T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MANDALARDA ÇEKİRDEK FEKAL MİKROBİYOTANIN METAGENOMİK ANALİZLER İLE ARAŞTIRILMASI

Ayşe Ilgın KEKEÇ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serkan İKİZ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Kasım, 2022

Bu tez çalışmamı sevgili anne ve babama ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

MANDALARDA ÇEKİRDEK FEKAL MİKROBİYOTANIN METAGENOMİK ANALİZLER ile ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 32577

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimleriyle bizlere her zaman yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Seyyal AK'a,

Doktora hayatım boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, çalışmamda bana destek sağlayan danışman hocam Sayın Serkan İKİZ'e ve ikinci danışmanım Sayın K. Serdar DİKER'e,

Çalışmalarım boyunca, pek çok konuda benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen Sn. Prof. Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e, Sn. Doç. Dr. Kemal METİNER'e, her zaman için deneyimleriyle ve güler yüzleriyle bana yol gösteren Sn. Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a ve Sn. Doç. Dr. Belgi DİREN SIĞIRCI'ya, tez çalışmam boyunca sabrı ve desteği ile yanımda olan Sn. Dr. Baran ÇELİK'e, doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca anlayışıyla, yardımlarıyla ve özverisiyle bana hep destek olan çalışma ve yol arkadaşım Sn. Araş. Gör. Barış HALAÇ'a, yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen teknisyenimiz Sn. Gülten KARAKUZ'a,

Örnek toplamamda yardımlarını esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Ömür KOÇAK'a, analizlerimde bilgi ve tecrübesiyle sorularımı sıkılmadan yanıtlayan Araş. Gör. Tuğba YÜKSEL DOLGUN'a, Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a çok teşekkür ederim.

En başından beri, desteklerini benden esirgemeyen aileme, sevgili annem Sibel KEKEÇ'e, sevgili babam Cahit KEKEÇ'e, yol arkadaşlarım Dr. Nisa SİPAHİ'ye, Vet. Hek. Begüm MAŞLAK'a ve Bilim uzmanı Nilüfer ERZAİM'e çok teşekkür ederim.

Maddi desteği için TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na teşekkür ederim.

Kasım 2022 Ayşe Ilgın KEKEÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **ix**
ÖZET ..... **x**
ABSTRACT ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. Mikrobiyota ve Mikrobiyom 3
2.1.1. Tanımı ve Önemi 3
2.1.2. Mikrobiyotanın İşlevi 4
2.1.3. Mikrobiyota Kolonizasyonunu Etkileyen Faktörler 5
2.1.4. Hayvanlarda Mikrobiyota 5
2.2. Mandacılık ve Türkiye'de Manda Yetiştiriciliği 10
2.3. Mikrobiyotanın Saptanması 12
3. GEREÇ ve YÖNTEM **15**
1.1. Gereç 15
1.1.1. Örnekler 15
1.1.2. DNA Ekstraksiyonu 19
1.1.3. Kütüphane Oluşturulması 19
1.1.4. Dizileme Analizi 22
1.1.5. Biyoinformatik Analizler 22
1.1.6. Kullanılan Diğer Gereçler 23
1.2. Yöntem 23
1.2.1. DNA Ekstraksiyonu 23
1.2.2. Kütüphane Oluşturulması 29

1.2.3. Dizileme Analizi 33
1.2.4. Biyoinformatik Analizler 34
4. BULGULAR 35
5. TARTIŞMA 52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 63
EKLER 76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 4.1: Gruplara göre OTU sayıları ve taksonomik dağılımları. 35

Şekil 4.2: Gruplara göre OTU sayılarının taksonomik dağılımlarının yüzde oranları. 36

Şekil 4.3: Tespit edilen şubelerin gruplara göre yüzde dağılımı ve ortalama yüzdesi. 37

Şekil 4.4: Grupların şube seviyesinde 'Firmicutes/Bacteroidetes' faktörlerine göre analizleri. 40

Şekil 4.5: Tespit edilen ailelerin gruplara göre yüzde dağılımları ve ortalamaları. 43

Şekil 4.6: Tespit edilen cinslerin gruplara göre yüzde dağılımları. 44

Şekil 4.7: Shannon çeşitlilik indeksine göre örnekler ve sağlık durumları. 46

Şekil 4.8: Chao çeşitlilik indeksine göre örnekler ve sağlık durumları. 46

Şekil 4.9: Beta çeşitliliği, Bray-Curtis, 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği. .. 47

Şekil 4.10: Beta çeşitliliği, Bray-Curtis, 3 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği. 47

Şekil 4.11: Örneklerin 2 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği. 50

Şekil 4.12: Örneklerin 3 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği. 50

Şekil 4.13: Örneklere ait kladogram grafiği. 51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1:Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait ırk, cinsiyet ve yaş bilgileri.....15

Tablo 3.2: Barkod primerlerinin listesi.....20

Tablo 3.3: Anadolu malaklarının yaşa ve beslenme durumlarına göre gruplandırılması.....26

Tablo 3.4: İtalyan Akdeniz malaklarının yaş ve beslenme durumlarına göre grupladırılması. 27

Tablo 3.5: Anadolu mandalarının yaş ve cinsiyetlerine göre gruplandırılması.....28

Tablo 3.6: İtalyan Akdeniz mandalarının cinsiyet, yaş ve gebelik durumlarına göre gruplandırılması.....29

Tablo 3.7: Evrensel Kuyruklu Primerler. 30

Tablo 3.8: Oluşturulan gruplar ve aldıkları barkod numaraları.....31

Tablo 4.1: Anadolu manda ve malak gruplarına ait Firmicutes/Bacteroidetes oranları.....38

Tablo 4.2: İtalyan manda ve malaklarına ait Firmicutes/Bacteroidetes oranları.....39

Tablo 4.3: Anadolu malak ve mandalarında görülen Proteobacteria oranları.....41

Tablo 4.4: İtalyan Akdeniz malak ve mandalarında görülen Proteobacteria oranları. 42

Tablo 4.5: Süt kalitesinde etkili olduğu düşünülen cinslerin bulunma oranı. 44

Tablo 4.6: Gruplarda görülen baskın şube, aile ve cinsler. 45

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
♀	: Dişi
♂	: Erkek
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BMI	: Body Mass Index
bp	: Basepair (bazçifti)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GI	: Gastrointestinal
IPARD	: Instrument for Pre-Accesion Assistance Rural Development
IBD	: Infectious Bowel Disease
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MB	:Megabyte
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
OTU	: Operational Taxonomic Unit (Operasyonel Taksonomik Ünite)
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PCA	: Priciple Component Analyse
PCoA	: Principle Coordinate Analyse
RFI	: Residual Feed Intake (Artık Yem Alımı)
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TKDK	: Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu
YND	: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MANDALARDA ÇEKİRDEK FEKAL MİKROBİYOTANIN METAGENOMİK ANALİZLER İLE ARAŞTIRILMASI

Ayşe Ilgın KEKEÇ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. Serkan İKİZ

II. Danışman : Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de yetiştirilen farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki mandaların fekal mikrobiyotalarına metagenomik analizler kullanılarak ışık tutulması amaçlandı.

Bu amaçla, İstanbul ve Kırklareli'nde bulunan 4 çiftlikten 48'i malaklardan, 48'i mandalardan olmak üzere toplam 96 dışkı örneği toplandı. Malakların ve mandaların 24'ü İtalyan Akdeniz ırkı, 24'ü Anadolu ırkı olarak seçildi. 24 Anadolu ve 24 İtalyan Akdeniz ırkı mandalarının 12'si erkek ve 12'si dişi olarak seçildi. Örnekler uygun koşullarda laboratuvara iletildikten sonra, örneklerden DNA ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyonlardan, yaş ve cinsiyete göre 4'erli 24 havuz oluşturuldu. Havuzlanan örneklerin, Oxford Nanopore MinION ile dizileme işlemleri yapıldı. Ardından biyoinformatik analizleri geçekleştirildi.

Toplamda 180 MB veri elde edildi. Elde edilen verilere göre toplamda 489 operasyonel taksonomik birim (Operational Taxonomic Unit/ OTU) tespit edildi. Gruplara göre OTU dağılımına bakıldığında en yüksek OTU sayısı 3 aydan küçük Anadolu malakları grubunda yer alan 1.grupta 275 olarak tespit edildi. En düşük OTU sayısı ise İtalyan Akdeniz ırkına ait 2 yaşından büyük gebe dişilerde 167 olarak gözlendi. Gruplar şube bazında incelendiğinde tüm gruplarda baskın şube olan Firmicutes (%68,3)'i, Bacteriodetes (%29,4) ve Proteobacteria (%1,8) olduğu gözlemlendi. Firmicutes/Bacteriodetes oranları incelendiğinde, Anadolu malakları arasından 3 aydan büyük olanların en yüksek orana (2,99) sahip olduğu saptandı. İtalyan Akdeniz ırkına ait 3 aydan büyük malaklarda ise en düşük oran (1,57) saptandı. Proteobacteria oranı ise 2 yaşından büyük dişi Anadolu mandalarında %9,27 ile dikkate değer

oranda saptandı. Örnek grupları aile düzeyinde incelendiğinde Ruminoccaceae (%47,8) ailesi tüm gruplarda baskın aile olarak bulundu. Cins düzeyinde incelendiğinde ise *Ruminnococcus* (%39,6) cinsi bir grup dışında baskın cins olarak bulundu. Süt ve yem ile beslenen 3 aylıktan küçük malaklarda baskın cins *Lactobacillus* (%20,4) cinsi olarak saptandı.

Sonuç olarak, elde edilen bu verilerle Türkiye'de yetiştirilen her iki ırka ait mandalarda mikrobiyal kolonizasyon verileri elde edilmiştir. Bu konu hakkındaki literatür eksiğine katkı sağlanmakla birlikte farklı çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32577

Bu tez, TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Kasım 2022 , 112 sayfa.

Anahtar kelimeler: Manda, Mikrobiyota, Üçüncü nesil dizileme, Yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Metagenomic Investigation of Core Fecal Microbiota in Water Buffaloes

Ayse Ilgin KEKEC

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Microbiology

Microbiology Programme

Supervisor : Prof. Dr. Serkan İKİZ

Co-Supervisor: Prof. Dr. K. Serdar DİKER

This study was aimed to investigate the fecal microbiota of buffaloes of different races, ages, and genders reared in Turkey by using metagenomic analysis.

For this purpose, a total of 96 stool samples, 48 from buffalo calves and 48 from buffaloes, were collected from 4 farms in Istanbul and Kırklareli. Twenty-four of the buffalo calves and buffaloes were selected as Italian Mediterranean race and 24 as Anatolian race. Twenty-four buffaloes of each of Anatolian and Italian Mediterranean breeds were selected as 12 males and 12 females. After the samples were transfered to the laboratory under appropriate conditions, DNA extractions were made from the samples. The samples were poolled consisting of four samples each of them and it was total 24. From the extractions, 24 pools of 4 were created according to age and gender. The pooled samples were sequencing with Oxford Nanopore MinION. Then bioinformatics analyses were performed.

In total, 180 mb of data was obtained. According to the data obtained, a total of 489 operational taxonomic units (OTUs) were detected. Considering the OTU distribution according to the groups, the highest number of OTUs was found to be 275 in the 1st group in the Anatolian buffalo calfs group younger than 3 months. The lowest number of OTUs was observed as 167 in pregnant females older than 2 years of Italian Mediterranean breed. When the groups were examined on a phylum basis, it was observed that Firmicutes (68.3%), Bacteriodetes (29.4%) and Proteobacteria (1.8%) were the dominant phylum in all groups. When the Firmicutes/Bacteriodetes ratios were examined, it was determined that the Anatolian buffalo calfs older than 3 months had the highest rate (2.99%). The lowest rate (1.57%) was found in

buffalo calfs older than 3 months of Italian Mediterranean breed. The rate of Proteobacteria was found to be a remarkable 9.27% in female Anatolian buffaloes older than 2 years of age. When the sample groups were examined at the family level, Ruminoccaceae (47.8%) family was found to be the dominant family in all groups. When examined at the genus level, *Ruminnococcus* (39.6%) was found to be the dominant genus except for one group. *Lactobacillus* (20.4%) was the dominant genus in buffalo calfs younger than 3 months old fed with milk and feed.

As a result, microbial colonization data were obtained in buffaloes of both breeds reared in Turkey with these data. While contributing to the lack of literature on this subject, it should be supported by different studies.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32577

This thesis was supported by TUBITAK 2211 Domestic Graduate Scholarship Program.

November 2022, 112 pages.

Keywords: Buffalo, Microbiota, Next generation sequencing, Third generation sequencing

1. GİRİŞ

Çok uzun yıllardır mikroflora olarak bilinen, belirli bir ortamda yaşayan tüm mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılan terim, son yıllarda mikrobiyota olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların genetik materyallerinin tümüne ise mikrobiyom adı verilmektedir. Mikrobiyota, virüs, bakteri, mantar ve protozoaları içeren kalabalık nüfuslu bir ortamdır ki, bu mikroorganizmalar vücudun tüm hücrelerinden kat kat fazla sayıdadır. Bu mikroorganizmalar genellikle hastalıklara neden olmalarıyla bilinmelerine karşın bireyin vücudunda özellikle mukozal yüzeylerde kolonize olup infeksiyonların vücuda girmesine engel bir bariyer görevi yapmaktadırlar. Bu nedenle mikrobiyotayı oluşturan bakteriler; özellikle bağırsak mikrobiyotası, hastalıklarla ve hastalıkların patogeneziyle, başta immun sistem olmak üzere birçok metabolik ve fizyolojik olayla, hayvanlarda yemden yararlanma ve verim özellikleriyle ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle ikinci beyin olarak da anılmaktadır. Mikrobiyotanın kolonizasyonu, bireysel ve çevreseller koşullardan etkilenmekte ve bireysel farklılıklara yol açmaktadır. Mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların ortaya konması ile hem bireysel farklılıkların ortaya çıkarılması hem de yukarıda bahsedilen hastalık ve sağlık ilişkisine ışık tutulabilmektedir.

Mikrobiyota, en başlarda kültürel yöntemlerle ortaya konmaya çalışılsa da bu yöntem mikrobiyotada yer alan aerob ve anaerob olarak yaşayan milyonlarca bakterinin hepsinin izole ve identifiye edilmesini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle kültür temelli olmayan metagenomik yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Metagenomik yöntemler DNA'yı oluşturan ve önemli kalıtımsal verileri içeren nükleotidlerin diziliminin belirlenmesi esasına dayanmakta olup dizileme olarak adlandırılmaktadır. Frederick Sangerin ortaya koyduğu Sanger yöntemi ile beraber dizileme yöntemleri yaygınlaşmış ve çalışmalar artıkça geliştirilmeye devam edilmiştir. Kullanıldığı dönemlerde, bu yöntemin uzun sürmesi, maliyetli olması gibi dezavantajlarından dolayı yeni tekniklere ihtiyaç duyulmuş, yeni nesil dizileme (YND) yöntemleri olarak adlandırılan ikinci ve üçüncü nesil dizileme yöntemleri ortaya konmuştur. Üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden biri olan ve sıklıkla kullanılan Oxford Nanopore, kısa sürede çok uzun okumalar yapabildiği için ikinci nesil yöntemlere göre tercih sebebi olmaktadır. Bu yöntem sayesinde kısa sürede az iş gücüyle çok daha verimli sonuçlar elde edilmektedir.

En başta İnsan Genom Projesiyle başlayan mikrobiyom çalışmaları, daha sonraları veteriner hekimlik alanında da yaygınlaşmış, hastalık-sağlık ilişkisini ortaya koymanın yanı sıra daha verimli döller elde etmek ve et, süt, yumurta, yapağı gibi ürünleri kullanılan hayvanların ürün kalitesini artırılabilmesi amacına da hizmet etmeye başlamıştır. Bu yönüyle, insanlar için gıda maddesi olarak tüketilen hayvansal ürünlerin kalitesi ortaya konarak toplumsal sağlığa da katkı sağlamaktadır. Tüm bunların dışında mikrobiyota transplantasyonu ile insan ve hayvanlarda hastalıkların kontrolü ve sağaltımı yapılabilmekte bu sayede antibiyotik kullanımının sınırlandırılabileceği öngörülmektedir. Bu da günümüzde küresel bir sorun halini alan antibiyotik direncine de alternatif bir çare olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar sığırlarda rumen, gastrointestinal sistem ve süt, tavuklarda gastrointestinal sistem, mandalarda ise rumen ve süt mikrobiyotası üzerine odaklanmış, ancak fekal mikrobiyota ile ilgili çalışmalar sınırlı kalmıştır. Ülkemizde tavuk, inek, koyun, keçi ve manda, ürünlerinden yararlanmak amacıyla yetiştiriciliği yapılan hayvanlardır. Mandalar, yetiştiriciliğinin kolay ve daha az masraflı olması, sütü ve etinin sığırlara göre daha yüksek kalitede olması nedeniyle insanlar için iyi bir alternatiftir.

Bu tez çalışmasında, hastalıklara oldukça dirençli, kötü ortam koşullarına bile rahatlıkla adapte olabilen Anadolu mandaları ile verim özellikleri yüksek İtalyan Akdeniz ırkı mandaların ikinci beyin olarak tabir edilen bağırsak mikrobiyotalarını ve ırk, cinsiyet, yaş, gebelik ve yem tüketimine göre olası farklılıklarını, üçüncü nesil dizileme yöntemi olarak bilinen Oxford Nanopore metodu kullanılarak ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca bu alandaki literatür eksikliğine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Mikrobiyota ve Mikrobiyom

2.1.1. Tanımı ve Önemi

Bakteriler genel olarak çeşitli hastalıklara neden olan patojenler olarak bilinmelerine rağmen, bazıları hayvan ve insan vücudu için yararlıdır ve vücuttaki sistemlerde kolonize olmuşlardır (Lee ve Mazmanian, 2010). Bu bakteriler sıklıkla flora bakterileri olarak anılsa da günümüzde mikroflora kavramı yerini, bir ekosistemde yaşayan organizmaları tanımlayan mikrobiyota terimine bırakmaya başlamıştır (Bleich ve Fox, 2015; Diker, 2017). Nobel ödüllü Dr. Joshua Lederberg isimli genetikçi mikrobiyom terimini ilk kez insan vücudunda bulunan ortak, simbiyotik ve belki de patojenik mikroorganizmaların ekolojik sistemini tanımlamak için kullanmıştır. Lederberg, mikrobiyom terimini her ne kadar insan ekosistemini oluşturan mikroorganizma topluluğunu belirtmek için kullanmış olsa da mikrobiyomun sadece insanlarda var olmadığı, hayvanlarda hatta bitkilerde de bulunduğunu belirtmiştir. Günümüzde ise, mikrobiyom terimi, mikrobiyota olarak adlandırılan ve vücudun çeşitli yerlerinde bulunan mikroorganizma topluluklarının genetik materyallerini belirtmek için kullanılmaktadır (Liu, 2016).

Mikrobiyota ve mikrobiyom teriminin kullanımı, 2007 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından başlatılan "İnsan Mikrobiyom Projesi" sayesinde yaygınlaşmaya başlamıştır. İnsan Mikrobiyom Projesi, insan vücudunda, insan genomundaki genler dışında vücudun çeşitli sistemlerinde oldukça yaygın olarak bulunan diğer mikroorganizmaların genomundaki genlerin evrimine, çeşitliliğine ve dağılımına ışık tutmayı amaçlamıştır. ABD'de başlatılan bu projeye sonrasında Avrupa ve Asya da dâhil olarak disiplinler arası bir projeye dönüşmüş, konunun aydınlatılmasının taşıdığı önem tekrar vurgulanmıştır. Bu projeler kapsamında, mikrobiyota ve mikrobiyomun gizeminin çözülmesi için yapılan çalışmalar insanlara yönelik olarak başlanmış, daha sonra veteriner hekimlikte de ivme kazanmıştır (Turnbaugh ve diğ., 2007; Altuntaş ve Batman, 2017; Diker, 2017; https://hmpdacc.org/hmp/ Son erişim Tarihi: 02.03.2022;).

Veteriner hekimlikte yürütülen çalışmalar genellikle kanatlı hayvanlarda gastrointestinal mikrobiyotaya, ruminantlarda ise rumen ve süt mikrobiyotasına odaklanmış gibi gözükse de son yıllarda farklı konularda da çalışmalara devam edilmektedir.

2.1.2. Mikrobiyotanın İşlevi

Mikrobiyotayı oluşturan bakterilerin sayısı vücuttaki tüm hücrelerden çok daha fazla olup sindirim sistemi, solunum sistemi, ürogenital sistem gibi vücudun mukozal yüzeylerinde ve deride kolonize olarak bulunmaktadır (Tlaskalová-Hogenová ve diğ., 2004; Luczynski ve diğ., 2016). Bu gibi çeşitli sistemlere yayılmış olmaları gastrik ülserler, egzema, astım, ağız ve diş hastalıkları, kalp ve damar hastalıkları hatta kanserler ile yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir (Bleich ve Fox, 2015; Liu, 2016). Özellikle bağırsak mikrobiyotası bağışıklık sistemini düzenleyerek, diğer birçok fizyolojik ve metabolik olayın da gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır. Bu özelliği ile birçok hastalığın patogenezinde rol alarak hastalık-sağlık ilişkisinde yol gösterici niteliktedir (Diker, 2017). Vücutta bu denli etkisi olan bağırsak mikrobiyotası günümüzde ikinci beyin olarak da adlandırılmakta ve vücut için ne kadar önemli olduğuna dikkat çekilmektedir. Belirtildiği gibi, immunregülasyonun sağlanmasında, fizyolojik ve metabolik olaylarda önemli görevleri olduğundan mikrobiyal dengenin bozulması yani mikrobiyal disbiyozis durumlarında insanlarda diyabet, obezite, metabolik sendrom gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Guarner ve Malagelada, 2003). Buna ek olarak stres koşulları ve infeksiyon, antibiyotik kullanımı gibi etmenler de disbiyozise yol açabilmektedir (Modi ve diğ., 2014). Özellikle mikrobiyotayı domine eden üyelerden iki şube olan Firmicutes ve Bacteroidetes oranının özellikle obezitenin belirleyicisi olduğu kabul edilmektedir. Firmicutesler yiyeceklerden enerji elde etmede Bacteroidetes'ten daha etkili olduğu ve böylece daha verimli bir kalori emilimini ve ardından kilo alımını teşvik ettiği öne sürülmüş, obez bireylerde Firmicutes oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Krajmalnik-Brown ve diğ., 2012). Bu nedenle Firmicutes/Bacteriodetes oranı obezite, tip2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (Magne ve diğ., 2020; Stojanov ve diğ., 2020). Bu iki şubeyi takip eden Proteobacteria şubesi sağlıklı bağırsak mikrobiyotasında düşük oranda bulunurken, sayısının artışının insanlarda başta inflamatuar bağırsak hastalıkları olmak üzere, disbiyozis ve infeksiyonla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Shin ve diğ., 2015).

Mikrobiyota transplantasyonu (Gupta ve diğ., 2015), probiyotik ve prebiyotiklerin kullanımları gibi tedavi kürleri ile bağırsakta mikrobiyom disbiyozunun düzeltilebildiği bildirilmiştir. Bu durum infeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımına bir seçenek olarak

düşünülmekte ve günümüzde bütün dünyada ciddi bir sağlık problemi olan antibiyotik direnci ile baş etme yollarından biri olarak ümit vermektedir (Garmendia ve diğ., 2012; Altuntaş ve Batman, 2017; Amon ve Sanderson, 2017).

2.1.3. Mikrobiyota Kolonizasyonunu Etkileyen Faktörler

Doğumdan hemen sonra oluşmaya başlayan ve iki yıl boyunca devam eden gastrointestinal mikrobiyal kolonizasyon, hem pre-natal hem de post-natal olarak çeşitli faktörlerden etkilenmekte olup her birey için farklıdır. Bu farklılık o kadar spesifiktir ki neredeyse parmak izi kadar bireye özeldir. Gastrointestinal mikrobiyotanın oluşmasındaki faktörler bireye bağlı olduğu gibi çevresel bağlı olabilmektedir. Bireye ait faktörler tür, ırk, yaş, cinsiyet iken, doğum şekli, beslenme şekli ve diyet, yaşam koşulları, stres, coğrafi şartlar, doğum öncesi ve sonrası antibiyotiğe maruziyet ise çevresel faktörleri oluşturmaktadır (Fouhy ve diğ., 2012; Bleich ve Fox, 2015; Altuntaş ve Batman, 2017).

2.1.4. Hayvanlarda Mikrobiyota

Mikrobiyotanın, insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da birçok hastalıkla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası tüm canlılarda metabolizmayı etkilediği gibi, hayvanlarda yemden yararlanma ve verim özelliklerine de büyük ölçüde etki etmektedir. Bu da çeşitli yönlerden verimlerinden yararlanılan hayvanların yetiştiriciliğinin yapılması açısından da mikrobiyotanın ortaya konmasını önemli kılmaktadır (Hashimoto-Hill ve Alenghat, 2021; Küllük ve Dalğın, 2021).

2.1.4.1. Kanatlılarda Gastrointestinal Mikrobiyota

Kümes hayvanları, dünya çapında çok yaygın olarak yetiştirilmekte olup et ve yumurtaları toplumların önemli protein kaynaklarındandır. Özellikle sürekli artan nüfusun hayvansal protein ihtiyacı da giderek artacağından yetiştiriciler kanatlı etini en verimli şekilde üretmeyi hedeflemektedirler (Yadav ve Jha, 2019). Kanatlılar, diğer hayvanlara göre çok daha fazla enerji harcamaktadırlar. Sindirim sistemleri ise, yedikleri yemlerden bu enerjiyi sağlamaya adapte olmuştur. Gastrointestinal sistemlerindeki mikrobiyal kolonizasyon da yemden yararlanmada, enerji üretiminin sağlanmasında, biyokimyasal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir (Clench ve Mathias, 1995; Stanley ve diğ., 2014; Yadav ve Jha, 2019).

