2023). Isolation, morphological identification, and xylanase characteristics of anaerobic gut fungi *Neocallimastix* from Anatolian wild goat. *Journal of Basic Microbiology*, 63(3-4), 377-388.
- [29] Miller GL. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem.*, 31, 426–8.
- [30] Zhao, Y., Ren, X., Wu, H., Hu, H., Cheng, C., Du, M., ... & Dugarjaviin, M. (2023). Diversity and functional prediction of fungal communities in different segments of mongolian horse gastrointestinal tracts. *BMC microbiology*, 23(1), 253.
- [31] Edwards, J. E., Schennink, A., Burden, F., Long, S., van Doorn, D. A., Pellikaan, W. F., ... & Smidt, H. (2020). Domesticated equine species and their derived hybrids differ in their fecal microbiota. *Animal Microbiome*, 2, 1-13.
- [32] Beste, K. J., Lawhon, S. D., Chamoun-Emanuelli, A. M., Duff, A. H., Coleman, M. C., Griffin, C. E., ... & Whitfield-Cargile, C. M. (2020). Culture-independent and dependent evaluation of the equine paranasal sinus microbiota in health and disease. *Equine veterinary journal*, 52(3), 455-463.
- [33] Jullian V, Riondet C, de Vaux A, Alcaraz G, Fonty G. (1998). Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. *Anim Feed Sci Technol*, 70(1–2), 161–8.
- [34] Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., 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(9), 2815-2824.

- [35] Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., Griffith, G. W. (2015). *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys*, 9, 11-28.
- [36] Chang, J., & Park, H. (2020). Nucleotide and protein researches on anaerobic fungi during four decades. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(2), 121.
- [37] Mura E, Edwards J, Kittelmann S, Kaerger K, Voigt K, Mrázek J, et al.(2019). Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. *Fungal Biol*, 123(3), 240–6.
- [38] Wunderlich, G., Bull, M., Ross, T., Rose, M., Chapman, B. (2023). Understanding the microbial fibre degrading communities & processes in the equine gut. *Animal Microbiome*, 5(1), 3.
- [39] Hess M, Paul SS, Puniya AK, van der Giezen M, Shaw C, Edwards JE, et al. (2020). Anaerobic fungi: past, present, and future. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584893>.
- [40] Haitjema CH, Gilmore SP, Henske JK, Solomon KV, de Groot R, Kuo A, et al. (2017). A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nat Microbiol*; 2(8), 1–8.
- [41] Lewis, T., Stone, W. L. (2020). Biochemistry, proteins enzymes.
- [42] Teunissen MJ, de Kort GV, Op den Camp HJ, Huis in 't Veld JH.(1992). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. *J Gen Microbiol*. Aug;138 Pt 8:1657-64. doi: 10.1099/00221287-138-8-1657. PMID: 1527505.
- [43] Yazdıç, F. C., Yazdıç, F., Kar, B., Özköse, E., Ekinci, M. S. (2021). Anaerobik funguslarda hidrojenozomlar: Hidrojen üreten organeller. *Mantar Dergisi*, 12(2), 190-208.
- [44] Wei, Y. Q., Yang, H. J., Long, R. J., Wang, Z. Y., Cao, B. B., Ren, Q. C., Wu, T. T. (2017). Characterization of natural co-cultures of *Piromyces* with *Methanobrevibacter ruminantium* from yaks grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau: a microbial consortium with high potential in plant biomass degradation. *AMB Express*, 7, 1-12.
- [45] Saye, L. M., Navaratna, T. A., Chong, J. P., O'Malley, M. A., Theodorou, M. K., Reilly, M. (2021). The anaerobic fungi: challenges and opportunities for industrial lignocellulosic biofuel production. *Microorganisms*, 9(4), 694.
- [46] Mountfort, D. O., Asher, R. A. (1985). Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1314-1322.
- [47] Matsui, H., Ban-Tokuda, T. (2008). Studies on carboxymethyl cellulase and xylanase activities of anaerobic fungal isolate CR4 from the bovine rumen. *Current microbiology*, 57, 615-619.
- [48] Vörös, A. (2008). Diet related changes in the gastrointestinal microbiota of horses.

- [49] Edwards, J. E. (2019). Equine anaerobic fungi: key taxa of central importance to dietary fibre degradation. In *Small Things: European Equine Health & Nutrition Congress* (pp. 23-31).
- [50] Tsai, C. F., Qiu, X., Liu, J. H. (2003). A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Piromyces rhizinflata*. *Anaerobe*, 9(3), 131-140.
- [51] Liu, J. H., Tsai, C. F., Liu, J. W., Cheng, K. J., Cheng, C. L. (2001). The catalytic domain of a *Piromyces rhizinflata* cellulase expressed in *Escherichia coli* was stabilized by the linker peptide of the enzyme. *Enzyme and microbial technology*, 28(7-8), 582-589.
- [52] Yazdıç, F. C. Anaerobik fungus *Orpinomyces* sp. ye ait selülaz geninin klonlanması, karakterizasyonu ve enzim aktivitesinin belirlenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).