Tavuklar, dünya çapında en yaygın çiftlik hayvanlarından birini temsil etmektedir. Tavukların evcilleştirilmesi yaklaşık 5000 yıl önceye dayanmakta ve o zamandan beri tavuk

yumurtası ve eti insanlar için ortak bir hayvansal protein kaynağı haline gelmiştir (Rychlik, 2020).

Tavuklarda gastrointestinal mikrobiyotanın kolonizasyonu yumurtadan çıkma ile başlayıp çevresel etkenlerle birlikte şekillenmeye başlamaktadır. Her ne kadar maternal kökenli bakteri yoğunluğunun az olduğu belirtilse de bazı çalışmalar da ince bağırsak mikrobiyatasının iki haftada şekillendiği öne sürmektedir. Daha eski çalışmalar ise sekal mikrobiyanın oluşmasının daha uzun sürdüğünü belirtmektedir (Rehman ve diğ., 2007; Tang ve diğ., 2014; Deusch, 2015). Genel olarak gastrointestinal mikrobiyota kolonizasyonu yaş ilerledikçe çeşitlenmekte ve nispeten stabil hale gelmektedir (Yadav ve Jha, 2019). Gastrointestinal sistem mikrobiyotası kommensal ve patojenik mikroorganizmalardan oluşmaktadır ve bu kommensal bakteriler aminoasit, kısa zincirli yağ asitleri ve vitaminlerin sağlanmasına katkıda bulunarak konakçıya yarar sağlamaktadır (Deusch, 2015). Bu sayede beslenme ve diyet programlarının optimize edilerek verim ve et kalitesinin artırılması sağlanabilmektedir. GI sistemde bulunan mikrobiyotanın faydalarından biri de yarışmacı dışlama ile koruyucu bariyer görevi görmek, bağırsak mukozasının bütünlüğünü sağlayarak patojen mikroorganizmaların gastrointestinal sisteme yerleşmesine engel olmaktır. Aynı zamanda bağırsak epitellerindeki immun sistem hücrelerini stimüle ederek immun sistem regülasyonunun sağlanmasında da görev almaktadır (Shang ve diğ., 2018; Carrasco ve diğ., 2019).

Sindirim süreci, bağırsak mikrobiyotasıyla güçlü bir şekilde bağlantılı olduğundan besin emilimi, yem sindirilebilirliği, enerji üretimi, dolayısıyla üretkenlik ve verim, mikrobiyota bileşimi ve çeşitliliğinden büyük ölçüde etkilenmektedir. Mikrobiyal topluluk gastrointestinal sistemin çeşitli kısımlarında farklılıklar gösterse de tavuk bağırsağı mikrobiyotası, yüzlerce bakteriden oluşmaktadır ve Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Actinobacteria şubeleri tarafından domine edilmektedir. Bu şubelere ait, Bifidobacteriacea, Enterobactericae, Lachnospiraceae, Ruminoccocacea, Lactinobacillacea aileleri en yoğun olarak görülmektedir (Clavijo ve diğ., 2018; Carrasco ve diğ., 2019; Rychlik, 2020).

Kazlar da ülkemizde ve dünyada tüketilen kümes hayvanlarından biridir (Demir ve Kırmızıbayrak, 2013). Farklı ırk kazlarla yapılan bir çalışmada dominant şubenin Firmicutes olduğu belirtilirken, bunu takip eden şubelerin ırklara göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Wang, Lui ve diğ., 2018). Liu ve arkadaşlarının 2018 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada da bağırsağın farklı segmentlerinde baskın şubelerin değişkenlik gösterdiği ortaya konarak baskın

görülen şubelerin Firmicutes ve Proteobacteria olduğu, cins düzeyinde ise *Bacillus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Bacteroides* ve *Prevotella* cinslerinin görüldüğü raporlanmıştır. Ayrıca lifli besin tüketimi ile mikrobiyota kolonizasyonu arasında korelasyon olduğunun da üzerinde durulmuştur (Liu ve diğ. 2018).

Ördekler dünyanın birçok yerinde ve ülkemizde de bazı yörelerde yetiştiriciliği yapılan ve ürünleri tüketilen kümes hayvanlarındandır (Sarı ver diğ., 2012). Çin'de ördeklerde yapılan bir çalışmada Bacteroidetes, Firmicutes ve Fusobacteria baskın filum iken, Bacteroides, *Oscillospiraceae_uncultured*, Parabacteroides ve *Bacteroidales_norank* ilk 4 baskın cins olarak belirlenmiş ve bağırsak mikrobiyotasının yağ metabolizmasıyla olan bağıntısı ortaya konmuştur (Lyu ve diğ., 2021). Yine Çin'de farklı yetiştirme koşullarındaki ördeklerle yapılan başka bir çalışmada, yetiştirme koşullarının bağırsak mikrobiyotasıyla olan ilişkisi ortaya konmuştur. Çalışmaya göre altlık zeminde yetiştirilen ördeklerin bağırsaklarında Proteobaceria baskın şube iken plastik zeminde yetiştirilen ördeklerde Firmicutes şubesi baskın olarak bulundu (Wang, Chen ve diğ., 2018).

Hindiler, yaygın hayvansal protein kaynağıdır (Taylor ve diğ., 2020). Taylor ve arkadaşları (2020), hindiler ile yaptıkları çalışmada, hindilerin gastrointestinal mikrobiyotalarını incelemişler ve sekumda, baskın şube olarak, sırasıyla Clostridiales ve Bacteroideles takımlarıyla temsil edilen Firmicutes ve Bacteroidetes şubelerini bulmuşlar, en belirgin cinsi ise *Bacteroides* olarak belirlemişlerdir. Ancak kuluçka döneminde de *Lactobacillus*'un yaygın olduğunu belirtmişlerdir. İleumda ise baskın şube Firmicutes, baskın takım Clostridiales ve Lactobacillales ve en belirgin cins *Lactobacillus* olarak belirlendi. Ortaya koydukları bu kolonizasyonun sürü yönetimden ne şekilde etkilendiğini ve solunum yolu mikrobiyotası ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Ürün verimi üzerindeki yadsınamaz etkisini de vurgulamışlardır.

2.1.4.2. Ruminantlarda Süt Mikrobiyotası

Yakın zamana kadar sütün steril olduğu kabul edilse de yeni gelişen teknolojiler sayesinde, sütteki mikrobiyal yükün sadece infeksiyon etkenine ya da kontaminasyona bağlı olmadığı; çok çeşitli ve karmaşık bir mikroorganizma topluluğu içerdiği kanıtlanmıştır (Addis ve diğ., 2016). Anne sütü, yeni doğanlara yeterli besin sağlamanın yanında gastrointestinal sistemin mikrobiyal kolonizasyonunun oluşmasında da kritik bir rol üstlenmektedir (Oikonomou ve diğ., 2020). Bu açıdan hayvan sağlığındaki önemi ve süt üretiminin kalite ve

güvenliği ile korelasyonu nedeniyle süt mikrobiyotasının kökeni ve bileşimini anlamaya olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Addis ve diğ., 2016). Bu amaçla sütü tüketilen çeşitli hayvanlarda süt mikrobiyotasını ortaya koymaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İneklerde yapılan çalışmalarda, sırasıyla Firmicutes, Bacteriodetes, Actinobacteria ve Proteobacteria şubelerine ait cinslerin en baskın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Falentin ve diğ., 2016). Daha derinlemesine bakıldığında yüksek oranda laktik asit bakterileri görülmesinin yanında (Tilocca ve diğ., 2020) *Staphylococcus, Corynebacterum, Ruminococcus, Aerococcus, Bifidobacterium, Bacteriodes* ve *Prevotella* cinslerinin yer aldığı görülmüştür (Falentin ve diğ., 2016). Koyunlardan toplanan süt örnekleriyle yapılan başka bir çalışmada çekirdek süt mikrobiyotasının inek sütüyle benzer şube ve cinsleri içermesine rağmen çeşitlilik açısından farklılıklar gözlendiği belirtilirken aynı zamanda subklinik mastitli hayvanlardan alınan süt örneklerinde mikrobiyal kolonizasyonun sağlıklı sütlere göre farklılık gösterdiğini saptamışlardır (Esteban-Blanco ve diğ., 2020). Peynir üretiminde inek sütünden sonra gelen ve düşük alerjik özellik göstermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilen keçi sütünün mikrobiyotasının araştırıldığı çalışmalarda *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc* ve *Enterococcus* gibi laktik asit bakterilerinin (LAB) çok miktarda bulunduğu, onları da *Enterococcus* ve *Micrococcus* cinslerinin takip ettiği bildirilmiştir (Tilocca ve diğ., 2020).

İçerdiği çeşitli mikroorganizmalar ile belli bir dengede bulunan bu mikrobiyal yükün stres, infeksiyon gibi bazı etkiler nedeniyle bozulması patojenlerin infeksiyon oluşturmasına neden olarak sütünden de faydalanılan hayvanların süt kalitesini etkileyerek önemli ekonomik kayıplara neden olacağı gibi, sütten kesilmemiş yavruların da hem bağışıklığını destekleyen hem de barsak kolonizasyonuna katkı sağlayan kolostrumu faydasız hale getireceği açıktır (Kuehn ve diğ., 2013; Addis ve diğ., 2016).

2.1.4.3. Ruminantlarda Gastrointestinal Mikrobiyota

Sığırlarda Gastrointestinal Mikrobiyota

Dünya çapında evcilleştirilmiş hayvan türlerinin önemli bir kısmını et ve süt ürünlerinin kaynağı olarak kullanılan geviş getiren hayvanlar oluşturmaktadır. Ruminantlar, otobur oldukları için sindirim sistemleri de tükettikleri bitkileri besin kaynağına çevirme yeteneğine sahiptir. Sığır rumeni, sığırların sindirilemeyen bitki kütlesini gıda ürünlerine dönüştürme konusundaki olağanüstü yeteneğinden sorumlu olan karmaşık bir mikrobiyota

barındırmaktadır. Toplam rumen mikrobiyotasının yaklaşık %95'ini oluşturan *Prevotella brevis, Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens* ve *Ruminococcus albus* gibi fibrolitik bakteriler, bitki liflerinin, selülozun ve hemiselülozun fermente edilmesini sağlamakta, bu da bitki materyallerinin uçucu yağ asitleri ve bakteriyel proteinler gibi sindirilebilir bileşiklere dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır. Bunun yanı sıra rumen pH'sının düzenlenmesine de katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda, hayvanın yemden yararlanabilirliğinin ölçüsü olarak kabul edilen, bir hayvanın gerçek yem alımı ile bakım ve büyüme için beklenen yem gereksinimleri arasındaki fark olarak tanımlanan artık yem alımı (RFI) da rumendeki mikrobiyal kolonizasyondan etkilenmektedir. Bunlar da et ve süt kalitesi, bileşimi ve üretim verimleri üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir ki bu da hayvancılık ekonomisi ile de yakından ilişkilidir. Bu nedenledir ki, rumen mikrobiyotası, hayvanların sağlığı ve üretkenliği dolayısıyla da insanoğlu için esastır ve bu karmaşık mikrobiyal popülasyonların ve bunların etkileşimlerinin anlaşılması diyet stratejilerinin belirlenmesi açısında da büyük önem taşımaktadır (Flint ve diğ. 2008; Brulc ve diğ., 2009; Carberry ve diğ., 2012; Jami ve Mizrahi 2016; Zeineldin ve diğ., 2018).

Mandalarda Gastrointestinal Mikrobiyota

Süt ve et ürünleri ile ekonomiye göz ardı edilemeyecek katkıya sahip mandaların bağırsaklarında da diğer ruminantlarda olduğu gibi alınan gıdanın besinsel özelliklerinden yararlanmasını sağlayan çok sayıda simbiyotik bakteri kendine yaşam alanı bulmaktadır. Bu mikroorganizmalar yağın depolanmasını, vücuda alınan besinlerin kullanımını, intestinal epitellerin yenilenmesini ve immun sistemin gelişimini sağlamaktadır. Diğer yetiştirme hayvanlarında olduğu gibi mandaların da süt ve et kalitesi bağırsak mikrobiyotası kompozisyounndan etkilendiği için ürün kalitesi vasıtasıyla dolaylı olarak ekonomik etkilerinin de görülmesi muhtemeldir (Zhang ve diğ., 2017).

Mandalarda mikrobiyal sindirim retikulorumende başlayıp kolonda sona ermekte ve yemden yararlanmada dolayısıyla hayvandan elde edilen süt ve etin bileşimi üzerinde önemli etki göstermektedir (Bergmann ve diğ., 2015). Yapılan bazı çalışmalar intestinal mikrobiyota ile meme bezlerinin yakından ilişkili olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu da süt kalitesini ve besleyici değerini etkileyen bir faktördür (Zhang ve diğ., 2017; Oikonomou ve diğ., 2020).

Çin'de, manda rumen içerikleri ile yapılan çalışmada, farklı diyetlerle beslenen iki farklı manda ırkı kullanılmış ve mikrobiyal dağılımları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan rumen

içeriklerinde, baskın şube olarak Bacteroidetes (%47-72) bulunmuş, onu takiben Firmicutes, Fibrobacteres, Proteobacteria ve Spiroketler olduğu saptanmıştır. Cins düzeyinde ise *Prevotella* (%22-58) en baskın olarak bulunurken, ardından *Fibrobacter, Paludibacter* ve *Ruminococcus* cinslerinin geldiği gözlemlenmiştir. Farklı hayvanlarda farklı kompozisyonlar gözlense de şube ve cins düzeyinde ırk ya da diyete bağlı önemli bağlantıların görülmediği bildirilmiştir (Lin ve diğ., 2015)

Zhang ve arkadaşlarının (2017) Çin'de yaptıkları çalışmada mandaların intestinal mikrobiyotasında Firmicutes, Bacteriodetes, Tenericutes ve Proteobacteria şubeleri dominant şube olarak saptanmıştır. Baskın cins ise *Bacteriodes* ve sırasıyla, *Alistipes, Oscillibacter, Clostridium, Akkermansia* ve *Oscillospira* olarak bildirilmiştir. Saptanan şube ve cinsler sığırlarla benzerlik göstermesine rağmen sayısal olarak farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Bu konuyla ilgili literatürlerde hala eksiklikler olduğu göze çarpmaktadır.

2.2. Mandacılık ve Türkiye'de Manda Yetiştiriciliği

Yaklaşık 5000 yıl önce evcilleştirilmiş, Bovidae familyasına mensup olan mandalar, dünyada olduğu gibi Türkiye'de de büyükbaş yetiştiriciliğinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İlk başlarda yük hayvanı olarak gücünden yararlanılan mandaların, günümüzde de kaliteli süt ve süt ürünlerinden, derisinden, et veriminden hatta boynuzundan yararlanılmak üzere yetiştiriciliği yapılmaya devam etmektedir (Sarıözkan, 2011; Şahin, 2015). Hızla artan nüfus karşısında artan gıda gereksinimini karşılayabilmek açısından yetiştirilmesi hem ucuz hem kolay olan mandalar, kaliteli ürünleriyle hem üreticiler hem de tüketiciler tarafından tercih sebebi olmaktadır (Atasever ve Erdem, 2007). Özellikle, dünyada %15'lik payı ile süt üretiminde inekten (%81) sonra hayvancılıkta önemli bir yer tutmaktadır (Adkinson ve Konca, 2021).

Mandalar, sert mizaçlı olmalarına rağmen çevresel koşullara kolaylıkla adapte olabilen, çoğu infeksiyona karşı dirençli, kalitesiz yemlerden bile yararlanabilme yeteneğine sahip, genellikle su birikintilerinin kenarlarında yaşayan yarı-sucul (semi-aquatic) hayvanlardır (Sarıözkan, 2011; Pasha, 2013).

Yetmişin üzerinde farklı ırkı bulunan mandalar, Afrika yabani mandası (Syncerus) ve Asya mandası (Bubalus) olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Asya mandaları ise Yabani Asya Mandası ve Evcil Mandalar olarak ikiye ayrılırken, evcil mandalar Bataklık (Bubalus

carabanesis) ve Nehir mandaları (Bubalus bubalis) olarak ikiye ayrılmaktadır (Şahin, 2015; Yılmaz ve Kara, 2019). Bataklık mandalarının daha çok gücünden yararlanılmakta, nehir mandalarından ise et, süt gibi ürünler elde edilmektedir (Naveena ve Kıran, 2014).

Başta Asya ülkelerinde olmak üzere dünyanın birçok yerinde manda yetiştiriciliği yaygındır. Dünya çapında en çok bilinen süt ürünlerinden biri olan mozzarella peyniri, İtalyan Akdeniz manda sütünden yapılmaktadır (Du ve diğ., 2019). Türkiye'de Samsun, İstanbul, Diyarbakır, Tokat, Afyonkarahisar, Muş ve Bitlis illerinde manda yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır (Gül ve diğ., 2018). Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan mandalar, nehir mandaları grubuna mensup olan Anadolu mandaları ve İtalya kökenli Akdeniz mandalarıdır (Soysal ve diğ., 2005; Atasever ve Erdem, 2007). Ülkemiz, manda sayısı sıralamasında dünyada 13. sırada bulunurken süt üretimi sıralamasında 9. sırada bulunmaktadır (Adkinson ve Konca, 2021). Ülkemizde yaygınlaşan manda yetiştiriciliği, nüfus artışı ile beraber toplum için gerekli hayvansal protein ihtiyacının da giderek artmasından dolayı sığır yetiştiriciliğinden sonra öne çıkmakta ve giderek artmaktadır. Manda yetiştiriciliği, aile işletmeleri olarak gizli işsizliği önlemede önemli bir araç durumunda olmakla birlikte entegre yetiştiriciliği yapılarak ülke ekonomisine de yadsınamayacak bir etki sağlamaktadır. Ülkemizde manda yetiştiriciliği 2017 tarihli ve 9760 sayılı bakanlar kurulu kararı ile yürürlüğe giren hayvancılık yatırımlarının desteklenmesine ilişkin karar kapsamında Tarım ve Orman Bakanlığı 2017/30039 sayılı tebliği ile damızlık manda düvesi yetiştiriciliği desteklenmeye başlamış, Şubat 2021 tarihli 31397 sayılı tebliğ ile desteklenmeye devam etmiştir(https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2021/02/20210216-7.htm, Son erişim tarihi: 16.03.2022). Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK) da günümüzde manda sütü ve ürünlerine artan talep nedeniyle manda yetiştiriciliğini desteklemek amacıyla IPARD (Instrument for Pre-Accesion Assistance Rural Development/ Katılım Öncesi Yardım Aracı Kırsal Kalkınma) programı çerçevesinde bir teşvik programı hazırlamıştır (https://www.tkdk.gov.tr/ Son erişim Tarihi: 16.03.2022). Destekleme programları sayesinde 2007 yılında 84 bin baş olan manda sayısı, 2017 yılında 161 bin başa ulaşmıştır (Tascioğlu ve diğ., 2020). TÜİK verilerine göre ise 2020 yılından 2021 yılına kadar manda sütü ve ürünlerinin üretiminde gözle görülür bir artış saptanmıştır (https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Ocak-2022-45748 Son erişim tarihi: 16.03.2022).

Manda sütünün su oranı inek sütüne göre daha az, kuru madde oranı daha yüksektir (Naydenova, 1993, Kaynak: Taşçıoğlu ve diğ., 2020 p: 315), inek sütüne göre 2 kat daha fazla yağ (%8), doymamış yağ asidi ve protein (%4,5) içermekte olup, fosfolipid ve kolesterolden daha fakirdir ve süt ürünleri elde etmek için en iyi ve kaliteli ham maddelerden biridir (Du ve diğ., 2019). Manda eti ise düşük yağ ve kolesterol oranıyla (Siddikiy ve Faruque, 2018) sığır etinin en sağlıklı alternatifi olarak değerlendirilmektedir (Cruz-Monterrosa ve diğ., 2020). Örneğin, manda sütü ülkemizde yoğurt, kaymak, dondurma, peynir, tereyağı, sütlü tatlılar, krema gibi ürünlerin yapımında, eti ise salam, sucuk, pastırma gibi ürünlerin üretimde kullanılmaktadır (Sarıözkan, 2011; Yılmaz ve Kara, 2019).

2.3. Mikrobiyotanın Saptanması

Mikrobiyotanın saptanmasında en geleneksel yöntem kültür temelli yöntemlerdir ancak mikrobiyotayı meydana getiren milyonlarca bakterinin tek tek izole ve identifikasyonu için her bakterinin üreme özelliğine göre besiyeri ve biyokimyasallar gerekmesinin yanı sıra işgücü, yer ve zaman da gerekmektedir. Bunlara ek olarak mikrobiyotada sadece aerobik özellikte bakteriler bulunmamaktadır. Konakçıyla beraber mutualist bir yaşam süren anaerob bakteriler de mikrobiyotanın bir parçasıdır ve kültür temelli yöntemler bu anerob bakterilerin idenfikasyonunu sınırlandırmakta ve güvenilir sonuçlar vermemektedir. Tüm bu nedenlerden ötürü araştırıcılar non-kültürel yani metagenomik yöntemlere ihtiyaç duymuşlardır ve teknolojinin de gelişmesiyle DNA temelli yöntemler geliştirmişlerdir (Fouhy ve diğ., 2012; Hiergeist ve diğ., 2015; Gürsoy ve Otlu, 2017).

Canlı hücrelerdeki yaşamsal ve kalıtımsal faaliyetler hücrelerde bulunan nükleik asitler sayesinde gerçekleşmekte bu nükleik asitlerin yapısını ise nükleotidler oluşturmaktadır. Bu nükleotidlerin diziliminin ortaya konmasına dizileme adı verilmektedir (Kızmaz ver diğ., 2017). Nükleik asit dizilimi, çok geniş uygulama alanı ile biyolojik araştırmaların en önemli araçlarından biridir (Gut, 2013). Özellikle genetik hastalıkların tanısına ve epidemiyolojik çalışmalara ışık tutabildiği gibi bireyin kalıtımsal bilgileri hakkında veriler elde etmek açısından önem arz etmektedir (Kızmaz ver diğ., 2017; Darcan ve Türkyılmaz 2018).

DNA dizilemesinin tarihi çok zengin ve çeşitlidir (Shendure ve diğ., 2008). Yaklaşık 50 yıl önce Sanger dizilemesinin geliştirilmesi ile biyolojik araştırmalarda bir devrim yaratmıştır. Frederick Sanger tarafından geliştirilen Sanger dizileme yöntemi İnsan Genom Projesi'nde

kullanılmaya başlanmış ve yıllar boyunca nükleik asit dizilimi için altın standart olarak kabul edilmiştir (Sanger ve ark, 1977). Bu yöntem zincir sonlandırma metoduna dayanmaktadır. Maxam ve Gilbert'in 1977 yılında DNA'nın kimyasal modifikasyonuna dayalı geliştirdikleri alternatif yöntem, Sanger yöntemine göre daha az verimli ve kullanılan kimyasal maddeler nedeniyle çalışanın sağlığı açısından tehlike arz ettiği için daha az tercih edilmiştir (Liu ve diğ. 2012; Kızmaz ve diğ., 2017; McCombie ve diğ., 2019). Ancak bu yöntemlerin uzun zaman alması, maliyetli olması ve iş gücü gerektirmesi, bilim adamlarını daha ucuz ve daha hızlı başka yöntemler aramaya itmiştir. Bu sayede yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiştir (Grada ve Weinbrecht, 2013). Sanger tekniğinin etkileri, 2005 yılında yeni nesil dizileme (YND) yöntemlerinin tanıtılmasıyla daha da geniş kapsamlı hale gelmiş, daha uzun ve daha büyük okumalar yapabilen yöntemler ortaya konmuştur (Mardis, 2017). Yeni nesil dizileme teknikleri ile çok daha hızlı, çok daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Üstek ve diğ., 2011).

Dizileme yöntemleri birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Sanger yöntemi (zincir sonlandırma metodu) birinci nesil olarak kabul edilirken (Liu ve diğ., 2012; Park ve Kim, 2016) ikinci ve üçüncü nesil dizileme yöntemleri yeni nesil dizileme yöntemleri (YND) olarak kabul edilmektedir. Yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde çok daha kısa sürede çok daha zengin ve çok daha güvenilir veriler elde edilebilmekte, sağladığı bu avantajlar sayesinde de birçok alanda yapılan moleküler çalışmalarda tercih edilmektedir (Üstek ve diğ., 2011; Grada ve Weinbrecht, 2013; Park ve Kim, 2016; Kızmaz ve diğ., 2017).

İkinci nesil dizileme yöntemlerinin kullanımı 2005 yılında Roche/454 ve 2007'de Illumina/Solexa'nın piyasaya sürülmesiyle başlamış ve moleküler çalışmalarda kendine yer bulmuştur. Bu yöntem çalışılacak biyolojik materyalden elde edilen genomik DNA'nın seçilmiş hedef bölgesinin enzimatik yollarla parçalara ayrılarak çok sayıda DNA parçası ile kütüphane oluşturulması, kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılması, çoğaltılan parçaların dizilenerek elde edilen ham verilerin analiz edilmesine dayanmaktadır (Park ve Kim, 2016; Doğan ve diğ. 2017). İkinci nesil dizilemenin temel prensibi, birçok klonal şablonun paralel olarak kullanılması ve enzimatik replikasyon kullanan bir dizi oluşturulmasına dayanır (Gut, 2013). İkinci nesil dizileme yöntemleri, küçük varyantların popülasyon ölçekli analizlerini mümkün kılmış olsa da daha büyük yapısal varyasyonların analizinin zor olduğu kanıtlanmıştır. Bu yöntemler kısa okumalar yaparak sonrasında bunların birleştirilmesi prensibine dayandığından hatalı okumalar da yapabilmektedir (Lee ve diğ., 2016). Bu nedenlerden dolayı daha kısa sürede, uzun okumalar yapan ve daha güvenilir dizileme yapmayı vaat eden üçüncü

nesil dizileme yöntemleri (Schadt ve diğ., 2010), 2015 yılında Oxford Nanopore Technologies'in MinION teknolojisini araştırıcıların hizmetine sunmasıyla kullanılmaya başlanmıştır (Choi, 2016). Bu teknoloji temelde DNA'nın yapısını oluşturan nükleotidlerin yağ bariyer üzerinde gömülü nano boyuttaki protein porlardan geçerken elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin ölçülmesine dayanmaktadır (Kasianowicz ve diğ., 1996). Ayrıca üçüncü nesil dizileme yöntemlerinin uygulaması da daha pratiktir ve diğer yöntemlerdeki gibi dizileme öncesinde her zaman bir PCR aşamasına gerek duyulmaksızın (Schadt ve diğ., 2010) tek molekül dizilemi veya klonal amplifikasyon ve uzun moleküllerin dizilimini kullanarak 100.00 bp i aşan okumalar yapabilmektedir (Lee ve diğ., 2016). Ancak elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için gelişmiş yazılımlar gerekmekte ve veriler çok kapsamlı olduğundan çok büyük depolama alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Üstek ve diğ., 2011; Kızmaz ve diğ., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

1.1. Gereç

1.1.1. Örnekler

İstanbul ve Kırklareli'ndeki 4 çiftlikten, daha önce antibiyotik kullanmadığı bilinen 48 malak, 48 yetişkin mandaya ait toplam 96 dışkı örneği toplandı. 48 malağın 24'ü Anadolu Mandası (yerli ırk), 24'ü İtalyan Akdeniz Mandası olarak seçildi. Malaklar 1 yaşından küçük ve cinsel olgunluğa ulaşmadığı kabul edilerek cinsiyet ayrımı yapılmadan örneklendi. 48 yetişkin mandanın 24'ü Anadolu mandası (12 dişi, 12 erkek), 24'ü İtalyan Akdeniz mandası (12 dişi, 12 erkek) olarak seçildi. Çalışmada kullanılacak dışkı örnekleri Ağustos 2019-Şubat 2020 tarihleri arasında direkt olarak rektumdan toplandı. Hayvanların ırk, yaş, cinsiyet ve gebelik bilgileri not edildi. Toplanan dışkı örnekleri, alındığı anda, içinde -196°C sıvı azot bulunan tanklara aktarıldı. Dizileme analizi gerçekleştirilene kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait, ırk, yaş, cinsiyet bilgileri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1:Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait ırk, cinsiyet ve yaş bilgileri

No	Yaş	Örneğin Alındığı Yer	Irk	Cinsiyet
1	10 Gün	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
2	7 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
3	7 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
4	4 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
5	1 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
6	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
7	1.5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
8	1.5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
9	3 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
10	2-3 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-

Tablo 3.1 (devam): Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait ırk, cinsiyet ve yaş bilgileri.

11	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
12	4 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
13	6 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	♀
14	5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	♀
15	5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	♀
16	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
17	2-3 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
18	2-3 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
19	2-3 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	Anadolu	-
20	1,5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
21	1,5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
22	3 Hafta	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
23	2 Hafta	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
24	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
25	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
26	3,5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
27	3 Hafta	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
28*	2.5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
29*	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
30	2 Hafta	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
31	1,5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
32	5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
33	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
34	1,5 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
35	6 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
36	2 Ay	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
37*	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
38	2 Hafta	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	-
39	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
40*	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀

Tablo 3.1 (devam): Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait ırk, cinsiyet ve yaş bilgileri.

41	5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
42	4 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
43	5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
44	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
45	2,5 Yaş	Kırklareli/Vize/Soğucak Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
46	3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♂
47	6 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
48	2 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
49	4-5 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
50	2-3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♂
51	2-3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
52	2-3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
53	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
54	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
55	3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
56	3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
57	6 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
58	4 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
59	4 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
60	7 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
61	2-3 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
62	6 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
63	6 Ay	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	-
64	6-7 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
65	6-7 Yaş	İstanbul/Çatalca/Nakkaş Köyü	Anadolu	♀
66	2,5 Yaş	İstanbul/Arnavutköy/Merkez	Anadolu	♂
67	2 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-
68	2-3 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-

Tablo 3.1 (devam): Örneklerin toplandığı yerler ve mandalara ait ırk, cinsiyet ve yaş bilgileri.

69	2-3 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-
70	2 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-
71	2-3 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-
72	6 Ay	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	-
73	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
74	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
75	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
76	3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
77	3 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
78	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
79	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
80	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
81	2 Yaş	İstanbul/Çatalca/Örcünlü Köyü	Anadolu	♂
82	4 Ay	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	-
83	4 Ay	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	-
84	4 Ay	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	-
85	4 Ay	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	-
86	4 Ay	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	-
87	3 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
88	4 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
89	4 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
90	4 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
91	4 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
92	4 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
93	2 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♀
94	3 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
95	3 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂
96	3 Yaş	İstanbul/Silivri/Sinekli Köyü	İtalyan Akdeniz	♂

-: 1 yaşından küçük hayvanların cinsel olgunluğa ulaşmadığı kabul edildi.

*: Gebe hayvanlar ♀: Dişi, ♂: Erkek

1.1.2. DNA Ekstraksiyonu

Toplanan örneklerden DNA ekstraksiyonu için Qiagen Stool Mini Kit (Cat. No.: 51504) kullanıldı.

- QIAamp Mini Spin Columns
- Collection Tubes (2 ml)
- InhibitEX® Tablets
- Buffer ASL
- Buffer AL*
- Buffer AW1* (konsantre)
- Buffer AW2† (konsantre)
- Buffer AE

DNA Havuzunun Oluşturulması

Elde edilen 96 adet DNA ekstraktı ırk, yaş, cinsiyet, beslenme ve gebelik durumlarına göre 4'erli 24 gruba ayrılarak havuzlandı.

1.1.3. Kütüphane Oluşturulması

1.1.3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasyon

- LongAmp® Taq 2X Master Mix (M0287S) kullanıldı.
- Universal Kuyruklu Primerler
- Hedef DNA

Agar Jel Elektroforezi

- Agaroz, Molecular Biology Grade, (Thermo Fisher Scientific, 17850)
- DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, SM1113)
  DNA merdivenleri 100 bp-5000 bp
- Ethidium Bromide (Sigma-Aldrich, E1510)
  3,8 Diamino-1-ethyl-6-phenylphenantridinium bromide
- TAE Buffer (Thermo Fisher Scientific, #B49)
  Tris
  Asetik asit

EDTA

- Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific, R0611)

  10mM Tris-HCl

  %0,03 bromofenol mavisi

  %0,03 ksilen siyanol FF

  %60 gliserol

  60mM EDTA

1.1.3.2. Barkodlama

- LongAmp® Taq 2X Master Mix (M0287S)
- Barcoding Expansion kiti 1-96 (Nanopore®, EXP-PBC096)
- Amplikonlar

Tablo 3.2: Barkod primerlerinin listesi.

BC 01	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTG
BC 02	TCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGT
BC 03	GAGTCTTGTGTCCCAGTTACCAGG
BC 04	TTCGGATTCTATCGTGTTTCCCTA
BC 05	CTTGTCCAGGGTTTGTGTAACCTT
BC 06	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC
BC 07	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT
BC 08	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT
BC 09	AACTAGGCACAGCGAGTCTTGGTT
BC 10	AAGCGTTGAAACCTTTGTCCTCTC
BC 11	GTTTCATCTATCGGAGGGAATGGA

Tablo 3.2 (devam): Barkod primerlerinin listesi.

BC 12	CAGGTAGAAAGAAGCAGAATCGGA
BC 13	AGAACGACTTCCATACTCGTGTGA
BC 14	AACGAGTCTCTTGGGACCCATAGA
BC 15	AGGTCTACCTCGCTAACACCACTG
BC 16	CGTCAACTGACAGTGGTTCGTACT
BC 17	ACCCTCCAGGAAAGTACCTCTGAT
BC 18	CCAAACCCAACAACCTAGATAGGC
BC 19	GTTCCTCGTGCAGTGTCAAGAGAT
BC 20	TTGCGTCCTGTTACGAGAACTCAT
BC 21	GAGCCTCTCATTGTCCGTTCTCTA
BC 22	ACCACTGCCATGTATCAAAGTACG
BC 23	CTTACTACCCAGTGAACCTCCTCG
BC 24	GCATAGTTCTGCATGATGGGTTAG

1.1.3.3. DNA'nın Tamiri

- NEBNext® FFPE DNA Repair Mix (M6630L)

  NEBNext FFPE DNA Repair Buffer

  NEBNext FFPE DNA Repair Mix

- NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (E7546L)

  NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer

  NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix

1.1.3.4. Ligasyon

- Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK 109) (Nanopore®)

DNA CS	DCS
Adapter Mix	AMX
Ligation Buffer	LNB
L Fragment Buffer	LFB
S Fragment Buffer	SFB
Sequencing Buffer	SQB
Elution Buffer	EB
Loading Beads	LB
Sequencing Tether	SQT

1.1.3.5. DNA Yoğunluğunu Ölçülmesi

DNA ekstraksiyonu, PCR sonrası saflaştırma işleminin akabinde ve barkodlama aşamalarından sonra DNA yoğunluğunun ölçülmesinde Thermo Fisher Scientific Qubit 2.0 Fluorometric Quantification cihazı ve Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Q33230) kullanıldı.

1.1.3.6. Saflaştırma (Pürifikasyon)

PCR, DNA tamiri ve ligasyon aşamalarından sonra gerçekleştirilen saflaştırma işlemi için Mag-Bind® Total Pure NGS (Omega, Bio-Tek) kitleri kullanıldı.

1.1.4. Dizileme Analizi

- Flowcell Primig Kit (Nanopore®, EXP-FLP002)
- Flowcell (Flow Cell R9 Version Nanopore®)
- MinION ™
- MinKNOW ™ versiyon 0.46.1.9 (R9.4) yazılımı
- DNA Kütüphanesi

1.1.5. Biyoinformatik Analizler

- Guppy v3.1.5 yazılımı
- Porechop v0.2.3 yazılımı
- Mothur v.1.39.5 platformu
- Minitab ve R programları

1.1.6. Kullanılan Diğer Gereçler

Agaroz Jel Elektroforez Tankı (Agagel Mini-Wide)

Biyogüvenlik Kabineti (Heal Force)

Güç Kaynağı (Biometra-Power pack P25)

Manyetik Rak (Merck, LifeSep Magnetic separator unit, Z740159-1EA)

Mikrosantrifüj (Hetttich)

Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ml kapaklı, Nest)

Mikrosantrifüj tüpü (2 ml kapaklı, Nest)

PCR tüpleri (0,2 ml'lik ince çeperli RNaz ve DNaz' dan arındırılmış, Axygen)

PCR tüpleri (0,5 ml'lik ince çeperli RNaz ve DNaz' dan arındırılmış, Axygen)

Pipet uçları (DNaz, RNaz' dan arındırılmış filtreli, Nest)

-0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000 µl

Pipetler (otomatik pipetler, Vitalab)

-0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000 µl

Proteinase K (Thermo Scientific, EO0491)

Sıvı Azot tankı (IMV tank gt9)

Thermal cycler (Sacem Runik Thermal Cycler)

Thermoblok (Labnet)

Ultra Derin Dondurucu (-80°C) (Thermo Scientific, TSD40240A)

UV Jel Görüntüleme Sistemi (Infinity, Vilber Lourmat)

Vorteks mikser (Biosan)

1.2. Yöntem

1.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için kullanılan Qiagen Stool Mini Kit (Kat. No. 51504) üreticisinin önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirildi. Bu protokole göre;

- Dışkılardan 180-200 mg tartılara 2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve bu tüpler buzun üstüne yerleştirildi.
- Her dışkı örneğine 1,4 ml Tampon ASL eklendi. Dışkı numunesi tamamen homojen hale gelene kadar sürekli olarak vortekslendi.
- Süspansiyon 70°C'de 5 dakika ısıtıldı.

- 15 saniye vortekslendi ve dışkı partiküllerini peletlemek için numune, 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlendi.
- 1,2 ml süpernatant yeni bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve pelet atıldı.
- Her numuneye bir InhibitEX Tablet eklendi, hemen ve sürekli olarak 1 dakika veya tablet tamamen askıya alınana kadar vortekslendi.
- İnhibitörlerin InhibitEX matrisine adsorbe etmesine izin vermek için süspansiyon oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- InhibitEX matrisine bağlı pelet inhibitörleri için numune tam hızda 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve pelet atıldı. Numune tam hızda 3 dakika santrifüjlendi.
- Yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 15 µl proteinaz K pipetlendi.
- Proteinaz K içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne adım 8'den 200 µl süpernatant aktarıldı.
- 200 µl AL Tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
- 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Lizata 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve vortekslendi.
- 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş yeni bir QIAamp döndürme kolonunun kapağını etiketlendi, Çerçeve nemlendirilmeden adım 13'teki tam lizat QIAamp döndürme kolonuna dikkatlice uygulandı. Tam hızda 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp döndürme kolonunu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı.
- QIAamp döndürme kolonuna 500 µl Buffer AW1 eklendi. Tam hızda 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp döndürme kolonunu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren toplama tüpü atıldı.
- QIAamp döndürme kolonuna 500 µl Buffer AW2 eklendi. 3 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi. Süzüntü içeren toplama tüpü atıldı.

- QIAamp döndürme kolonunu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve eski toplama tüpü süzüntüyle birlikte atıldı. 1 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi.
- QIAamp döndürme kolonunu yeni, etiketli 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. QIAamp döndürme kolonuna ve 200 µl Tampon AE'yi doğrudan QIAamp membranına aktarıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi, ardından DNA'yı ayrıştırmak için tam hızda 1 dakika santrifüj edildi.

DNA Yoğunluğunu Ölçülmesi

Elde edilen ekstraktlardaki DNA yoğunluğu ölçüldü. İçeriğinde 2,38 - 2,50 ng DNA bulunan örnekler direkt olarak çalışmaya dâhil edildi. DNA miktarı sınır değerler altında bulunan örneklerde yeniden ekstraksiyon gerçekleştirildi. Sınır değerlerin üzerinde çıkan örnekler için uygun miktarda DNA içeren dilüsyonlar çalışmaya dâhil edildi.

DNA Havuzlarının Oluşturulması

Elde edilen 96 adet DNA ekstraktlarından ırk, yaş, cinsiyet, beslenme ve gebelik durumlarına göre, hepsi eşit miktarda DNA içerecek şekilde 4'erli 24 adet DNA havuzu oluşturuldu. Oluşturulan gruplar aşağıdaki tablolarda (Tablo 3.3, 3.4, 3.5) verilmiştir.

Tablo 3.3: Anadolu malaklarının yaşa ve beslenme durumlarına göre gruplandırılması.

ANADOLU MALAKLARI				
GRUP	**NO**	**YAŞ**	**ÇİFTLİK**	**BESLENME DURUMLARI**
1. Grup	1	10 gün	Soğucak Köyü	***3 ve 3 aydan küçükler yem + anne sütü ile beslenenler***
	5	1 ay	Soğucak Köyü	
	67	2 ay	Örcünlü Köyü	
	48	2 ay	Nakkaş Köyü	
2. Grup	70	2 ay	Örcünlü Köyü	
	8	1.5 ay	Soğucak Köyü	
	16	2 ay	Soğucak Köyü	
	11	2 ay	Soğucak Köyü	
3. Grup	10	2-3 ay	Soğucak Köyü	
	71	2-3 ay	Örcünlü Köyü	
	17	2-3 ay	Soğucak Köyü	
	69	2-3 ay	Örcünlü Köyü	
4. Grup	68	2-3 ay	Örcünlü Köyü	
	18	2-3 ay	Soğucak Köyü	
	19	2-3 ay	Soğucak Köyü	
	61	2-3 ay	Nakkaş Köyü	
5. Grup	58	4 ay	Nakkaş Köyü	***3 aydan büyükler Yem ile beslenenler***
	72	6 ay	Örcünlü Köyü	
	59	4 ay	Nakkaş Köyü	
	60	7 ay	Nakkaş Köyü	
6. Grup	62	6 ay	Nakkaş Köyü	
	56	6 ay	Nakkaş Köyü	
	47	6 ay	Nakkaş Köyü	
	57	6 ay	Nakkaş Köyü	

Tablo 3.4: İtalyan Akdeniz malaklarının yaş ve beslenme durumlarına göre grupladırılması.

İTALYAN AKDENİZ MALAKLARI				
GRUP	**NO**	**YAŞ**	**ÇİFTLİK**	**BESLENME DURUMLARI**
7. Grup	27	3 hafta	Soğucak Köyü	***3 ve 3 aydan küçükler yem + anne sütü ile beslenenler***
	22	3 hafta	Soğucak Köyü	
	23	2 hafta	Soğucak Köyü	
	30	2 hafta	Soğucak Köyü	
8. Grup	31	1,5 ay	Soğucak Köyü	
	34	1,5 ay	Soğucak Köyü	
	21	1,5 ay	Soğucak Köyü	
	20	1,5 ay	Soğucak Köyü	
9. Grup	25	2 ay	Soğucak Köyü	
	33	2 ay	Soğucak Köyü	
	24	2 ay	Soğucak Köyü	
	36	2 ay	Soğucak Köyü	
10. Grup	7	1.5 ay	Soğucak Köyü	
	38	2 hafta	Soğucak Köyü	
	9	3 ay	Soğucak Köyü	
	6	2 ay	Soğucak Köyü	
11. Grup	26	3,5 ay	Soğucak Köyü	***3 aydan büyükler Yem ile beslenenler***
	82	4 ay	Sinekli Köyü	
	83	4 ay	Sinekli Köyü	
	84	4 ay	Sinekli Köyü	
12. Grup	86	4 ay	Sinekli Köyü	
	85	4 ay	Sinekli Köyü	
	32	5 ay	Soğucak Köyü	
	35	6 ay	Soğucak Köyü	

Tablo 3.5: Anadolu mandalarının yaş ve cinsiyetlerine göre gruplandırılması.

ANADOLU MANDALARI							
DİŞİ				ERKEK			
GRUP	NO	YAŞ	ÇİFTLİK	GRUP	NO	YAŞ	ÇİFTLİK
13. Grup	65	6-7 yaş	Nakkaş Köyü	16. Grup	50	2-3 yaş	Nakkaş Köyü
	64	6-7 yaş	Nakkaş Köyü		73	2 yaş	Örcünlü Köyü
	13	6 yaş	Soğucak Köyü		74	2 yaş	Örcünlü Köyü
	14	5 yaş	Soğucak Köyü		75	2 yaş	Örcünlü Köyü
14. Grup	51	2-3 yaş	Nakkaş Köyü	17. Grup	76	3 yaş	Örcünlü Köyü
	52	2-3 yaş	Nakkaş Köyü		77	3 yaş	Örcünlü Köyü
	53	2 yaş	Nakkaş Köyü		78	2 yaş	Örcünlü Köyü
	54	2 yaş	Nakkaş Köyü		79	2 yaş	Örcünlü Köyü
15. Grup	55	3 yaş	Nakkaş Köyü	18. Grup	81	2 yaş	Örcünlü Köyü
	56	3 yaş	Nakkaş Köyü		80	2 yaş	Örcünlü Köyü
	49	2 yaş	Nakkaş Köyü		66	2,5 yaş	Arnavutköy
	15	2 yaş	Soğucak Köyü		46	3 yaş	Nakkaş Köyü

Tablo 3.6: İtalyan Akdeniz mandalarının cinsiyet, yaş ve gebelik durumlarına göre gruplandırılması.

İTALYAN AKDENİZ MANDALARI							
DİŞİ				ERKEK			
GRUP	NO	YAŞ	ÇİFTLİK	GRUP	NO	YAŞ	ÇİFTLİK
19. Grup *	40	2,5 yaş	Soğucak Köyü	22. Grup	94	3 yaş	Sinekli Köyü
	37	2,5 yaş	Soğucak Köyü		87	3 yaş	Sinekli Köyü
	28	2.5 yaş	Soğucak Köyü		95	3 yaş	Sinekli Köyü
	29	2,5 yaş	Soğucak Köyü		96	3 yaş	Sinekli Köyü
20. Grup	39	2,5 yaş	Soğucak Köyü	23. Grup	88	4 yaş	Sinekli Köyü
	44	2,5 yaş	Soğucak Köyü		89	4 yaş	Sinekli Köyü
	93	2 yaş	Sinekli Köyü		90	4 yaş	Sinekli Köyü
	45	2,5 yaş	Soğucak Köyü		91	4 yaş	Sinekli Köyü
21. Grup	2	7 yaş	Soğucak Köyü	24. Grup	92	4 yaş	Sinekli Köyü
	3	7 yaş	Soğucak Köyü		42	4 yaş	Soğucak Köyü
	41	5 yaş	Soğucak Köyü		12	4 yaş	Soğucak Köyü
	43	5 yaş	Soğucak Köyü		4	4 yaş	Soğucak Köyü

*Bu grup gebe hayvanlardan oluşmaktadır.

1.2.2. Kütüphane Oluşturulması

1.2.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasyon

Amplikon kütüphanelerinin oluşturulması için kullanılacak primer çifti ile 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesini kapsayan yaklaşık 1400 bp'lik bölge hedeflendi (Zeng vd., 2013; Klindworth vd., 2013).

PCR karışımı şu şekilde hazırlandı:

- 21µl DNA
- 2 µ Forward Primer (10 pmol)
- 2 µl Reverse Primer (10 pmol)
- 25 µl LongAmp Taq

PCR cihazında şu ısıl döngü programı izlendi: 95°C'de 1 dakika; 30 döngü 95°C'de 20 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 65°C'de 75 saniye; 65°C'de 5 dakika. Son ürünler +4°C'de soğutuldu.

Tablo 3.7: Evrensel Kuyruklu Primerler.

Oligo ismi	Universal Etiket	5'-3' Diziler	Amplikon
16S-27F	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC	AGRGTTTGATYHTGGCTCAG	16S
16S-1492R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC	TACCTTGTTAYGACTT	16S

Agar Jel Elektroforezi

PCR ürünü **%**1,5'luk agaroz jelde yürütülerek moleküler ağırlığı (~1450 bp) doğrulandı ve manyetik saflaştıma işlemi gerçekleştirildi.

Saflaştırma

DNA tamiri işlemi sonunda Mag-Bind® Total Pure NGS (Omega, Bio-Tek) kitleri ile kit üreticisinin belirlediği protokole göre manyetik saflaştıma işlemi gerçekleştirildi. Bu protokole göre;

- Mag-Bind Total Pure NGS oda sıcaklığına alındı.
- İçinde patikül kalmayana kadar vortekslendi.
- Örnekten 1X, Mag-Bind Total Pure NGS 1,2X oranında olacak şekilde her örnekten 50µl ve Mag-Bind Total Pure NGS'den 60µl alınarak karışım hazırlandı.
- Pipetle 5-10 kez al-ver yapıldıktan sonra 30 saniye vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Mag-Bind® Total Pure NGS, manyetize edilmek üzere plaka, bir manyetik raka yerleştirildi. Mag-Bind® Total Pure NGS, solüsyondan tamamen temizlenene kadar oda sıcaklığında beklendi.
- Temizlenen süpernatant aspire edildi ve atıldı.
- Mıknatısların bulunduğu her bir kuyuya 200 µL %70 etanol eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika tutuldu.

- Süpernatant aspire edildi ve atıldı.
- Adım 9-11 ikinci kez %70 etanol ile tekrar edildi.
- Plaka, manyetik rakta 5-15 dakika bırakıldı. Bir pipet ile kalan sıvıyı çıkarıldı.
- Plaka manyetik raktan alındıktan sonra her kuyucuğa 30-40 µL Elüsyon Buffer eklendi.
- 20 kez pipet ile al-ver yapıldıktan sonra 30 saniye vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Manyetik raka yerleştirildi. Mıknatıslar solüsyondan ayrılana kadar oda sıcaklığında tutuldu.
- Berrak süspansiyon saflaştırılmış DNA'yı içermektedir.

Yoğunluk Ölçümü

Uygulanan saflaştırma işleminden sonra DNA yoğunluk ölçümü gerçekleştirildi. 1ml'de en az 10 nanogram olması hedeflendi.

1.2.2.2. Barkodlama

Metagenom analizi için 4'er li 24 adet havuzda toplanmış örnekler barkod numarası verilmek üzere PCR işlemine tabii tutuldu. Barkod isimleri ve karşılık gelen gruplar 3.8. numaralı tabloda gösterilmiştir.

16S rRNA PCR sonucunda elde edilen amplikonlardan 24µl, LongAmp Taq'dan 25µl ve barkod primerlerinden 1'er µl eklenerek PCR karışımı oluşturuldu. 95°C'de 3 dakika, 15 döngü 95°C'de 15 saniye 62°C'de 15 saniye, 65°'de 75 saniye ve 65°C'de 5 dakika PCR ısıl döngüsü gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: Oluşturulan gruplar ve aldıkları barkod numaraları.

BARKOD İSİMLERİ	KARŞILIK GELEN GRUPLAR
BC 01	Anadolu malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 1)
BC 02	Anadolu malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 2)
BC 03	Anadolu malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 3)
BC 04	Anadolu malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 4)
BC 05	Anadolu malak, > 3 ay, sadece yem (Grup 5)
BC 06	Anadolu malak, > 3 ay, sadece yem (Grup 6)

Tablo 3.8 (devam): Oluşturulan gruplar ve aldıkları barkod numaraları.

BC 07	İtalyan Akdeniz Malak, < 3 ay, süt ve yem (grup 7)
BC 07	İtalyan Akdeniz Malak, < 3 Ay, Süt ve Yem (Grup 7)
BC 08	İtalyan Akdeniz malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 8)
BC 09	İtalyan Akdeniz malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 9)
BC 10	İtalyan Akdeniz malak, < 3 ay, süt ve yem (Grup 10)
BC 11	İtalyan Akdeniz malak, > 3 ay, sadece yem (Grup 11)
BC 12	İtalyan Akdeniz, > 3 ay, sadece yem (Grup 12)
BC 13	Anadolu manda, > 6-7 yaş, Dişi (Grup 13)
BC 14	Anadolu manda, > 2 yaş, Dişi (Grup 14)
BC 15	Anadolu manda, > 2 yaş, Dişi (Grup 15)
BC 16	Anadolu manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 16)
BC 17	Anadolu manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 17)
BC 18	Anadolu manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 18)
BC 19	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Dişi, gebe (Grup 19)
BC 20	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Dişi (Grup 20)
BC 21	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Dişi (Grup 21)
BC 22	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 22)
BC 23	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 23)
BC 24	İtalyan Akdeniz manda, > 2 yaş, Erkek (Grup 24)

Yoğunluk Ölçümü

Barkod primerlerinin kuyruklara bağlanması amacıyla yapılan PCR işleminden sonra DNA yoğunluğu ölçüldü. 1ml'de en az 20 nanogram DNA içermesi hedeflendi.

1.2.2.3. Havuz Oluşturulması

Barkodlama PCR'ı sonucunda elde edilen her amplikondan, eşit miktarda DNA içerecek şekilde alınarak tüm gruplar tek bir havuzda toplandı.

1.2.2.4. DNA'nın Tamiri

Oluşturulan havuzlardaki kırılmış ya da eksik nükleotid içeren DNA'ların tamirinin yapılması için, havuz karışımları NEBNext® FFPE DNA Repair Mix (M6630L) NEBNext®

Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (E7546L) kitleri ile birlikte 60µl hazırlanarak 20°C'de 5 dakika ve 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

Saflaştırma

DNA tamiri işlemi sonunda Mag-Bind® Total Pure NGS (Omega, Bio-Tek) kitleri manyetik saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

1.2.2.5. Ligasyon

Adaptör ligasyonu aşaması için kit protokolüne göre; 25 µl Ligation Buffer (LNB), 10 µl NEBNext Quick T4 DNA Ligase, 5 µl Adapter Mix (AMX), 60 µl havuz DNA eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Saflaştırma

Ligasyon aşamasından sonra, ortamdaki fazla adaptörlerin temizlenmesi ve boş okumalara neden olmaması için, Mag-Bind® Total Pure NGS (Omega, Bio-Tek) kitleri ile manyetik saflaştıma işlemi gerçekleştirildi.

1.2.3. Dizileme Analizi

Kullanılacak flowcell, MinION ™ cihazında kontrolü yapıldıktan sonra, R9.4 akış hücresi priming, kitte belirtilen protokole göre uygulanarak yüklemeye hazır hale getirildi ve hazırlanan dizileme karışımı akış hücresinin örnek yükleme kısmına aktarıldı. Bu protokole göre;

- Çözülmüş ve karıştırılmış Flush Buffer (FB) tüpüne doğrudan 30 µl çözülmüş ve karıştırılmış Flush Tether (FLT) eklendi ve oda sıcaklığında vorteksleyerek karıştırıldı.
- Hava kabarcıklarının girmesini önleyerek, hazırlama portu aracılığıyla akış hücresine 800 µl hazırlama karışımı yüklendi. 5 dakika beklendi.

Hazırlanan DNA kütüphanesinden 14 µl, Loading beads'den 25.5 µl Running Buffer karışımından 35.5 µl alınarak karıştırıldı. Toplam 75µl'lik karışım flowcell'e yüklendi. MinION ™ cihazına konuldu.

MinION ™ kontrol yazılımı, MinKNOW ™ versiyon 0.46.1.9 (R9.4) kullanılarak 48 saatlik (R9.4) bir dizileme protokolü gerçekleştirildi.

1.2.4. Biyoinformatik Analizler

Dizileme bittikten sonra, fast5 formatında elde edilen sonuçlar guppy v3.1.5 yazılımı kullanılarak fastq formatına çevrildi (base-calling ve de-multiplexing). Barkod ve adaptör sekansları Porechop v0.2.3 yazılımı kullanılarak temizlendi, ayrıca dizilerin her iki ucundan 45 baz silinerek evrensel primer ve etiketler de silindi. Dizilerin temizlenmesinin ardından 1350-1550 bp uzunluğundaki okumalar filtrelendi ve geriye kalan okumalar analizden çıkarıldı.

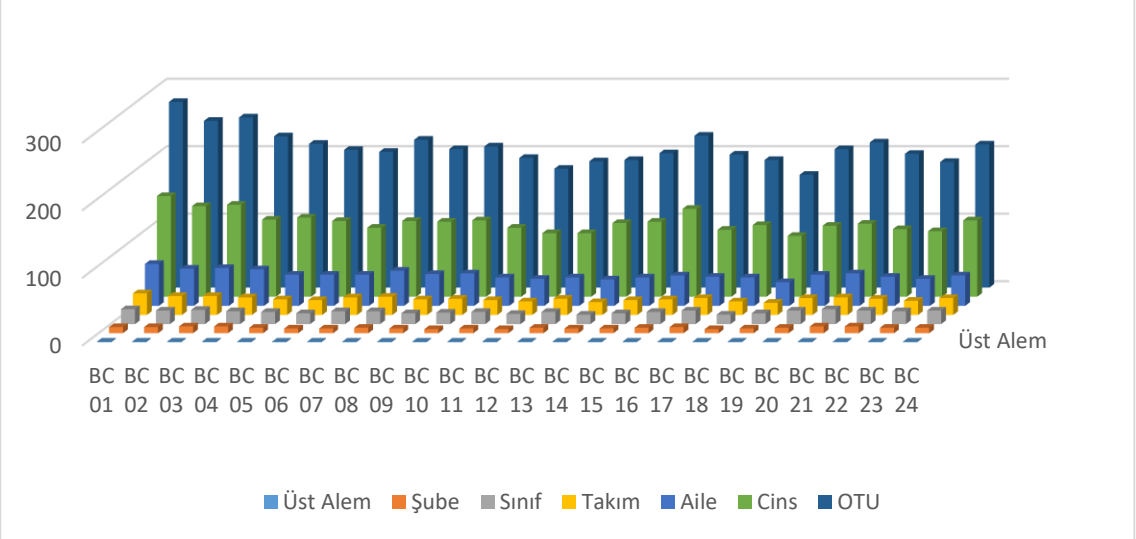
Temizlenmiş okumalar mothur v.1.39.5 platformu kullanılarak özelleştirilmiş iş akışı ile analize tabi tutuldu. Sekanslar kimerik yapılardan arındırıldı, hizalandı, benzerlik matrisi ile aralarındaki mesafeler ölçülerek %99 dan daha fazla benzerlik gösteren okumalar kümelenerek operasyonel taksonomik birimler (Operational Taxonomik Unit/ OTU) oluşturuldu. Oluşturulan OTU'lar RDP 16S rRNA veri tabanına göre karşılaştırılarak taksonomik anotasyonları gerçekleştirildi ve aynı cins olarak tespit edilen OTU'lar ilişkilendirilerek istatistiksel sonuçlar elde edildi. OTU'ların eşleştiği organizmalara, bunların kantitatif değerlerine ve örneklere ait metadata verilerine göre grafikler Minitab ve R programları kullanılarak çeşitli istatistiksel analizler ile oluşturuldu.

Elde edilen kapsamlı verilerden çekirdek mikrobiyotayı saptamak için görülen taksonların %1'den fazla görülmüş olanlar değerlendirildi (O'donnell ve diğ., 2017).

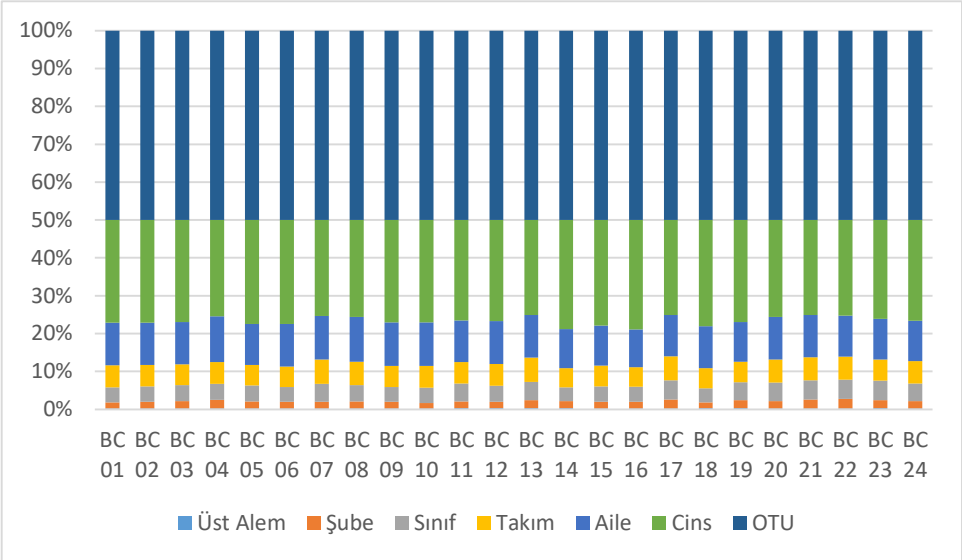
4. BULGULAR

Metagenom analizi sonucunda 180 MB veri elde edildi. Bu verilere göre işlenen havuz örneklerinden elde edilen OTU sayıları üst âlem, şube, sınıf, takım, aile, cins düzeyinde dağılımlarına göre sınıflandırıldı ve yüzde değer olarak hesaplandı. Grupların kendi aralarında ve birbirleriyle olan benzerliklerini ve Alfa çeşitliliklerini gösteren Shannon ve Chao grafikleri, beta çeşitliliklerini gösteren Temel Bileşen Analiz (Principle Component Analysis / PCA) ve Temel Koordinat Analiz (Principle Coordinate Analysis/ PCoA) grafikleri 2 boyutlu ve 3 boyutlu olarak çizildi.

Tüm grupların toplamında 489 OTU tespit edildi. Gruplara göre OTU sayıları ve taksonomik olarak dağılımları ve yüzde değerleri sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verildi. Buna göre en yüksek OTU sayısı 1. grupta (3 aydan küçük Anadolu malakları) 275 olarak gözlenirken, en düşük OTU sayısı 167 ile 19. grupta (2,5 yaş, İtalyan gebe) gözlendi. Her iki ırk için de malaklarda OTU sayılarının mandalara göre daha fazla olduğu saptandı.

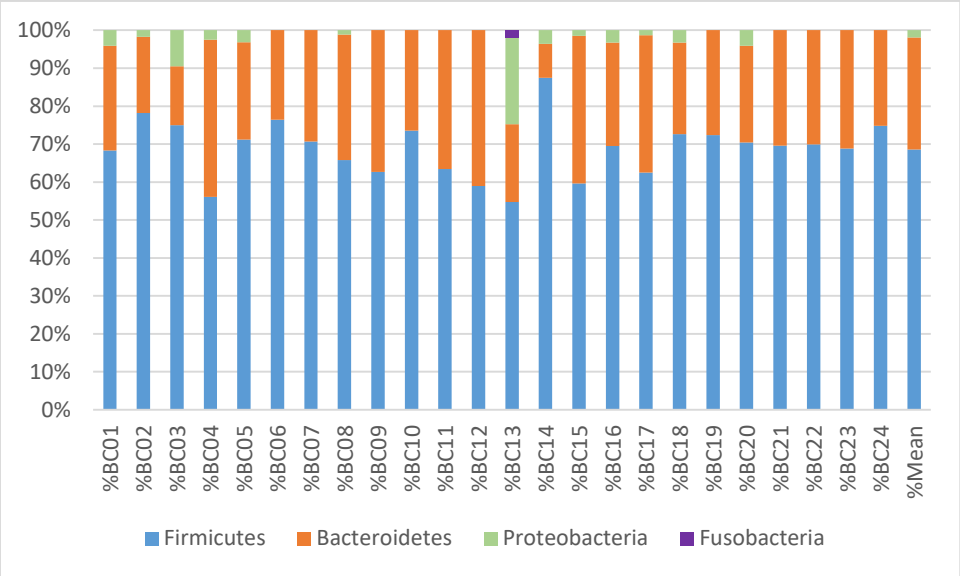


Şekil 4.1: Gruplara göre OTU sayıları ve taksonomik dağılımları.



Şekil 4.2: Gruplara göre OTU sayılarının taksonomik dağılımlarının yüzde oranları.

Şube bazında dağılımlara bakıldığında tüm gruplarda baskın şube, Firmicutes olup, en yüksek 14. grupta (2-3 yaş dişi aylık anadolu mandaları) %87,12 oranında, en düşük 13. grupta (6-7 yaşlı Anadolu dişi manda) %54,53 oranında (ortalama %68,3) görüldü (Şekil 4.3). %29,45 ortalama ile ikinci sırada gelen Bacteriodes, en düşük 14. grupta (2,5 yaş ortalamalı dişi Anadolu mandaları) %8,9 oranında, en yüksek 4. grupta (2-3 aylık Anadolu malakları) %41,3 oranında saptandı. Üçüncü sırada gelen Proteobacteria şubesin en yüksek oranda (%22,7) 13. grupta (6-7 yaşlı Anadolu dişi manda), en az oranda 8. grupta (1,5 aylık İtalyan Akdeniz malakları) %1,125 oranında, ortalama %1,88 oranında gözlenirken grup 6,7,9 10, 11, 12, 19, 21, 22, 23, 24'te gözlenmedi. Fusobacteria şubesi ise sadece grup 13 (6-7 yaşlı Anadolu dişi manda)'te gözlendi. Şubelerin gruplara göre yüzde dağılımları Şekil 4.3' te gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Tespit edilen şubelerin gruplara göre yüzde dağılımı ve ortalama yüzdesi.

Anadolu ve İtalyan Akdeniz mandalarında Firmicutes/Bacteroidetes oranları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de verildi. Buna göre oranlar arasında belirgin bir farklılık görülmezken, en yüksek oran (2,99) 3 aydan büyük, sadece yem ile beslenen Anadolu malaklarında gözlemlendi. En düşük oran (1,57) ise İtalyan Akdeniz ırkı 3 aydan büyük malaklarda görüldü.

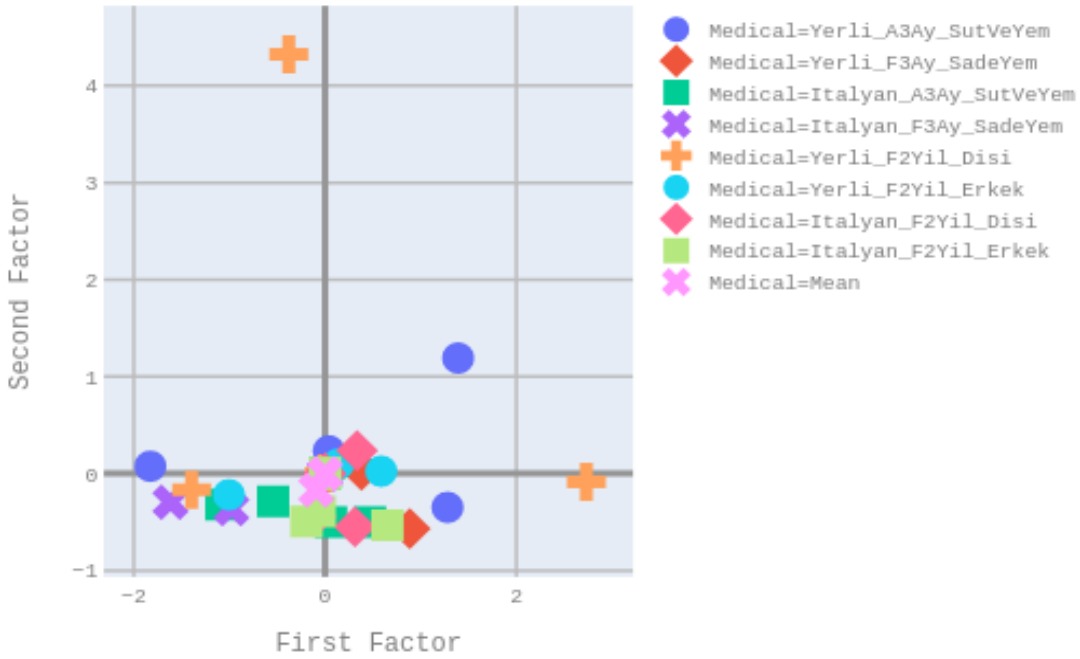
Tablo 4.1: Anadolu manda ve malak gruplarına ait Firmicutes/Bacteroidetes oranları.

		F/B
Yerli, < 3 Ay, süt+yem	BC01	2,65
	BC02	
	BC03	
	BC04	
Yerli, > 3 Ay, yem	BC05	2,99
	BC06	
Yerli, > 2 Yaş, Dişi	BC13	2,95
	BC14	
	BC15	
Yerli, > 2 Yaş, Erkek	BC16	2,33
	BC17	
	BC18	

Tablo 4.2: İtalyan manda ve malaklarına ait Firmicutes/Bacteroidetes oranları.

		F/B
İtalyan, < 3 Ay, süt+yem	BC07	2,16
	BC08	
	BC09	
	BC10	
İtalyan, > 3 Ay, yem	BC11	1,57
	BC12	
İtalyan, > 2 Yaş, Dişi	BC19	2,54
	BC20	
	BC21	
İtalyan, > 2 Yaş, Erkek	BC22	2,47
	BC23	
	BC24	

Grupların Firmicutes/Bacteroidetes faktörlerine göre dağılımı Şekil 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.4: Grupların şube seviyesinde 'Firmicutes/Bacteroidetes' faktörlerine göre analizleri.

Anadolu ve İtalyan mandanlarında görülen Proteobacteria oranları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4.'de sırasıyla verildi. Buna göre Anadolu ırkı, 3 aylıktan büyük malaklarda, bu oran belirgin olarak düşük (%1,82), 2 yaşından büyük, dişi Anadolu mandalarında ise belirgin olarak yüksek oran (%9,27) gözlemlendi. İtalyan ırkı manda ve malaklarda ise belirgin bir farklılık göze çarpmamasına rağmen İtalyan Akdeniz ırkı mandalar arasında 2 yaş üstü dişilerde (Grup 19, 20, 21) %1,6 oranı en yüksek oran olarak saptandı.

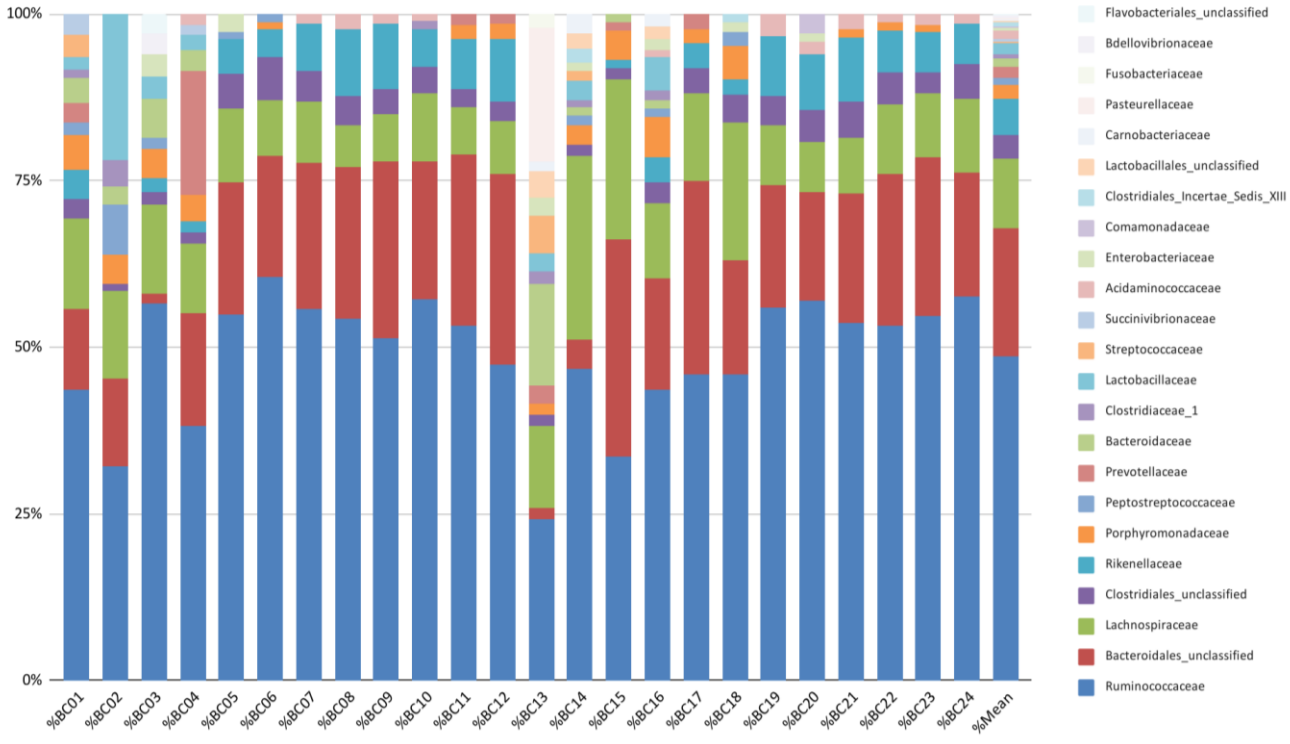
Tablo 4.3: Anadolu malak ve mandalarında görülen Proteobacteria oranları.

		Proteobacteria %
Yerli, < 3 Ay, süt+yem	BC01	4,42
	BC02	
	BC03	
	BC04	
Yerli, > 3 Ay, yem	BC05	1,82
	BC06	
Yerli, > 2 Yaş, Dişi	BC13	9,27
	BC14	
	BC15	
Yerli, > 2 Yaş, Erkek	BC16	2,58
	BC17	
	BC18	

Tablo 4.4: İtalyan Akdeniz malak ve mandalarında görülen Proteobacteria oranları.

		Proteobacteria %
İtalyan, < 3 Ay, süt+yem	BC07	0,66
	BC08	
	BC09	
	BC10	
İtalyan, > 3 Ay, yem	BC11	0,41
	BC12	
İtalyan, > 2 Yaş, Dişi	BC19	1,6
	BC20	
	BC21	
İtalyan, > 2 Yaş, Erkek	BC22	0,29
	BC23	
	BC24	

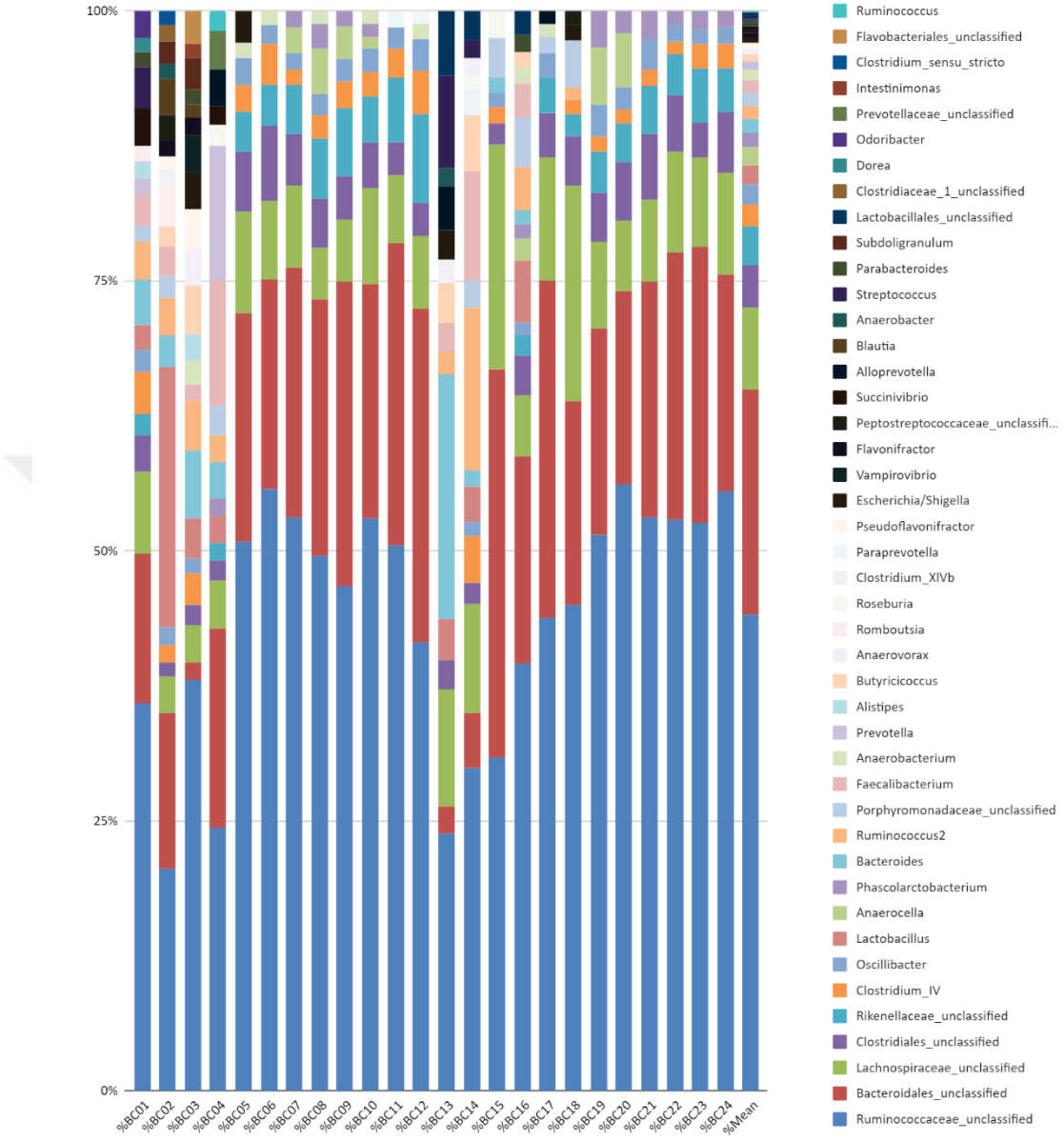
Sonuçlar aile bazında değerlendirildiğinde Ruminococcacea ailesi en yüksek %57,9 oranında 6. grupta (6 aylık Anadolu malakları), en düşük %22,9 oranında 13. grupta (6-7 yaşlı Anadolu dişi mandalar) bulundu. Ortalama %47,84 oranında en baskın aile olarak saptandı (Şekil 4.5). Diğer gruplardan farklı olarak 13. grupta Pasteurellacae ailesi göreceli olarak yüksek oranda (%18,9) bulundu.



Şekil 4.5: Tespit edilen ailelerin gruplara göre yüzde dağılımları ve ortalamaları.

Gruplardaki cins dağılımına bakıldığında 2. grup (2 aylık Anadolu mlakları) dışındaki tüm gruplarda baskın görülen *Ruminococcaceae_unclassified* cinsi en yüksek oranda 6. grupta (6 aylık Anadolu malakları) %49,9, en düşük oranda 13. grupta (6-7 yaşlı Anadolu dişi mandalar) %15 idi. Ortalama % 39,6 oranında görüldü. 2. grupta ise *Lactobacillus* cinsi dominant cins (%20,4) olarak bulundu (Şekil 4.6). İmmun sistemle ilgisi olduğu düşünülen *Bifidobacterium* cinsinin ise çekirdek mikrobiyotada yer almadığı tespit edildi.

Anadolu ve İtalyan Akdeniz ırkı, süt veren hayvanların dışkı numunelerindeki süt kalitesinde etkili olduğu düşünülen ancak çekirdek mikrobiyotada yer almayan (%1'in altında) cinslerin bulunma oranı Tablo 4.5'te verildi.



Şekil 4.6: Tespit edilen cinslerin gruplara göre yüzde dağılımları.

Tablo 4.5: Süt kalitesinde etkili olduğu düşünülen cinslerin bulunma oranı.

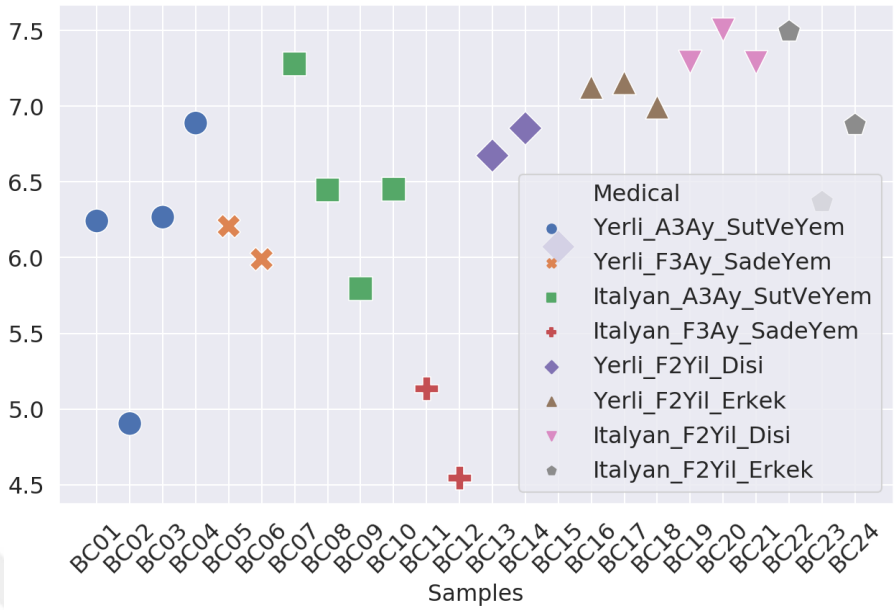
	BC 13 (%)	**BC 14 (%)**	**BC 15 (%)**	**BC 19 (%)**	**BC 20(%)**	**BC 21 (%)**
Dorea	0,317259	0,963785	0,124952	0,141941	0,045796	0,124987
Sutterella	0,348985	0,029206	0,11952	0	0	0
Parasutterella	0	0	0	0,005257	0	0

Gruplarda tespit edilen baskın şube, aile ve cinsler tablo 4.6' da gösterildi.

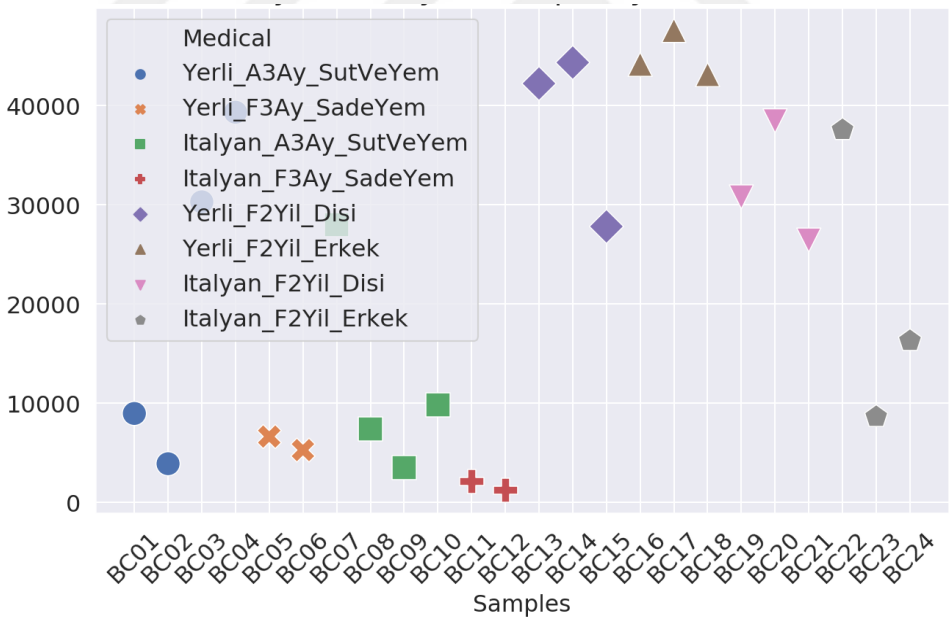
Tablo 4.6: Gruplarda görülen baskın şube, aile ve cinsler.

Grup no	Gruplar		Baskın şube	Baskın Aile	Baskın Cins
1	Anadolu Malakları	3 ve 3 aydan küçük	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
2			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Lactobacillus*
3			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
4			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
5		3 aydan büyük	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
6			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
7	İtalyan Akdeniz Malakları	3 ve 3 aydan küçük	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
8			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
9			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
10			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
11		3 aydan büyük	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
12			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
13	Anadolu Mandaları	Dişi	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
14			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
15			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
16		Erkek	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
17			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
18			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
19	İtalyan Akdeniz Mandaları	Dişi	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
20			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
21			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
22		Erkek	Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
23			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*
24			Firmicutes	Ruminococcaceace	*Ruminococcaceae_unclassified*

Grupların sahip olduğu zenginlik ve düzgünlük durumları için Shannon ve Chao grafikleri değerlendirildi. Shannon grafiğine göre, 20. grubun diğer gruplara göre daha zengin olduğu, 2. grup (2 aylık, süt ve yem ile beslenen Anadolu malakları) ve 12. grup (ortalama 5 aylık sadece yem ile beslenen İtalyan malakları) diğer gruplara göre daha az zenginliğe sahip olduğu saptandı. Chao grafiğine göre 2. grup, 9. grup (2 aylık süt ve yem ile beslenen İtalyan malakları) ve 12. grubun diğerlerinden daha düzenli bir dağılıma sahip olduğu tespit edildi. (Şekil 4.7, 4.8).



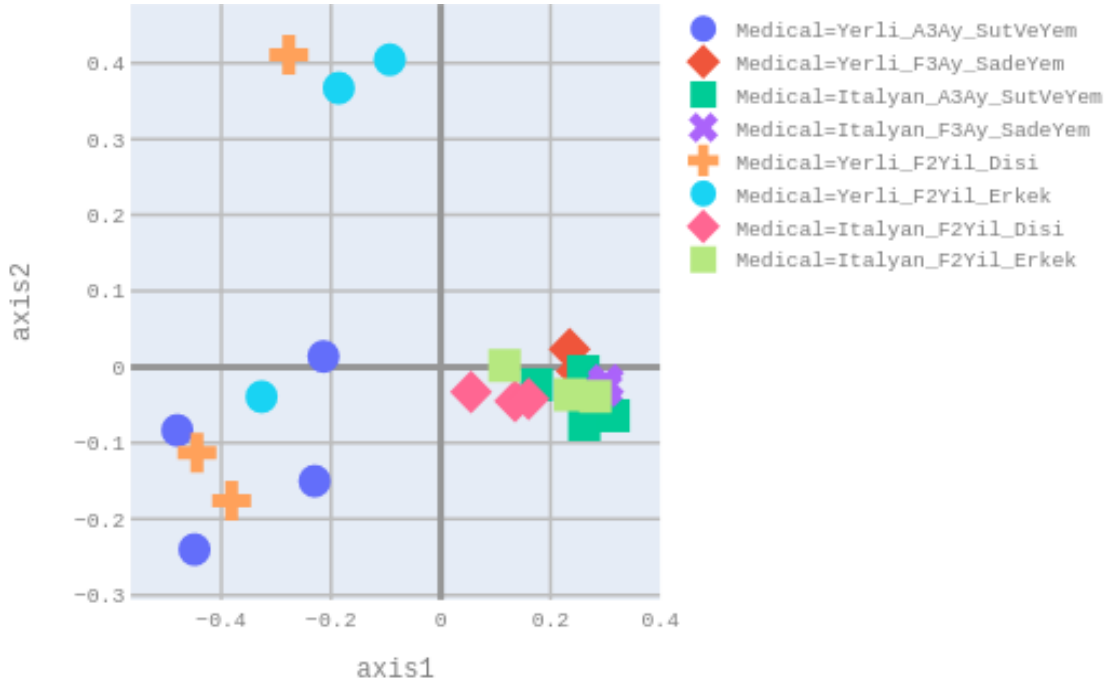
Şekil 4.7: Shannon çeşitlilik indeksine göre örnekler ve sağlık durumları.



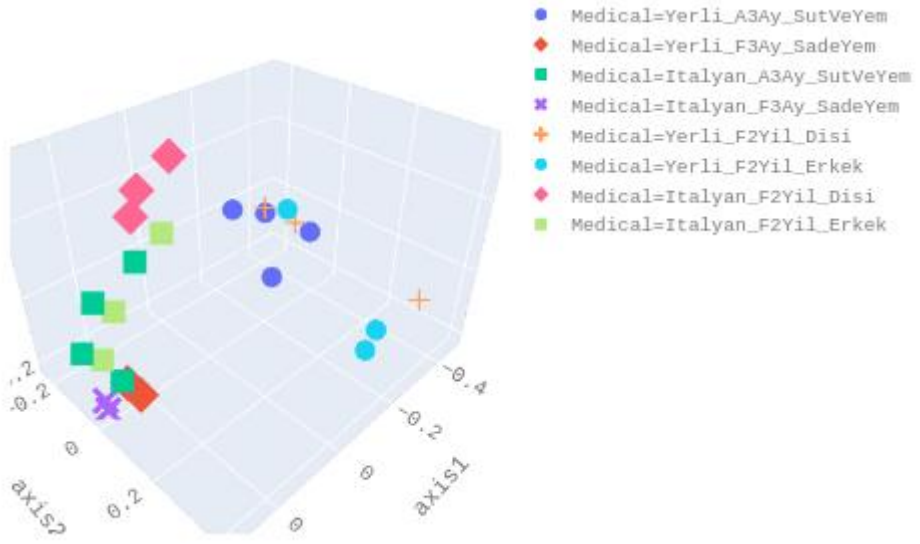
Şekil 4.8: Chao çeşitlilik indeksine göre örnekler ve sağlık durumları.

Örneklere ait Beta çeşitliliğini gösteren 2 ve 3 boyutlu Bray-Curtis Analiz grafiği sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterildi. Bu grafiğe göre İtalyan Akdeniz ırkı olan hayvanların yaş ve cinsiyet fark etmeksizin benzer kolonizasyona sahip olduğu görüldü. Anadolu ırkına ait 3 aydan büyük malaklar ise İtalyan Akdeniz ırkı hayvanlarla benzer kolonizasyona sahip

olduğu görüldü. Anadolu ırkı malaklarının birbirlerinden uzak kümelenme tespit edildi. Sadece yemle beslenen Anadolu malakları İtalyan Akdeniz ırkı malaklarla benzer mikrobiyota kolonizasyonuna sahip olduğu saptandı.



Şekil 4.9: Beta çeşitliliği, Bray-Curtis, 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği.



Şekil 4.10: Beta çeşitliliği, Bray-Curtis, 3 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği.

Örneklere ait 2 ve 3 boyutlu PCA grafikleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Üç boyutlu Temel Komponent Analiz grafiği farklı açılardan incelendiğinde; İtalyan Akdeniz ırkı ve 2 yaşından büyük dişi mandaları içeren 19, 20 ve 21 numaralı grupların kümelenmeleri yakınlık gösterse de aralarında farklılıklar olduğu gözlendi. 19 ve 20. gruptaki (2,5 yaş) hayvanlar benzer yaş grubunda bulunmalarına rağmen 19. grubun (gebe grup) 20. gruptan oldukça uzakta kümelendiği görüldü. 20. ve 21. grup (5-7 yaş) ise nispeten yakın olarak kümelendiği görüldü.

İtalyan Akdeniz ırkı ve 2 yaşından büyük erkek mandaların bulunduğu 22, 23 ve 24 numaralı grupların kümelenmeleri karşılaştırıldığında 23 ve 24. grubun kümelenmeleri birbirine yakın bulundu. 22. grup ise onlardan daha farklı kümelenmiş olduğu görüldü.

2 ve 2 yaşından büyük erkek Anadolu mandalarının bulunduğu 16, 17 ve 18. gruplar karşılaştırıldığında 16 ve 18. gruplar birbirlerine yakın olduğu, 17. grubun daha uzak olarak kümelendiği görüldü.

2 ve 2 yaşından büyük dişi Anadolu mandalarının bulunduğu 13,14 ve 15. gruplar karşılaştırıldığında 13. grubun (6-7 yaş) diğer iki gruptan çok farklı kümelendiği görüldü.

Üç aydan büyük, sadece yem ile beslenen İtalyan Akdeniz malaklarını içeren iki grup 11 ve grup 12'nin birbiriyle uzak olarak kümelendiği görüldü.

Üç aydan küçük, henüz anne sütünden kesilmemiş İtalyan Akdeniz malaklarından oluşan 7, 8, 9, 10 numaralı grupların birbirinden farklı kümelendiği gözlendi.

Üç aydan büyük, sadece yem ile beslenen Anadolu malaklarının oluşturduğu 5 ve 6. grup arasında benzerliğin az olduğu gözlemlendi.

Üç aydan küçük, henüz anne sütünden kesilmemiş Anadolu malaklarının oluşturduğu 1, 2, 3, 4. gruplardan ise 1 ve 4 'ün birbirine benzerlik gösterdiği, 3 ve 4'ün ise birbirlerinden ve diğer iki gruptan uzakta kümelenerek benzerlik göstermediği görüldü.

Irklara Göre

Gruplar, benzer yaş grubunda ve aynı cinsiyetteki hayvanlar göz önüne alınarak, ırklarına göre kıyaslandı. 2 yaşından büyük dişi Anadolu (Grup 13, 14, 15) ve İtalyan Akdeniz (Grup 19, 20, 21) mandaları arasında yakınlık saptanmadı. Aynı şekilde 2 yaşından büyük erkek

Anadolu (Grup 16, 17, 18) ve İtalyan Akdeniz (Grup 22, 23, 24) mandaları arasında da yakınlık görülmedi.

Benzer yaş grubundaki ve beslenme şekli aynı olan malaklar ırklarına göre kıyaslandı. 3 aydan büyük ve sadece yem ile beslenen Anadolu (Grup 5, 6) ve İtalyan Akdeniz (Grup 11, 12) malaklarının dışkı örneklerinin birbirlerinden uzak şekilde kümelendiği ve benzerlik göstermediği saptandı. 3 aylıktan küçük hem anne sütü hem de yem ile beslenen Anadolu (Grup 1, 2, 3, 4) ve İtalyan Akdeniz (Grup 7, 8, 9, 10) malaklarının kümelenmelerinin birbirine yakın olduğu görüldü.

Cinsiyete Göre

Aynı ırka ait (Anadolu), 2 yaştan büyük mandalar cinsiyet bakımından kıyaslandığında, dişi (Grup 13, 14, 15) ve erkeklerin (Grup 16,17, 18) fekal mikrobiyota kolonizasyonlarının benzerlik göstermediği görüldü.

Aynı şekilde 2 yaşından büyük İtalyan Akdeniz ırkına ait 20 ve 21 numaralı dişi mandaların ve erkek mandaların fekal kolonizasyonu farklılık gösterirken 19 numaralı, gebe hayvanları temsil eden grubun erkek hayvanların kolonizasyonu ile benzerlik gösterdiği görüldü.

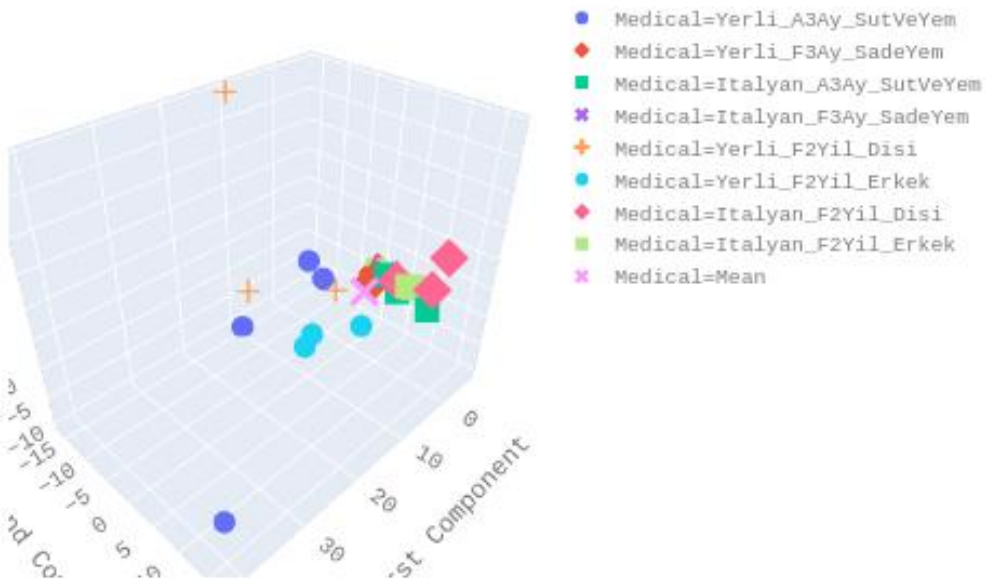
Yaşa Göre

Aynı ırklara ait 3 aydan küçük ve 3 aydan büyük malaklar karşılaştırıldı. İtalyan Akdeniz ırkına ait gruplar karşılaştırıldığında mikrobiyal kolonizasyonun birbirine benzer olduğu görüldü. Anadolu malakları da yaş grubuna göre karşılaştırıldığında aynı şekilde benzer kümeleşme söz konusu olduğu gözlendi.

19 ve 20. gruplarda İtalyan Akdeniz ırkı dişi mandalar 2,5 yaşında olup mikrobiyal kolonizasyon yakınlık göstermekte iken, 21. grup dişiler ise 5 yaşın üstünde olduğundan 19 ve 20. gruplara yakınlık göstermedi.

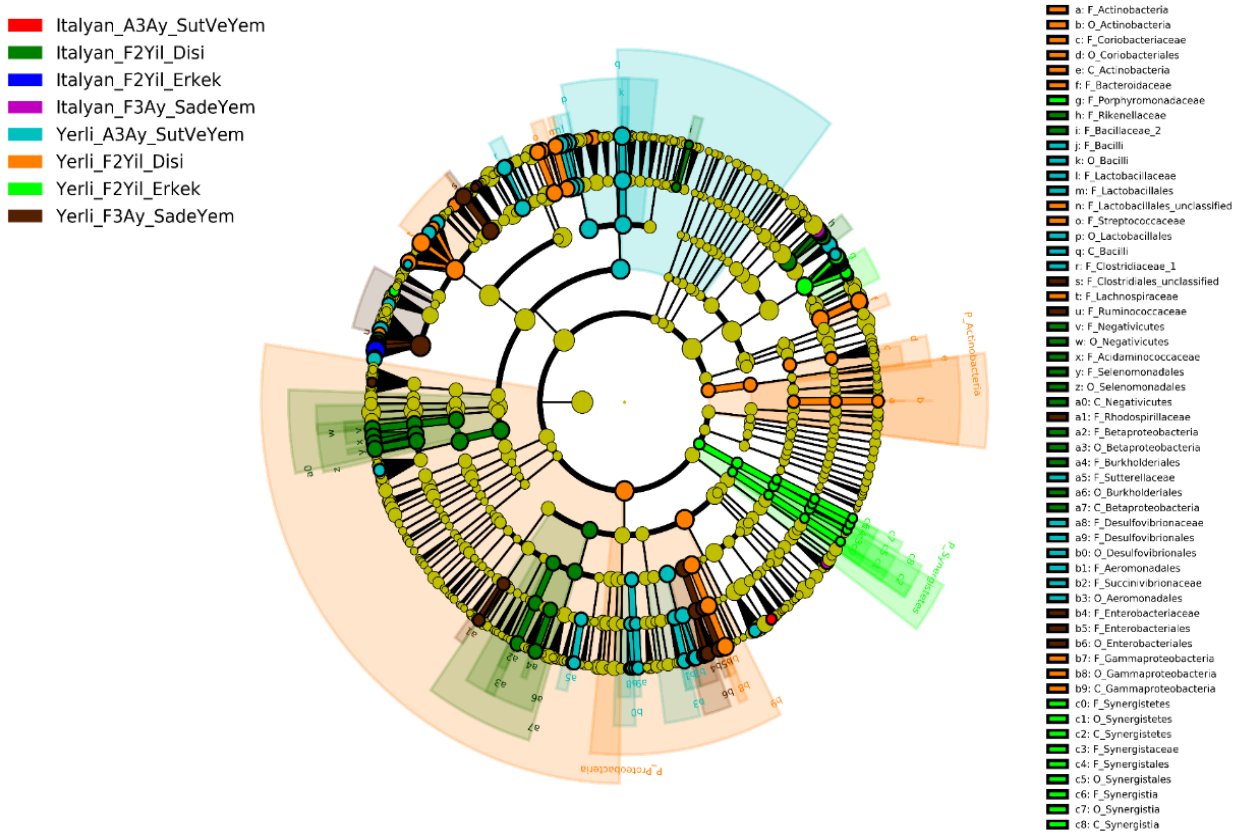
22, 23 ve 24. gruplar 2 yaş üstü İtalyan Akdeniz erkek mandaları temsil etmektedir. 22 numaralı grup 3 yaşındaki, 23 ve 24. grup ise 4 yaşındaki erkek mandaları içermekte olup 23 ve 24. grup birbirine yakınlık gösterirken, 22. grup ise onlardan uzak olarak görüldü. 2 yaş üstü erkek Anadolu mandalarından 17. ve 18. gruplar yakın, 16 uzak kümelendi.15. grup dişiler ise 2,5 yaş ortalama olduğundan 13. ve 14. gruplara yakınlık göstermedi.

Şekil 4.11: Örneklerin 2 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.



Şekil 4.12: Örneklerin 3 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.

Örneklerin mikrobiyotasında bulunan bakterilerin filogentik yakınlığını gösteren kladogram grafiği Şekil 4.13'te verildiği gibidir.



Şekil 4.13: Örneklere ait kladogram grafiği.

5. TARTIŞMA

İnsan mikrobiyom projesi ile başlayan mikrobiyota ve mikrobiyom çalışmaları son yıllarda daha dikkat çekici hale gelmiştir. Bunun nedeni özellikle bağırsak mikrobiyotasının vücuttaki çeşitli sistemlerle ve bunlarla ilgili hastalıklarla kuvvetli bağlantılarının olduğunun ortaya konmasıdır (Turnbaugh ve diğ., 2007). Bağırsak mikrobiyotası sindirim sistemi ve immun sistem başta olmak üzere, kardiyovasküler sistem, hormonal sistem, solunum sistemi, sinir sistemi ve hemostaz ile yakından ilişkilidir (Luczynski ve diğ., 2016). Aynı zamanda vücuttaki fizyolojik olayların karbonhidrat, yağ metabolizmalarının düzenlenmesinde önemli rol üstlendiği için obezite ve diyabet gibi hastalıklarda da bağırsaktaki mikrobiyal yükün etkileri görülmektedir (Bleich ve Fox, 2015; Liu, 2016). Mikrobiyota hastalıkların patogeneziniyle ilgili fikir verirken aynı zamanda sağaltımları ile ilgili de yardımcı olmaktadır (Amon and Sanderson, 2017). Tüm bu özellikleri nedeniyle en az bir beyin kadar vücudun yönetilmesini ve dengede tutulmasını sağladığı için ikinci beyin olarak anılmaktadır (Hong ve diğ., 2021).

Hayvanlarda da insanlarda olduğu gibi yaşamsal faaliyetleri düzenlediği ve hayvanların verim özelliklerini etkilediği için veteriner hekimlik alanında da merak uyandırmış ve özellikle verimlerinden yararlanılan hayvan türlerinin bağırsak mikrobiyotalarının açıklığa kavuşturulması ile ilgili çalışmalar artmaya başlamıştır (Küllük ve Dalğın, 2021). Yapılan çalışmalarda daha çok tavuk ve sığır gastrointestinal sistemi yer almaktadır. En önemli hayvansal proteinlerin kaynaklarından biri olarak sayılabilecek mandalarda yapılan çalışmalar ise rumen ağırlıklı olup, mandaların intestinal mikrobiyotası ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Bakterilerin saptanması için en iyi bilinen yol kültür yöntemidir ancak mikrobiyota milyonlarca bakteri barındırmaktadır. Her bakterinin tek tek izole ve identifiye edilmesi için çok fazla iş gücü, malzeme, yer ve zaman gerekmektedir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Hem de bu bakterilerin içinde aerob bakteriler olduğu gibi anaerob bakteriler de yer almaktadır. Kültür yöntemi, bu nedenlerden dolayı tüm bakterilerin izolasyonunu oldukça sınırlandırmaktadır. Ayrıca mikrobiyotanın ortaya konması için izole edilen mikroorganizmaların sayısal değerleri de önemlidir, kültür yöntemi bunun için de elverişli bir yöntem değildir (Diker, 2017). Tüm bu sebeplerden ötürü DNA temelli yöntemler “Sanger” yöntemiyle beraber ortaya konmuş, zaman

ve maliyetten kazanmak için ikinci ve üçüncü nesil dizileme yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışması, kültür bağımlı yöntemlerin dezavantajlarından dolayı kültür bağımsız yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

Üçüncü nesil dizileme yöntemleri ikinci nesil dizileme yöntemlerinin aksine, parça parça okumalar yapmak yerine çok daha uzun zincirleri dizileyebilmekte ve bu okumalar sonucunda çok daha kapsamlı veriler sunulabilmektedir. Elde edilen veriler ise daha az hata payı içermektedir (Lee ve diğ., 2016). Ayrıca diğer yöntemlere göre nispeten daha az maliyetlidir ve dizileme öncesinde her zaman bir ön çalışmaya gerek duyulmayabilir. İş gücü bakımından da uygulaması göreceli olarak kolay ve pratiktir. Aynı zamanda kullanılan cihazın küçük ve taşınabilir olması da üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden biri olan Oxford Nanopore Teknolojisi'ni avantajlı kılan özelliklerdendir (Jain ve diğ., 2016). Bu tez çalışmasında, üçüncü nesil dizileme yöntemlerinin ortaya çıkmasına vesile olan Oxford Nanopore MinION cihazı ile dizileme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

OTU, dizi benzerliğine göre bakterileri sınıflandırmak için kullanılmaktadır. 16S metagenomik yaklaşımlarında, OTU'lar, 16S rRNA işaretleyici gen dizisinin benzer dizi varyantlarının kümesidir. Bu kümelerin her biri, dizi benzerlik eşiğine bağlı olarak bir bakteri türü veya cinsinin taksonomik bir birimini temsil etmeye yöneliktir. Tipik olarak, OTU kümesi, bakterileri cins düzeyinde ayırt etmek için 16S gen dizilerinin %97 özdeşlik eşiği ile tanımlanmıştır (Müller ve Nebel, 2021). Bu çalışmada yapılan okumalar sonucunda başta OTU sayıları olmak üzere çok detaylı veriler elde edilmiştir. Mandaların bağırsak mikrobiyotası ile ilgili mikrobiyal olarak kaç farklı birim tespit edilebileceği sorusuna çalışmamızda OTU sayısının belirlenmesi ile cevap aranmıştır.

Birçok çalışmada yaşlanmayla birlikte bağırsak mikrobiyal çeşitliliğinin azaldığı bildirilmiştir (Agranyoni ve diğ., 2020; Jain, 2020; Leite ve diğ., 2021; Reemst ve diğ., 2021). Bu tez çalışmasında OTU sayıları, malaklarda mandalara göre yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek OTU sayısı 10 günlükten 2 haftalığa kadar olan Anadolu malaklarında (1. grup) görülürken, en düşük OTU sayısı 2,5 yaşlı gebe İtalyan Akdeniz mandalarında (19. grup) saptanmıştır. Toplam cins sayıları da en yüksek 10 günlükten 2 haftalığa kadar olan Anadolu malaklarında (1. grup), en düşük 2,5 yaşlı gebe İtalyan Akdeniz mandalarında (19. grup) saptanmıştır. Çalışmamızda yerli ve İtalyan Akdeniz ırkı mandalardan oluşan örnek grupları iki farklı yaş grubu olarak değerlendirilmiştir. Bir yaşından küçük malaklar ve yetişkin mandalar

olarak değerlendirilen bu iki grupta mandalarda OTU sayılarının malaklara göre daha az sayıda saptanması; yaşlandıkça mikrobiyotada gözlenen çeşitliliğin azalmasına uygun olarak değerlendirilmiştir. Bu farklılıkların, konakçının fizyolojik durumu ve bağışıklık durumu ile ilgili bireysellikler, bağırsakta simbiyotik bakteriler ile konak epiteli arasındaki etkileşimler, pH, oksijen gradyanı, besin profili ve diyet geçiş oranlarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Amin ve Seifert, 2021).

Yapılan çalışmalarda, ruminantlarda gerçekleştirilen intestinal mikrobiyota çalışmalarında baskın şubenin Firmicutes (%81) olduğu görülmektedir. Bu şubeyi %18-33 baskınlıkla Bacteroidetes'in takip ettiği ve Spiroketler, Tenericutes, Actinobacteria, ise diğer hakim şubeler olarak belirlendiği bildirilmiştir (Myer ve diğ., 2015; 2017; Durso ve diğ., 2017). Çin'de gerçekleştirilen bir çalışmada şube düzeyinde Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes ve Proteobacteria (toplam dizi sayısının %95.38'i) manda bağırsak mikrobiyotasına hakim şubeler olarak bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2017).

Bu tez çalışmasında da baskın şube olarak %68,3 oranında Firmicutes şubesi belirlenmiştir. Onu takiben Bacteroidetes (%29,45), Proteobacteria (%1,88) olarak saptanmıştır. Fusobacteria (%0,88) şubesi ise sadece 13. grupta (6-7 yaş dişi Anadolu mandaları) saptanmıştır. Tüm yaş gruplarındaki çekirdek mikrobiyota (yani, tüm deneklerde bulunan mikrobiyomun en yaygın mikrobiyal bileşenleri), toplam bakteri bolluğunun %68,3 oranında Firmicutes filumunun baskınlığı ile karakterize edilmiştir. Tenericutes şubesinin ise bulunma oranı %1' den düşük olduğundan çekirdek mikrobiyota olarak değerlendirilmemiştir.

Firmicutesler, alınan gıdadan enerji elde etmede görevli olduğu ve Bacteroideteslere göre çok daha etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda Firmicuteslerin kalori ve kilo alımında, yağ depolanmasında etkili olduğu bilinmekte bu nedenle obezite ve diyabetle ilişkilendirilmektedir (Magne ve diğ., 2020). Proteobacterialar ise sağlıklı bağırsakta düşük oranda görülürken infeksiyon durumlarında arttığı bilinmektedir. Hatta mikrobiyal disbiyozunun imzası olarak görülmektedir (Shin ve diğ., 2015).

Çelişkili sonuçlar olmasına rağmen, hayvan ve insan çalışmalarında vücut ağırlığındaki değişiklikler Firmicutes ve Bacteroidetes oranlarındaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Ley ve diğ., 2005; 2008). Kadınlarda, normal kilolu deneklerdeki seviyelere göre fazla kilolu ve obez deneklerde daha düşük alfa çeşitlilik indeksleri ve daha düşük bir Bacteroidetes bolluğu

gözlenmiştir. Bacteroides bolluğu kadınlarda değişmezken, beden kitle indeksi (BMI)'nin artmasıyla erkeklerde azaldığı görülmüştür (Ley ve diğ., 2005).

Bu çalışmada F/B oranı Anadolu malaklarında İtalyan Akdeniz mandalarına göre daha yüksek bulunmuştur. Yetişkin mandalara bakıldığında cinsiyet faktörünün de etkili olduğu görülmüş, her iki ırkta da dişilerde F/B oranının yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre ırka bağlı genetik faktörlerin ve cinsiyetin etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, Anadolu malak ve mandalarında Proteobacteria oranın, İtalyan Akdeniz ırkı malak ve mandalarında göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu da Anadolu malak ve mandalarının instestinal disbiyozise daha meyilli olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca 2 yaşından büyük dişi Anadolu mandalarında Proteobacteria oranının (%9,27) en yüksek olduğu belirlenmiştir.

Fusobacterialar insanlarda İnfeksiyöz bağısak hastalığı (IBD) ve kolorektal kanser ile ilişkilendirilmekte ve etobur konakçılarda genelde daha yüksek oranda görülmektedir (Moon ve diğ., 2018). Fusobakteriler, diğer bağırsak mikrobiyotası, bariyer fonksiyonları ve konakçı tepkileri arasındaki etkileşim hakkında bilgi sağlamaktadır. Fusobakterilerin sayısal artışı ile, bağırsak kanserleri insidensi arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Kelly ve diğ., 2018).

Çin'de yapılan bir çalışmada, bağırsak mikrobiyotasının α-çeşitliliği, sadece kadınlarda düşük beden kitle indeksi (BMI) grubunda diğer BMI gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Obez erkeklerde Fusobacteria'nın nispi bolluğu daha yüksek iken, Actinobacteria obez kadınlarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Gao ve diğ., 2018). Cins düzeyinde, obez kadınlarda Bifidobacterium' ait cinslerin, *Coprococcus* ve *Dialister* bolluğu daha yüksek ve *Phascolarctobacterium* bolluğu daha düşük iken, obez erkeklerde Fusobacterium'a ait cinslerin bolluğu daha yüksekti. Toplam vücut yağ içeriği, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini ve bileşimini etkileyeceği düşünülmektedir (Gao ve diğ., 2018; Mestdagh ve diğ., 2012). Adipoz doku, özellikle postmenopozal kadınlarda androjenlerin östrojenlere aromatizasyonu yoluyla ekstraglandüler östrojen sentezinin ana bölgesidir (Szymczak ve diğ., 1998). Bu nedenle, cinsiyete özgü bir bağırsak mikrobiyota bileşiminin oluşturulmasında ek bir rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Fusobacteria'lar ruminantlarda ise, rumenin mikrobiyotasında doğal olarak bulunan fırsatçı bir şubedir. Yani rumen mikrobiyotasının dengesi bozulduğunda sayıca artarak asidozise, karaciğer apselerine neden olabilmektedir (Nagaraja ve diğ., 2005). Smith ve Thornton (1993) yaptıkları bir çalışmada ise ruminantlarda *Fusobacterium necrophorum*

kaynaklı ayak hastalıkları ile gastrointestinal sistemdeki Fusobacterium artışının ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında Anadolu ırkı 6-7 yaşlı dişi mandalar grubunda, diğer gruplardan farklı olarak Fusobacterium şubesi saptanmıştır ve %1,93 oranında bulunmuştur. Bunun artan asidoz ve ayak hastalıkları riskini yükseltebileceği düşünülmüştür.

Jami ve diğ., (2013), gastrointestinal sistemdeki Firmicutes ve Bacteriodes oranı ile sütteki yağ oranı arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Firmicutes artışı veya Bacteroides azalması sütteki yağ konsatrasyonunu artırmaktadır. Buna göre, bu tez çalışmasında süt veren Anadolu mandalarının F/B oranının İtalyan Akdeniz mandalarından yüksek olması manda sütündeki yağ oranının daha yüksek olabileceğini akla getirmektedir. Bu bulgu, Zhang ve arkadaşlarının (2017) bulgularıyla da tutarlı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında tüm gruplarda baskın aile olarak Ruminococcacea (%57,9) bulunmuştur. Diğer gruplardan farklı olarak 6-7 yaşlı dişi Anadolu mandalarında (13. Grup) Pasteurellacae ailesi göreceli olarak yüksek oranda görülmüştür. Bunun ırk genetiği, yaş ve cinsiyet ile alakalı olabileceği düşünülmüştür. Kuzularda gerçekleştirilen bir çalışmada ise mikrobiyal kolonizasyon farklılığının beslenme ile ilişkili olabileceği de vurgulanmıştır (Yang ve diğ., 2018).

Bu tez çalışmasında baskın cins *Ruminococcaceae_unclassified* bulunurken, onu takiben *Bacteroides_unclassified* ve *Lachnospiraceae_unclassified* cinslerinin takip ettiği saptandı. Ancak sadece 2. grupta (süt ve yem ile beslenen 2 aylık Anadolu malakları) baskın cins olarak *Lactobacillus* cinsi gözlenmiştir. Sığırlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, süt tüketen buzağılar için beklendiği gibi buzağı fekal mikrobiyotasında *Bifidobacterium* ve özellikle *Lactobacillus* cinslerinin bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Alipour ve diğ., 2018). Ancak çalışmamızda *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinslerinin mukozal immun yanıtla ilişkili olması ve diğer gruplarda belirgin olarak görülmemesi çalışma gruplarındaki genç hayvanlarda bağışıklık için bir yönüyle eksiklik olabileceğini düşündürmüştür.

Otçulların gastrointestinal sistemi, bitki biyokütlesinin mikrobiyal bağlanması ve sindirimi için karmaşık lignoselülozik bozunma sistemini barındıran çeşitli mikroorganizmaların varlığı ile işlev görmektedir (He ve diğ., 2015). Bu mikroorganizmalara örnek olarak, çok çeşitli, yokluğu durumunda sindirilemeyen bitki polisakkaritlerini (örneğin, amiloz, amilopektin ve pullulan) sindiren *Bacteroides* spp. verilebilmektedir (Xu ve diğ., 2003). Ek olarak, Lachnospiraceae ailesinin bir üyesi olan *Lachnospira* spp., lif bozunması ile ilgili

sindirimde işlevi olan bir bakteri cinsi olduğu bildirilmiştir (Peng ve diğ., 2015). Bitki ve hayvan kaynaklı diyetlerin mikrobiyota üzerindeki etkilerini karşılaştıran önceki bir çalışmada, *Lachnospira* spp. ve *Bacteroides* türlerinin bitki polisakkarit bozulmasında bu şekilde görevleri olduğu bilinen rolleri ile tutarlı olarak, bitkiden türetilen lif açısından zengin diyetlerin varlığında mikrobiyotada zenginleşmiş olduğu düşünülmüştür (He ve diğ., 2015). Ruminokoklar ise otçulların bağırsaklarında bulunan en önemli selülozu parçalayan bakteriler olarak kabul edilirler ve ekzoglukanazlar, endoglukanazlar, glukozidazlar ve hemiselülazlar dahil olmak üzere büyük miktarlarda selülolitik enzimler üretirler (Singh ve diğ., 2014). Bu nedenle, bu tez çalışmasında manda bağırsak mikrobiyotasında Lachnospiraceae, *Bacteroides* ve *Ruminococcus* gibi bazı taksonların yüksek tespitinin, öncelikle sindirim fonksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Mandalar, ineklerden sonra dünyanın en büyük ikinci süt kaynağıdır. Manda sütü, inek sütüne kıyasla daha yüksek katı madde içeriğine sahiptir. Bununla birlikte, manda sütü inek sütüne göre daha zengin bir yağ, protein, laktoz ve mineral kaynağıdır, bu nedenle insanlar için de daha besleyici olarak kabul edilmektedir (El-Salam ve diğ., 2011; Park ve Haenlein, 2013 pp: 519-553).

Bağırsak mikrobiyotası, besinlerin sindiriminde, konak yağ depolanmasının düzenlenmesinde, bağırsak epitelinin yenilenmesinin uyarılmasında ve bağışıklık sisteminin olgunlaşmasının yönlendirilmesinde önemli roller oynar (Andersson ve diğ., 2008; Cho ve Blaser, M. J., 2012). Ayrıca, fekal mikrobiyomun meme ve süt bezleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Jiménez ve diğ., 2008; Williams ve diğ., 2020). Daha önce inekler ile mandaların süt kompozisyonunda görülen farklılıklarının altında yatan mekanizmaları ortaya koymak için gerçekleştirilen çalışmalarda; aminoasitler valin, lösin, izolösin, pantotenat ve CoA biyosentezi, biyotin metabolizmasının biyosentez yolları ile fekal mikrobiyotada bulunan *Parabacteroides, Dorea, Sutterella* ve *Parasutterella* cinslerinin pozitif olarak ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Doğal olarak süt yağı ile lipopolisakkarit biyosentezi, amino asit biyosentezi, valin, lösin ve izolösin biyosentezi yolu arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2017). Tez çalışmamızda, çekirdek mikrobiyotada olmamasına rağmen (%1'in altında) *Sutterella* ve *Dorea* cinsleri süt veren Anadolu mandalarında, İtalyan ırkı mandalara göre daha fazla olduğu saptanmıştır. *Parasutterella* cinsi ise her iki ırka ait süt veren hayvanlarda saptanmadı.

Bu tez çalışmasında; benzerliklerin ortaya konulmasında tek bir örnekten mikrobiyota dağılımının ortaya konması için alfa dağılımı; Shannon çeşitlilik indeksi kullanılarak, örnekler arasında mikrobiyal toplulukların değişiminin ortaya konulması ise beta dağılımı Bray-curtis analizi ile incelenmiştir.

Shannon ve Chao çeşitlilik indeksleri, metagenom analizlerinde sekans kümelerinin arasında zenginliği ve çeşitliliği birleştiren bir analiz yöntemidir. Hem tür sayısını hem de tür bolluğu arasındaki eşitsizliği ölçmektedir. İyi dengelenmiş bolluklara sahip birçok türün varlığı büyük bir değer verir. Değerler, bir (tek bir baskın tür olması durumunda) ile tüm türlerin toplam sayısı (tüm türlerin eşit bolluğa sahip olması durumunda) arasında değişebilmektedir. Bu tez çalışmasında Shannon grafiğine göre, 20. grubun diğer gruplara göre daha zengin olduğu, 2. grup (2 aylık, süt ve yem ile beslenen Anadolu malakları) ve 12. grup (ortalama 5 aylık sadece yem ile beslenen İtalyan malakları) diğer gruplara göre daha az zenginliğe sahip olduğu saptanmıştır. Chao grafiğine göre 2. grup, 9. grup (2 aylık süt ve yem ile beslenen İtalyan malakları) ve 12. grubun diğerlerinden daha düzenli bir dağılıma sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bray-curtis farklılık analizi ise örnekler arasındaki bolluk ya da okuma sayısı verilerine dayalı bir beta çeşitliliği analizdir. Bu değerlendirme iki veya daha fazla sayıda numune arasındaki mikrobiyal bolluk farklılıklarını (ör. tür düzeyinde) ortaya koymaktadır. Sonuçta 0 ile 1 arasında bir değer vermekte; 0 değeri, her iki numunenin de aynı türü tam olarak aynı bollukta paylaştığı anlamına gelmektedir. 1 değeri ise, her iki numunenin de tamamen farklı tür bolluğuna sahip olduğu anlamına gelmektedir. Bu amaçla, bu tez çalışmasında PCA ve PCoA grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerde en göze çarpan sonuç gebe hayvanları temsil eden 19. grubun diğer gruplardan farklı olarak kümelenmiş olmasıdır. Gebelik konakçı vücudunda gelişen bu eşsiz fizyolojik durumun desteklenmesi ve devamlılığının sürdürülebilmesi için gerekli olan birçok immünolojik, metabolik ve hormonal değişikliği tetiklemektedir (Milani ve diğ., 2017; Susic ve diğ., 2020). Yapılan çalışmalarda gebelik sırasında intestinal mikrobiyom da alfa çeşitliliğinde (bir numune içerisinde gözlenen çeşitlilik) azalma; beta çeşitliliğinde (numuneler arası gözlenen çeşitlilik) artma ile karakterize bir değişim gözlendiği belirtilmiştir (Koren ve diğ., 2012; Nuriel-Ohayon ve diğ., 2016; Catalano ve Shankar, 2017). Deng ve ark (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada gebe olan ve olmayan ineklerde vajinal ve fekal mikrobiyota karşılaştırılmış; vajinal mikrobiyomun oldukça dengeli ve stabil olduğu ancak fekal mikrobiyotada çok bariz değişiklikler saptandığı bildirilmiştir. Bu bilgiler, bu tez çalışmasındaki gebe hayvan grubunda saptanan hem mikrobiyota kolonizasyonundaki bariz

farklılık ve OTU numarasındaki düşüklük literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca unutulmamalıdır ki bu çalışmada tüm bağırsağı temsil eden dışkı örnekleri kullanılmıştır ve kültürel olmayan metotlarla analizler gerçekleştirilmiştir. Bu açıdan güncel olan ve metodolojisi uyumlu çalışmalarla benzer sonuçların elde edilmesi gerçekçi olarak düşünülmüştür.

Ruminantlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada (Difford ve diğ., 2018) konak genetiğinin sadece erken yaşam bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu şekillendirmekle kalmayıp, aynı zamanda hayvanın sağlığı ve büyümesi ile daha fazla ilişkili olan sistemik bağışıklık üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, yenidoğan buzağıların mikrobiyotası üzerindeki konakçı genetik etkisinin rolünü ele alan çalışmalar hala sınırlıdır ve daha fazla araştırılması gerekmektedir. Fan ve diğ. (2020) tarafından Angus ve Brahman ırkı hayvanların fekal mikrobiyotası üzerinde yapılan çalışmada konak genetiğinin mikrop-mikrop etkileşimleri yoluyla bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu dolaylı olarak değiştirdiği gösterilmiştir.

Ruminantların mikrobiyom çalışmaları göstermektedir ki yaşam süreleri boyunca mikrobiyom kompozisyonunda önemli dalgalanmalar gerçekleşmektedir (Jami ve diğ., 2013; Furman ve diğ., 2020). Bu değişiklikler, bebeklik geçişlerinden (sütten kesme yaşı, sütten kesme stratejisi, doğum şekli ve süt besleme türü), çevresel faktörler ve konak genetiğinden etkilenmektedir (Clemmons ve diğ., 2019; Rinninella ve diğ., 2019). Bütün ruminantlarda olduğu gibi malaklar hayatlarının ilk bir yılında pseudo-monogastrik olarak tanımlanmaktadır. Süt alımı ilk günlerde retikulum rumen ve omazumu özefagial kanal ile baypas ederek abomazuma geçmektedir. Bu dönemde abomazum havyanlarda tek bir mide varmış gibi çalışmakta ve sindirim sisteminin devamı olan bağırsakların mikrobiyomu hayvanların ön mideleri sindirime katıldıkça ve ruminasyon geliştikçe değişime uğramaktadır (Amin ve Seifert, 2021). Süt ve katı yeme geçiş ile birlikte rumende fermantasyon aktivitesi başlamaktadır ve aynı zamanda malağın intestinal mikrobiyal bileşimini değiştirmektedir (Nicholson ve diğ., 2012). Erginlik ve yetişkinliğe geçişte hem mikrobiyom içerisinde bulunan baskın türler hem de mikrobiyom kompozisyonunun değişiminde tek olmasa da en önemli etkenin beslenme olduğu düşünülmektedir (Khalil ve diğ., 2022).

Yukarıda açıklanan sebeplerle; bu tez çalışmasında İtalyan Akdeniz ırkı ile Anadolu ırk malaklar arasında PCoA analizlerinde gözlenen uzaklık farklılığın genetik ve beslenme kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Mandaları içeren örnek grupları ise ırk ve cinsiyete göre değerlendirildiğinde; bu çalışmada dişi (grup 19, 20, 21) ve erkek (grup 22, 23, 24) İtalyan mandalarında ve dişi (grup 13,14,15) ve erkek (grup 16,17,18) yerli mandalarda grupları arasında gerçekleştirilen beta analizi sonuçlarında bildirilen farklılığın sebebinin biyolojik yaş, kronolojik yaş, bireysel olarak yaşlanma ile birlikte hayvanlarda gözlenen hastalık sayısında beklenen artış, olası kullanılan medikasyonlar, yem katkı maddesi varlığı ve yaş ile gelişen immun sistemin zayıflaması gibi etkenlere bağlı olduğu düşünülmüştür.

Bağırsak mikrobiyotasındaki cinsiyet farklılıkları esas olarak daha düşük taksonomik seviyede gözlemlenmiştir; bu nedenle mevcut kısa okumalı yeni nesil dizileme (NGS) tabanlı yöntemin cinsiyete bağlı bakterileri yakalamada sınırlamaları olabilmektedir (Sylvia ve diğ., 2017). Örneğin, aynı tür içindeki mikroorganizmalar farklı metabolitler üretebilmekte, dolayısıyla cinsiyet hormonları ile farklı şekilde etkileşime girebilmektedir. Bu nedenle, cinsiyet farklılıklarının bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerini yakalamak için 16S rRNA geninin tam uzunluğu veya tüm genom shotgun dizileme yaklaşımı ile bağırsak mikrobiyotası ve cinsiyet hormonları arasındaki yeni etkileşimleri ortaya çıkarılabilir.

Sonuç olarak, elde edilen verilere göre toplamda 489 OTU tespit edilmiştir. Gruplara göre OTU dağılımına bakıldığında en yüksek OTU sayısı 3 aydan küçük Anadolu malakları grubunu oluşturan 1.grupta 275 olarak tespit edilmiştir. En düşük OTU sayısı ise İtalyan Akdeniz ırkına ait 2 yaşından büyük gebe dişilerde 167 olarak gözlenmiştir. Gruplar şube bazında incelendiğinde tüm gruplarda baskın şube olan Firmicutes (%68,3)'i, Bacteriodetes (%29,4) ve Proteobacteria (%1,8)'nın izlediği saptanmıştır. Firmicutes/Bacteriodetes oranları incelendiğinde, Anadolu malakları arasından 3 aydan büyük olanların en yüksek orana (%2,99) sahip olduğu saptanmıştır. İtalyan Akdeniz ırkına ait 3 aydan büyük malaklarda ise en düşük oran (%1,57) saptanmıştır. Proteobacteria oranı ise 2 yaşından büyük dişi Anadolu mandalarında %9,27 ile dikkate değer oranda saptanırken Anadolu malak ve mandalarında Proteobacteria oranın, İtalyan Akdeniz ırkı malak ve mandalarında göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da Anadolu malak ve mandalarının instestinal disbiyozise daha meyilli olabileceğini düşündürmüştür. Örnek grupları aile düzeyinde incelendiğinde Ruminoccaceae

(%47,8) ailesi tüm gruplarda baskın aile olarak bulunmuştur. Cins düzeyinde incelendiğinde ise *Ruminnococcus* (%39,6) cinsi bir grup dışında baskın cins olarak bulunmuştur. Süt ve yem ile beslenen 3 aylıktan küçük malaklarda baskın cins *Lactobacillus* (%20,4) cinsi olarak saptanmıştır. Ayrıca çekirdek mikrobiyotada yer almayan ancak süt kalitesinde etkili olduğu düşünülen *Dorea, Sturella* ve *Parasturella* cinslerinin süt veren Anadolu mandalarında daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda, örnekleme için seçilen hayvanların çekirdek bağırsak mikrobiyotasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi cinslerin görülmemiş olması, immun sistemlerinin nispeten zayıf olabileceğini, prebiyotik takviyesi yapılarak güçlendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bulgular, intestinal mikrobiyomun erken yaşam evrelerinde şekillenmesinde konak genetiğinin ve çevresel etkilerin güçlü bir katkısı olduğunu ve mikrobiyom çalışmalarının hayvan yetiştiriciliği, hayvan büyümesi ve sağlığı ile ilişkili yaşanmakta olan sorunlara çözüm sunabileceğini göstermektedir.

Yeni doğanlarda yarışmacı dışlama ile intestinal mikrobiyota kolonizasyonu erkenden oluşturularak, hastalıkların oluşumu önceden engellenebilir ve tedavi için olası antibiyotik kullanımı azaltılarak küresel bir tehdit olarak görülen antibiyotik direncinin gelişiminin engellenmesine katkı sağlanabileceği ön görülebilmektedir. Aynı zamanda tüm genom dizilemenin ortaya konabilmesini sağlayan yeni nesil dizileme yöntemleri ile direnç genlerini barındıran resistomların ve aktarılabilen gen bölgelerinin de tespiti yapılarak direnç varlığının ve yayılma potansiyelinin ortaya konarak gelişmiş çalışmalar yapılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C. ve Moroni, P., 2016, The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular Biosystems*, 12(8), 2359-2372.

Adkinson, A. Y. ve Konca, Y., 2021, Sütçü Manda Irklarının Performans ve Verimliliğini Etkileyen Faktörler ve Türkiye'deki Geleceği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 25, 498-508.

Agranyoni, O., Meninger-Mordechay, S., Uzan, A., Ziv, O., Salmon-Divon, M., Rodin, D. ve diğ., 2021, Gut microbiota determines the social behavior of mice and induces metabolic and inflammatory changes in their adipose tissue. *Nature Partner Journals Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 1-14.

Alipour, M. J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U. ve diğ., 2018, The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.

Altuntaş, Y. ve Batman, A., 2017, Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi*, 45(3), 286–296.

Amin, N. ve Seifert, J., 2021, Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 989-1001.

Amon, P. ve Sanderson, I., 2017, What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 102(5), 257-260.

Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P. ve Engstrand, L., 2008, Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *Public Library of Science One*, 3(7), e2836.

Anonim 1: NIH Human Microbiome Project. Erişim adresi: https://hmpdacc.org/hmp/ Son erişim Tarihi: 02.03.2022

Anonim 2: 16 Şubat 2021 tarihli, 31397 sayılı Resmi Gazete. Erişim adresi: https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2021/02/20210216-7.htm Son erişim tarihi: 16.03.2022.

Anonim 3: Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu. Erişim adresi: https://www.tkdk.gov.tr/ Son erişim Tarihi: 16.03.2022

Anonim 4: TÜİK. Erişim adresi: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Ocak-2022-45748 Son erişim tarihi: 16.03.2022

Atasever, S. ve Erdem, H., 2008, Manda yetiştiriciliği ve Türkiye'deki geleceği. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(1), 59-64.

Bergmann, G. T., Craine, J. M., Robeson, M. S. ve Fierer, N., 2015, Seasonal shifts in diet and gut microbiota of the American bison (Bison bison). *PloS One*, 10(11), e0142409.

Bleich, A. ve Fox, J. G., 2015, The mammalian microbiome and its importance in laboratory animal research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 56(2), 153–158.

Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Miller, M. E. B., Wilson, M. K., Yannarell, A. C., Dinsdale, E. A. ve diğ., 2009, Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1948-1953.

Carberry, C. A., Kenny, D. A., Han, S., McCabe, M. S. ve Waters, S. M., 2012, Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4949-4958.

Catalano, P. M. ve Shankar, K., 2017, Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *Bmj*, *356*.

Cho, I. ve Blaser, M. J., 2012, The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260-270.

Choi, S. C., 2016, On the study of microbial transcriptomes using second-and third-generation sequencing technologies. *Journal of Microbiology*, 54(8), 527-536.

Clavijo, V. ve Flórez, M. J. V., 2018, The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poultry Science*, 97(3), 1006-1021.

Clemmons, B. A., Voy, B. H. ve Myer, P. R., 2019, Altering the gut microbiome of cattle: considerations of host-microbiome interactions for persistent microbiome manipulation. *Microbial Ecology*, 77(2), 523-536.

Clench, M. H. ve Mathias, J. R., 1995, The avian cecum: a review. *The Wilson Bulletin*, 93-121.

Cruz-Monterrosa, R., Mota-Rojas, D., Ramirez-Bribiesca, E., Mora-Medina, P. ve Guerrero-Legarreta, I., 2020, Scientific findings on the quality of river buffalo meat and prospects for future studies. *Journal of Buffalo Science*, 9, 170-180.

Darcan, C. ve Türkyılmaz, O., 2018, Yeni nesil dizileme teknolojisine genel bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 41–49.

Demir, P. ve Kırmızıbayrak, T., 2013, Kaz yetiştiriciliğinin sosyo-ekonomik önemi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 60, 129-134, 2013

Deng, F., McClure, M., Rorie, R., Wang, X., Chai, J., Wei, X. ve diğ., 2019, The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1-13.

Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A. ve Seifert, J., 2015, News in livestock research—use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 55-63.

Diaz Carrasco, J. M., Casanova, N. A. ve Fernández Miyakawa, M. E., 2019, Microbiota, gut health and chicken productivity: what is the connection?. *Microorganisms*, 7(10), 374.

Difford, G. F., Plichta, D. R., Løvendahl, P., Lassen, J., Noel, S. J., Højberg, O. ve diğ., 2018, Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy cows. *Public Library of Science Genetics*, 14(10), e1007580.

Diker, K. S., 2017, Hayvanlarda mikrobiyom-hayvan mikrobiyomu, *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi,* 88(2), 122–132.

Doğan, M., Eröz R., Yüce H. ve Özmerdivenli, R., 2017, Yeni nesil dizileme (ynd) hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 19(1), 27-30.

Du, C., Deng, T., Zhou, Y., Ye, T., Zhou, Z., Zhang, S. ve diğ., 2019, Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (Bubalus Bubalis). *Animal Genetics*, 50(3), 207-216.

Durso, L. M., Miller, D. N., Schmidt, T. B. ve Callaway, T., 2017, Tracking bacteria through the entire gastrointestinal tract of a beef steer. *Agricultural & Environmental Letters*, 2(1), 170016.

El-Salam, A., Mohamed, H. ve El-Shibiny, S., 2011, A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology*, 91(6), 663-699.

Esteban-Blanco, C., Gutiérrez-Gil, B., Puente-Sánchez, F., Marina, H., Tamames, J., Acedo, A. ve diğ., 2020, Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16s rRNA gene sequencing. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 137(1), 73-83.

Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D. S., Lassalas, J., Lamberton, P. ve diğ., 2016, Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 480.

Fan, P., Bian, B., Teng, L., Nelson, C. D., Driver, J., Elzo, M. A. ve Jeong, K. C., 2020, Host genetic effects upon the early gut microbiota in a bovine model with graduated spectrum of genetic variation. *The The International Society for Microbial Ecology Journal*, 14(1), 302-317.

Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R. ve White, B. A., 2008, Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121-131.

Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. ve Cotter, P. D., 2012, Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*, 3(3), 203-220.

Furman, O., Shenhav, L., Sasson, G., Kokou, F., Honig, H., Jacoby, S. ve diğ., 2020, Stochasticity constrained by deterministic effects of diet and age drive rumen microbiome assembly dynamics. *Nature Communications*, 11(1), 1-13.

Gao, X., Zhang, M., Xue, J., Huang, J., Zhuang, R., Zhou, X. ve diğ., 2018, Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1250.

Garmendia, L., Hernandez, A., Sanchez, M. B. ve Martinez, J. L., 2012, Metagenomics and antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 27–31.

Grada, A. ve Weinbrecht, K., 2013, Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of İnvestigative Dermatology*, 133(8), e11.

Guarner, F. ve Malagelada, J. R., 2003, Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.

Gul, M., Akpinar, M. G., Tascioglu, Y., Karlı, B. ve Bozkurt, Y., 2018, Economic analysis of buffalo breeding in Turkey. *Custos e Agronegócio Online*, 14, 305-335.

Gupta, S., Allen-Vercoe, E. ve Petrof, E. O., 2016, Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 9(2), 229-239.

Gut, I. G., 2013, New sequencing technologies. *Clinical and Translational Oncology*, 15(11), 879-881.

Gürsoy, N. C., ve Otlu B., 2017, Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.

Hashimoto-Hill, S. ve Alenghat, T., 2021, Inflammation-Associated Microbiota Composition Across Domestic Animals. *Frontiers in Genetics*, 12.

He, B., Nohara, K., Ajami, N. J., Michalek, R. D., Tian, X., Wong, M. ve diğ., 2015, Transmissible microbial and metabolomic remodeling by soluble dietary fiber improves metabolic homeostasis. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12.

Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U. ve Gessner, A., 2015, Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 56(2), 228-240.

Hong, M., Zhang, R., Liu, Y., Wu, Z. Ve Weng, P., 2021, The interaction effect between tea polyphenols and intestinal microbiota: Role in ameliorating neurological diseases. *Journal of Food Biochemistry*, e13870.

Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B. ve Akeson, M., 2016, The Oxford Nanopore MinION: delivery

of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 1-11.

Jain, N., 2020, The early life education of the immune system: Moms, microbes and (missed) opportunities. *Gut Microbes*, 12(1), 1824564.

Jami, E. ve Mizrahi, I., 2012, Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *Public Library of Science One*, 7(3), e33306.

Jami, E., Israel, A., Kotser, A. ve Mizrahi, I., 2013, Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 7(6), 1069-1079.

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J. ve diğ., 2008, Oral administration of Lactobacillus strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75*(15)*, 4650-4655.

Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. ve Deamer, D. W., 1996, Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13770-13773.

Kelly, D., Yang, L. ve Pei, Z., 2018, Gut microbiota, fusobacteria, and colorectal cancer. *Diseases*, 6(4), 109.

Khalil, A., Batool, A. ve Arif, S., 2022, Healthy Cattle Microbiome and Dysbiosis in Diseased Phenotypes. *Ruminants*, 2(1), 134-156.

Kızmaz, M. Z., Paylan, C. ve Erkan, S., 2017, DNA dizilemenin tarihsel gelişimi, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi,* 6(2), 47-53.

Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K. ve diğ., 2012, Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470-480.

Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z. E., Kang, D. W. ve DiBaise, J. K., 2012, Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. Nutrition in clinical practice, 27(2), 201-214.

Kuehn, J. S., Gorden, P. J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P. J. ve diğ., 2013, Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *Public Library of Science One*, 8(4), e61959.

Küllük, E. ve Dalgın, D., 2021, Veteriner sahada güncel mikrobiyota kavramı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 32(1), 77-88.

Lee, Y. K. ve Mazmanian, S. K., 2010, Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. S*cience*, 330(6012), 1768-1773.

Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S. ve diğ., 2016, Third-generation sequencing and the future of genomics. *BioRxiv*, 048603.

Leite, G., Pimentel, M., Barlow, G. M., Chang, C., Hosseini, A., Wang, J. ve diğ., 2021, Age and the aging process significantly alter the small bowel microbiome. *Cell Reports*, 36(13), 109765.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. ve Gordon, J. I., 2005, Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11070-11075.

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S. ve diğ., 2008, Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651.

Li, R. W., 2015, *Rumen metagenomics*, Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution İçinde Puniya, A., Singh, R., Kamra, D. (ed.). In, Springer, New Delhi (pp. 223-245).

Lin, B., Henderson, G., Zou, C., Cox, F., Liang, X., Janssen, P. H. ve diğ., 2015, Characterization of the rumen microbial community composition of buffalo breeds consuming diets typical of dairy production systems in Southern China. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 75-84.

Liu, G., Luo, X., Zhao, X., Zhang, A., Jiang, N., Yang, L. ve diğ., 2018, Gut microbiota correlates with fiber and apparent nutrients digestion in goose. *Poultry Science*, 97(11), 3899-3909.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R. ve diğ., 2012, Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(251364

Liu, X., 2016, Focus: Microbiome: Microbiome. *The Yale Journal of Biology and Medicine*,

89(3), 275.

Luczynski, P., Neufeld, K. M., Oriach, C. S., Clarke, G., Dinan, T. G. ve Cryan, J. F., 2016, Growing up in a Bubble : Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19, 1–17.

Lyu, W., Liu, X., Lu, L., Dai, B., Wang, W., Yang, ve diğ., 2021, Cecal microbiota modulates fat deposition in muscovy ducks. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 313.

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P. ve diğ., 2020, The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, 12(5), 1474.

Mardis, E. R., 2017, DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213-218.

McCombie, W. R., McPherson, J. D. ve Mardis, E. R., 2019, Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11).

Mestdagh, R., Dumas, M. E., Rezzi, S., Kochhar, S., Holmes, E., Claus, S. P. ve diğ., 2012, Gut microbiota modulate the metabolism of brown adipose tissue in mice. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 620-630.

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J. ve diğ., 2017, The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), e00036-17.

Modi, S. R., Collins, J. J. ve Relman, D. A., 2014, Antibiotics and the gut microbiota. The *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4212-4218.

Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., Bermingham, E. N., 2018, Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiology Open*, 7(5), e00677.

Müller, R., ve Nebel, M., 2021, On the use of sequence-quality information in OTU clustering. *PeerJ*, 9**,** e11717

Myer, P. R., Freetly, H. C., Wells, J. E., Smith, T. P. L. ve Kuehn, L. A., 2017, Analysis of the gut bacterial communities in beef cattle and their association with feed intake, growth, and efficiency. *Journal of Animal Science*, 95(7), 3215-3224.

Myer, P. R., Wells, J. E., Smith, T. P., Kuehn, L. A., Freetly, H. C., 2015, Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *Springerplus*, 4(1), 1-13.

Nagaraja, T. G., Narayanan, S. K., Stewart, G. C. ve Chengappa, M. M., 2005, *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*, 11(4), 239-246.

Naveena, B. M. ve Kiran, M., 2014, Buffalo meat quality, composition, and processing characteristics: Contribution to the global economy and nutritional security. *Animal Frontiers*, 4(4), 18–24.

Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S., 2012, Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267.

Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H. ve Koren, O., 2016, Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in Microbiology*, 1031.

O'Donnell, M. M., Harris, H. M., Ross, R. P. ve O'Toole, P. W., 2017, Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *Microbiologyopen*, 6(5), e00509.

Oikonomou, G., Addis, M. F., Chassard, C., Nader-Macias, M. E. F., Grant, I., Delbès, C. ve diğ., 2020, Milk microbiota: what are we exactly talking about? *Frontiers in Microbiology*, 11, 60.

Park, Y. W. ve Haenlein, G. F., 2013, *Milk and dairy products in human nutrition: production, composition and health*. 1st Ed., John Wiley & Sons.

Park, S. T., ve Kim, J., 2016, Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International Neurourology Journal*, 20(Suppl 2), S76.

Pasha, T. N., 2013, Prospect of nutrition and feeding for sustainable buffalo production. *Buffalo Bulletin*, 32(Spec. Issue 1).

Peng, B., Huang, S., Liu, T. ve Geng, A., 2015, Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-14.

Reemst, K., Tims, S., Yam, K. Y., Mischke, M., Knol, J., Brul, S. ve diğ., 2021, The role of the gut microbiota in the effects of early-life stress and dietary fatty acids on later-life central and metabolic outcomes in mice. *bioRxiv*. Erişim adresi: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.02.467036v1.abstract, Son erişim tarihi: 23.03.2022

Rehman, H. U., Vahjen, W., Awad, W. A., & Zentek, J. (2007). Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. Archives of animal nutrition, 61(5), 319-335.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A. ve diğ., 2019, What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.

Rychlik, I., 2020, Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 10(1), 103.

Sanger F., Nicklen S. ve Coulson A. R., 1977, DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 74(12), 5463–5467.

Sarı, M., Önk, K. ve Aksoy A. R., 2012, Ördeklerin Kesim ve Karkas Özelliklerine Cinsiyet ve Irkın Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(3).

Sariozkan, S., 2011, Türkiye'de manda yetiştiriciliğinin önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1), 163-166.

Schadt, E. E., Turner, S. ve Kasarskis, A., 2010, A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227-R240.

Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B. ve Kim, W. K., 2018, Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 254.

Shendure, J., ve Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135-1145.

Shin, N. R., Whon, T. W. Ve Bae, J. W., 2015, Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496-503.

Siddiky, M. N. A. ve Faruque, M. O., 2017, Buffaloes for dairying in South Asia: potential, challenges and way forward. SAARC *Journal of Agriculture*, 15(2), 227-239.

Singh, K. M., Reddy, B., Patel, D., Patel, A. K., Parmar, N., Patel, A. ve diğ., 2014, High potential source for biomass degradation enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Indian buffalo rumen. *BioMed Research International*, Erişim adresi: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/267189/, Son erişim tarihi: 23.03.2022.

Smith, G. R. ve Thornton, E. A., 1993, The prevalence of Fusobacterium necrophorum biovar A in animal faeces. *Epidemiology & Infection*, 110(2), 327-331.

Soysal, İ., Kök, S. ve Gürcan, E. K., 2005, Mandalarda alyuvar potasyum polimorfizmi üzerine bir araştırma. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2), 189-193.

Stanley, D., Hughes, R. J. ve Moore, R. J., 2014, Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4301-4310.

Stojanov, S., Berlec, A. ve Štrukelj, B., 2020, The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, 8(11), 1715.

Susic, D., Bai, M. ve Henry, A., 2020, Microbiota and pregnancy. *Microbiota in Health and Disease*, 2(3), 1-11.

Szymczak, J., Milewicz, A., Thijssen, J. H., Blankenstein, M. A. ve Daroszewski, J., 1998, Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause. *Steroids*, 63(5-6), 319-321.

Şahin, G., 2015, Türkiye zirai hayatında manda (*Bubalus bubalis*) yetiştiriciliği ve manda ürünlerinin değerlendirilmesi. *Coğrafya Dergisi*, 31, 14-40.

Tang, Y., Underwood, A., Gielbert, A., Woodward, M. J., & Petrovska, L. 2014, Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 80(2), 478-485.

Tascioglu, Y., Akpinar, M. G., Gul, M., Karli, B. ve Bozkurt, Y., 2020, Analysıs Of Buffalo Breeders'decısıons In Turkey Wıth Analytıcal Hıerarchy Process. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(1), 315-323.

Taylor, K. J., Ngunjiri, J. M., Abundo, M. C., Jang, H., Elaish, M., Ghorbani, A. ve diğ., 2020, Respiratory and gut microbiota in commercial turkey flocks with disparate weight gain trajectories display differential compositional dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12), e00431-20.

Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D. ve diğ., 2020, Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534.

Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádnıková, R. ve diğ., 2004, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93(2-3), 97-108.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., ve Gordon, J. I., 2007, The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810.

Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., ve Çakiris, A., 2011, Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 11–18.

Wang, S., Chen, L. I., He, M., Shen, J., Li, G. Ve Tao, Z., 2018, Different rearing conditions alter gut microbiota composition and host physiology in Shaoxing ducks. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.

Wang, W., Liu, Y., Yang, Y., Wang, A., Sharshov, K. ve Li, Y., 2018, Comparative analyses of the gut microbiota among three different wild geese species in the genus Anser. *Journal of Basic Microbiology*, 58(6), 543-553.

Williams, J. E., Carrothers, J. M., Lackey, K. A., Beatty, N. F., Brooker, S. L., Peterson, H. K. ve diğ., 2019, Strong multivariate relations exist among milk, oral, and fecal microbiomes in mother-infant dyads during the first six months postpartum. *The Journal of Nutrition*, 149(6), 902-914.

Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C. ve diğ., 2003,

A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*, 299(5615), 2074-2076.

Yadav, S. ve Jha, R., 2019, Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1-11.

Yang, B., Le, J., Wu, P., Liu, J., Guan, L. L. ve Wang, J., 2018, Alfalfa intervention alters rumen microbial community development in Hu lambs during early life. *Frontiers in Microbiology*, 9, 574.

Yılmaz, A. ve Kara, M. A., 2019, Dünyada ve Türkiye'de manda yetiştiriciliğinin durumu ve geleceği. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6(3), 356-363.

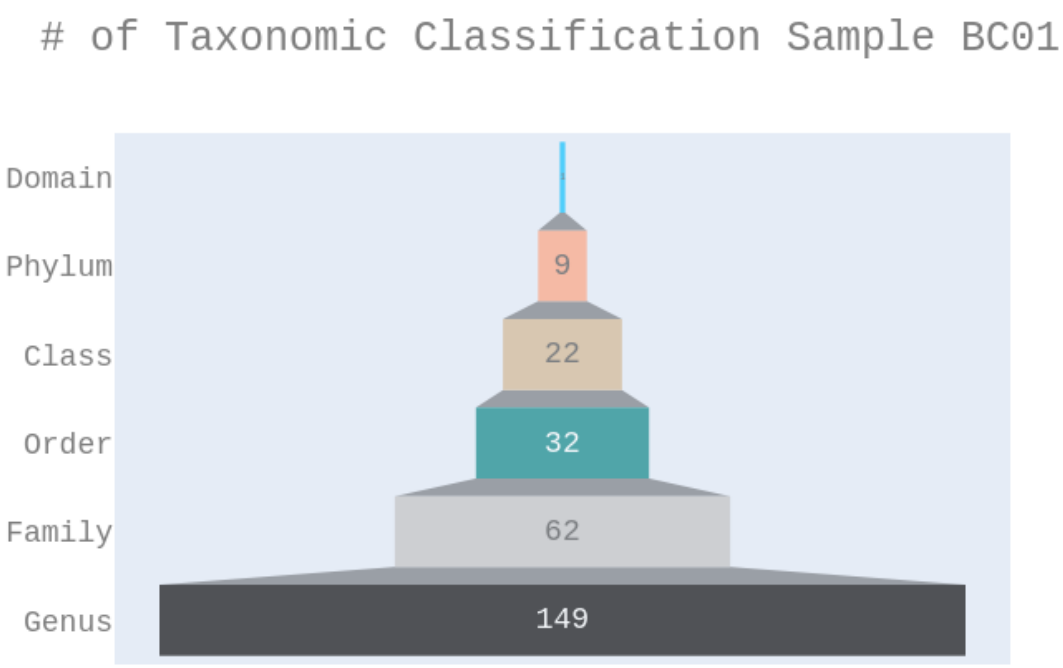
Zeineldin, M., Barakat, R., Elolimy, A., Salem, A. Z., Elghandour, M. M., Monroy, J. C., 2018, Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial Pathogenesis*, *124*, 106-115.

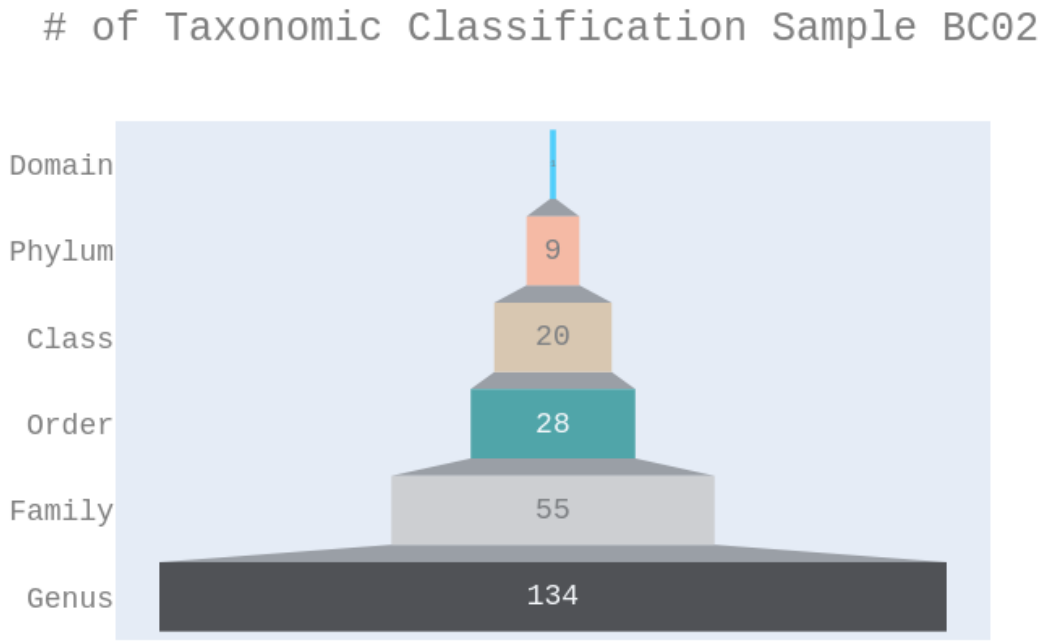
Zhang, J., Xu, C., Huo, D., Hu, Q. ve Peng, Q., 2017, Comparative study of the gut microbiome potentially related to milk protein in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Chinese Holstein cattle. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.

EKLER

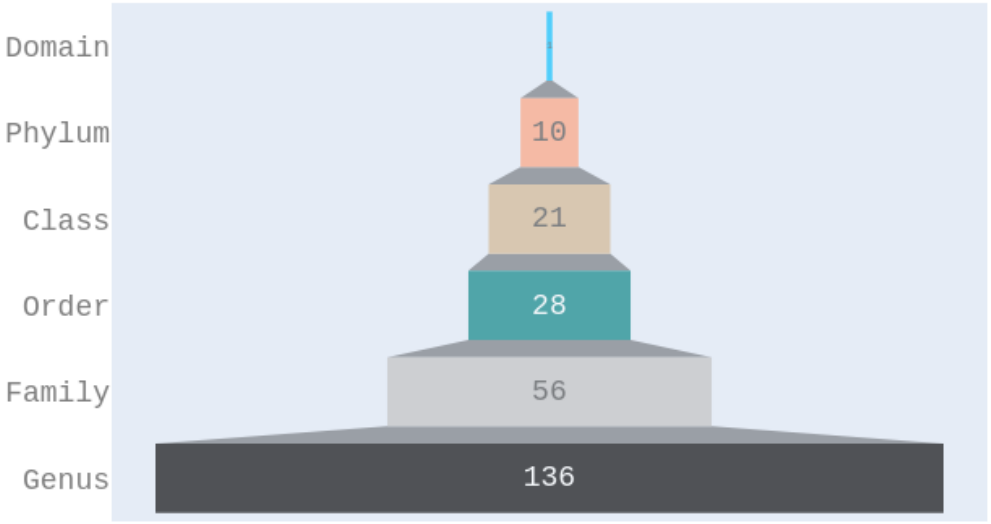
Ham Veriler

Gruplara Göre OTU Verilerinin Taksonomik Dağılımlarını Gösteren Grafikler

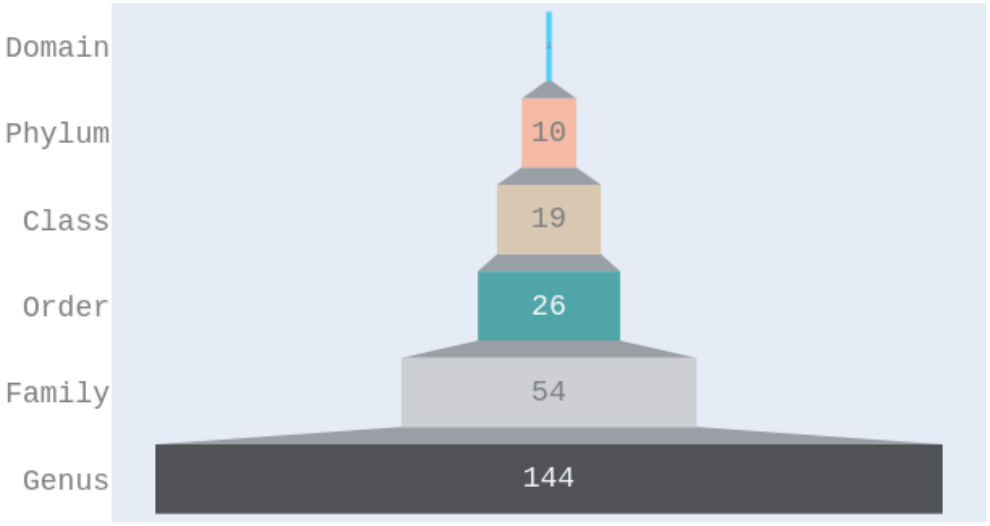


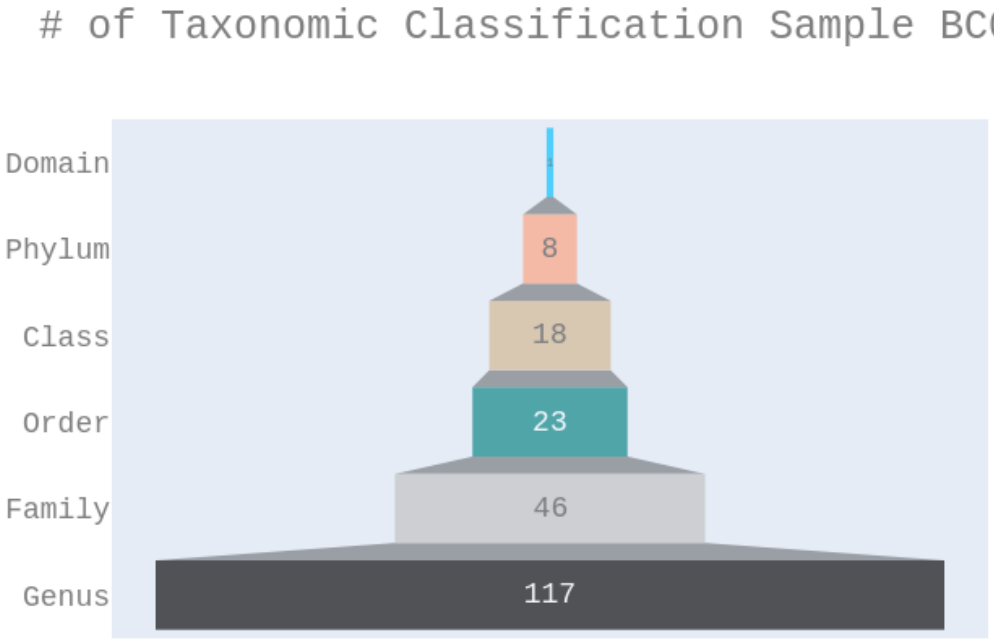


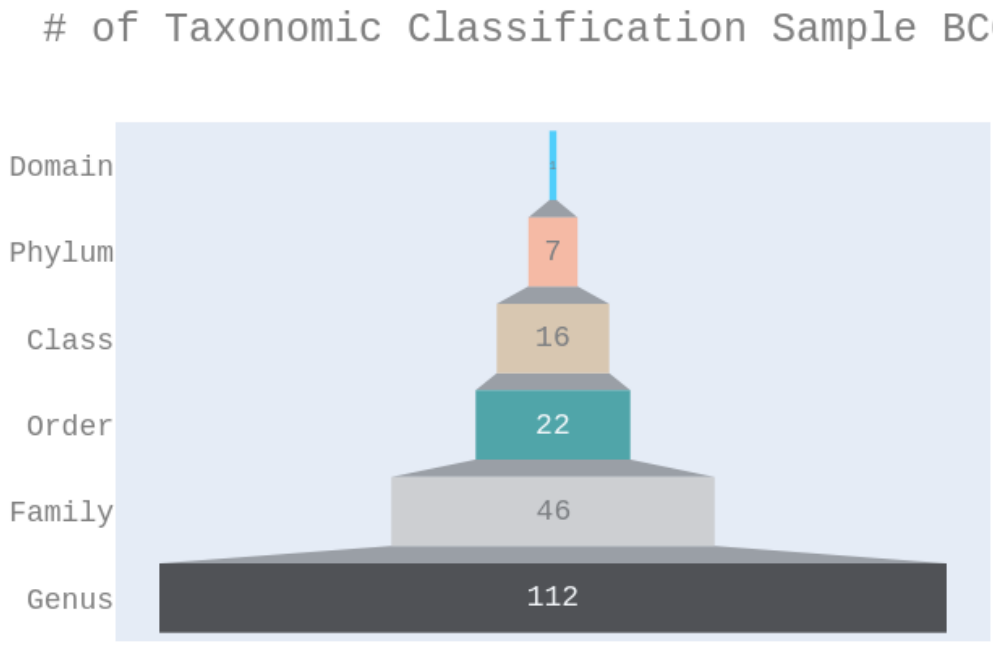
# of Taxonomic Classification Sample BC03



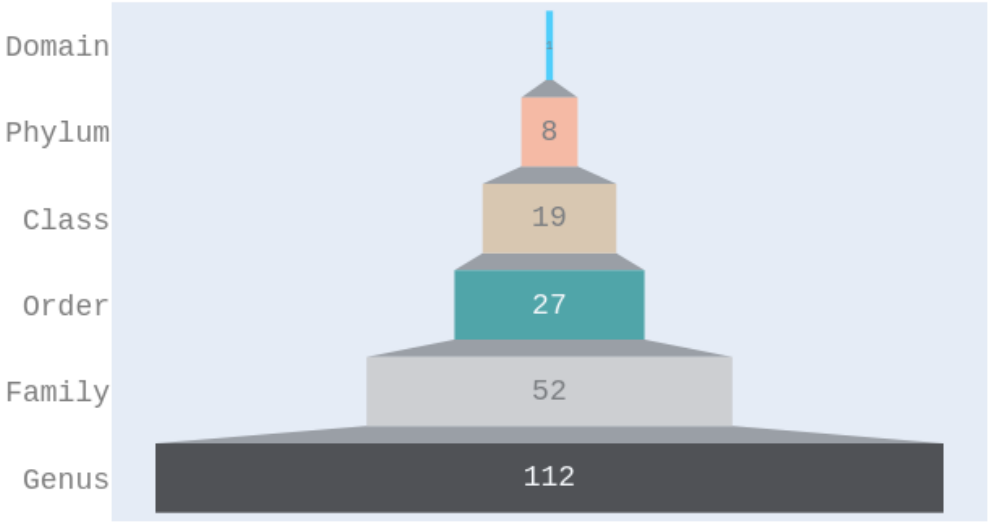
# of Taxonomic Classification Sample BC04



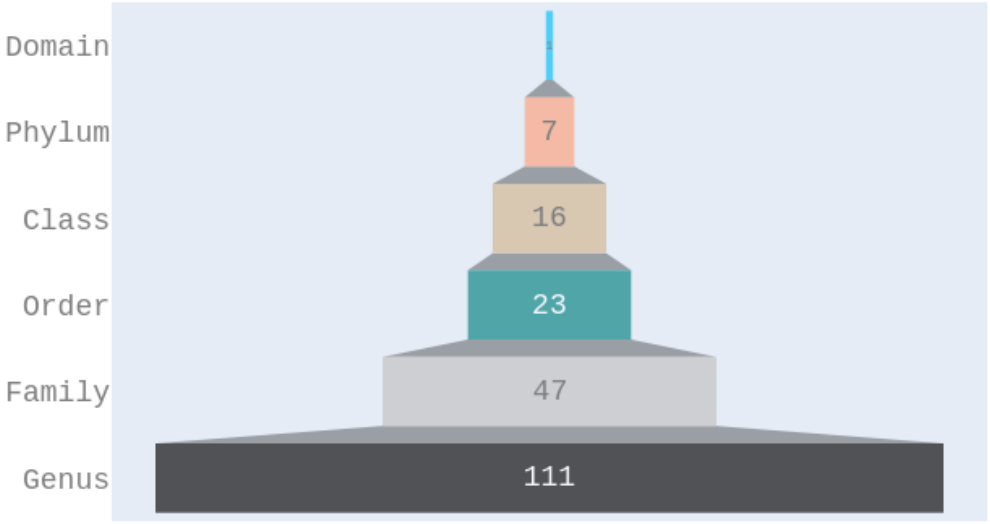

# of Taxonomic Classification Sample BC05
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
18
23
46
117


# of Taxonomic Classification Sample BC06
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
7
16
22
46
112

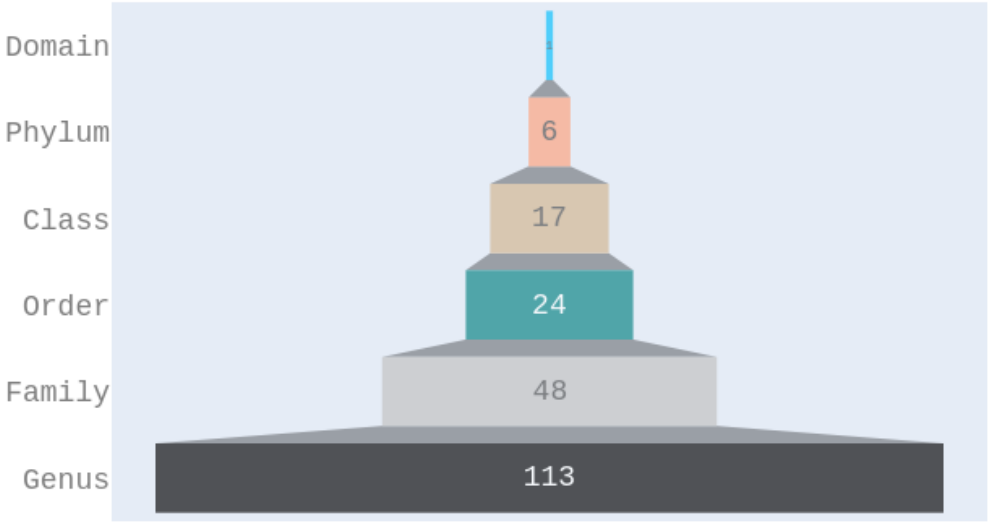

# of Taxonomic Classification Sample BC07
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
7
19
26
46
102


# of Taxonomic Classification Sample BC08
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
19
27
52
112

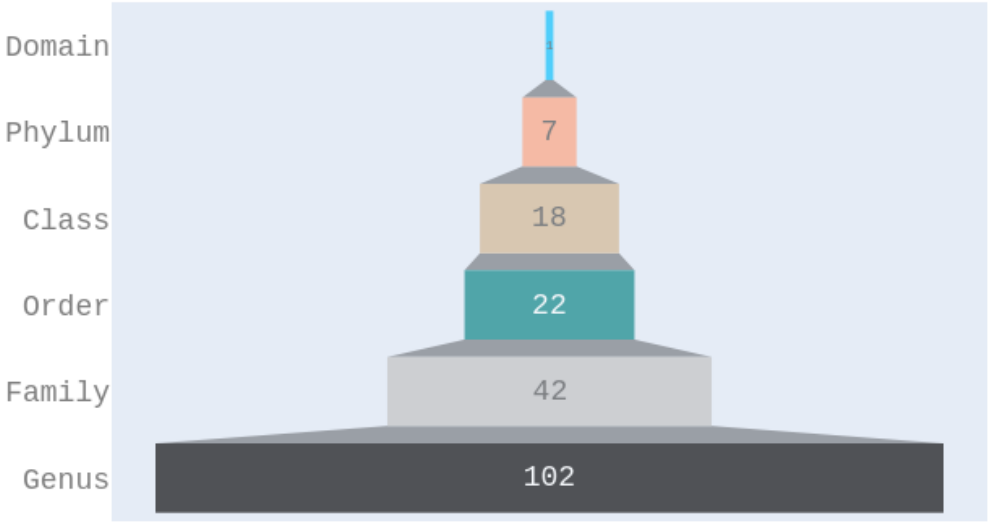
# of Taxonomic Classification Sample BC09



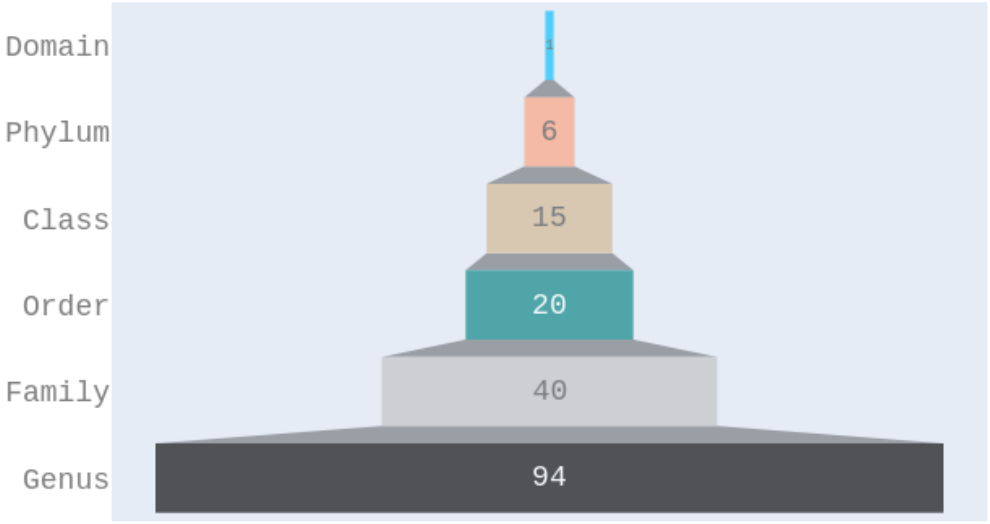
# of Taxonomic Classification Sample BC10



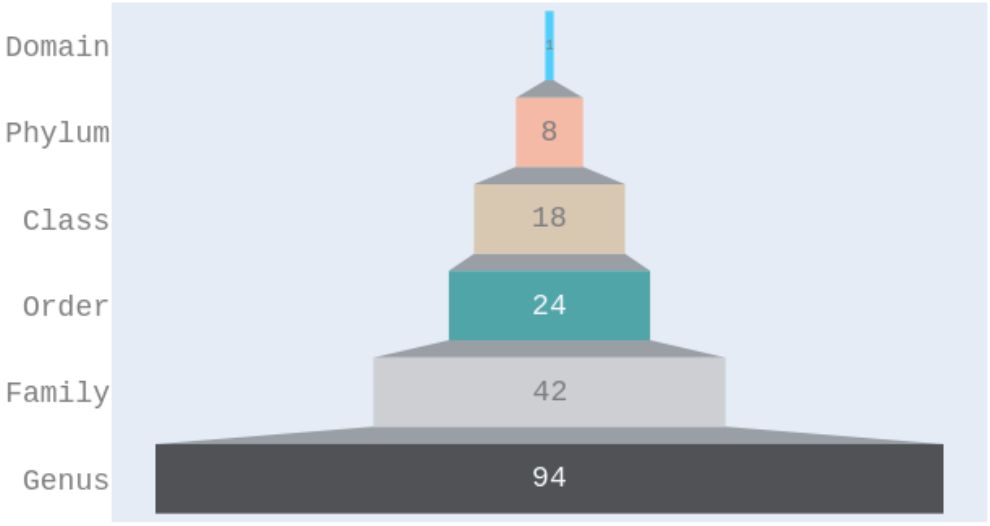
# of Taxonomic Classification Sample BC11



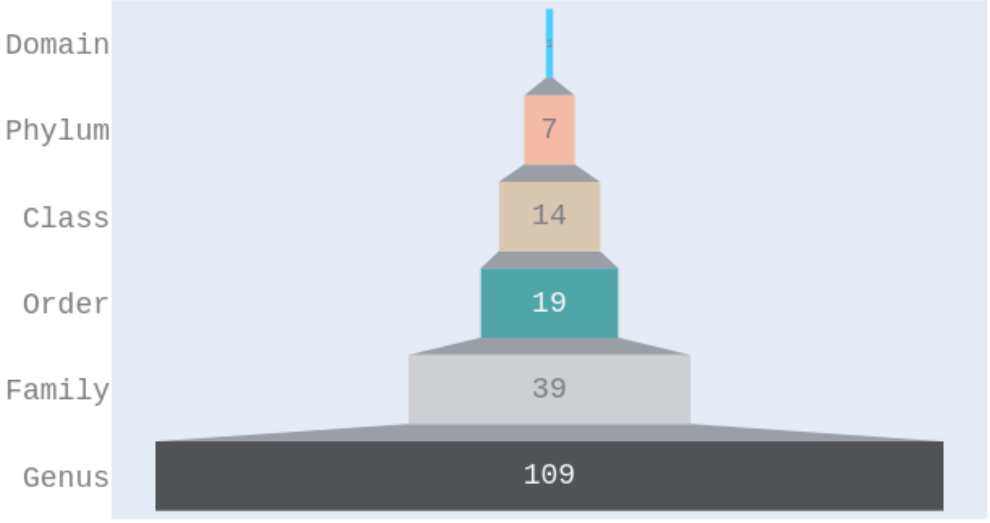
# of Taxonomic Classification Sample BC12

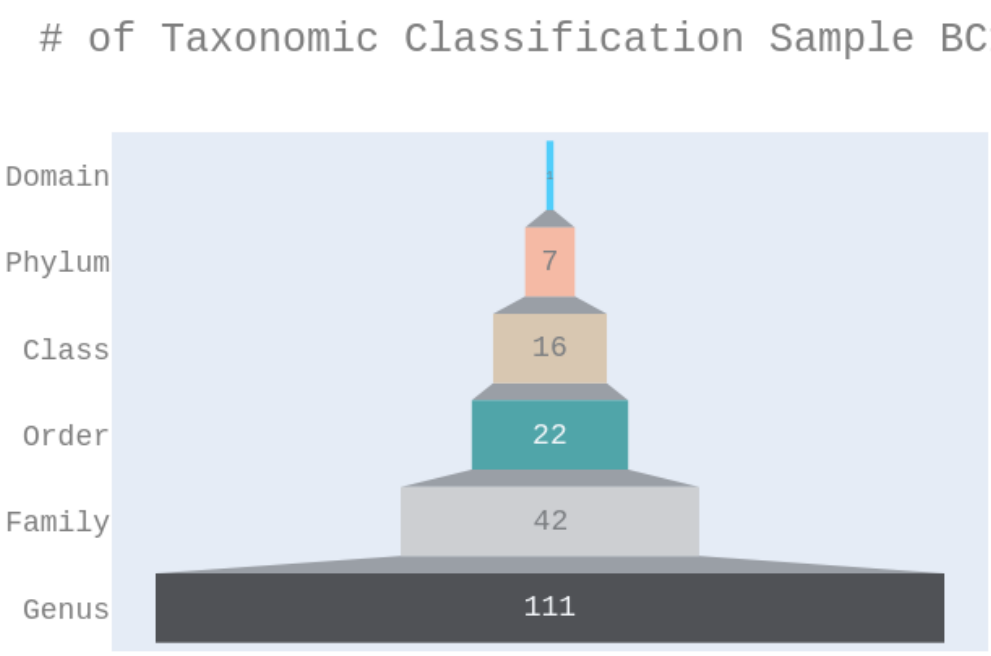


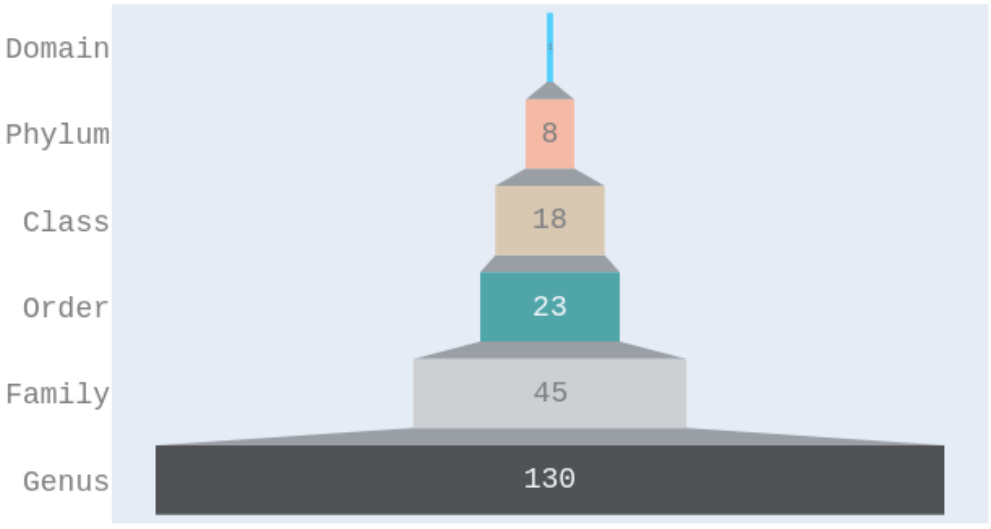
# of Taxonomic Classification Sample BC13



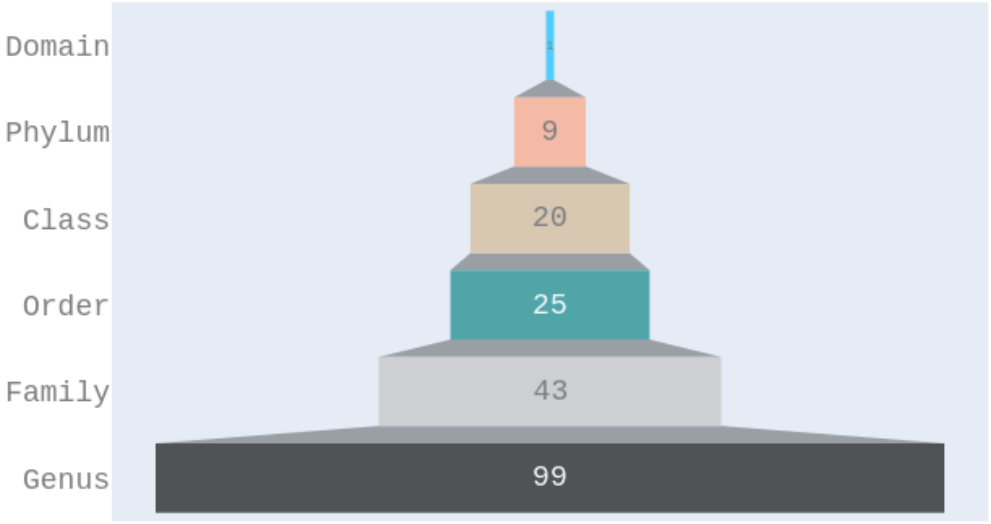
# of Taxonomic Classification Sample BC14



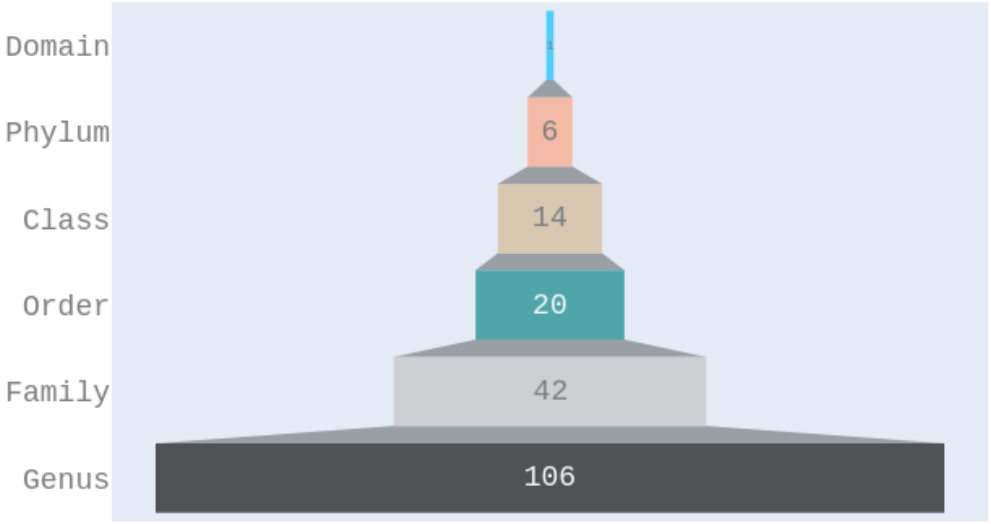

# of Taxonomic Classification Sample BC15
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
7
16
22
42
111

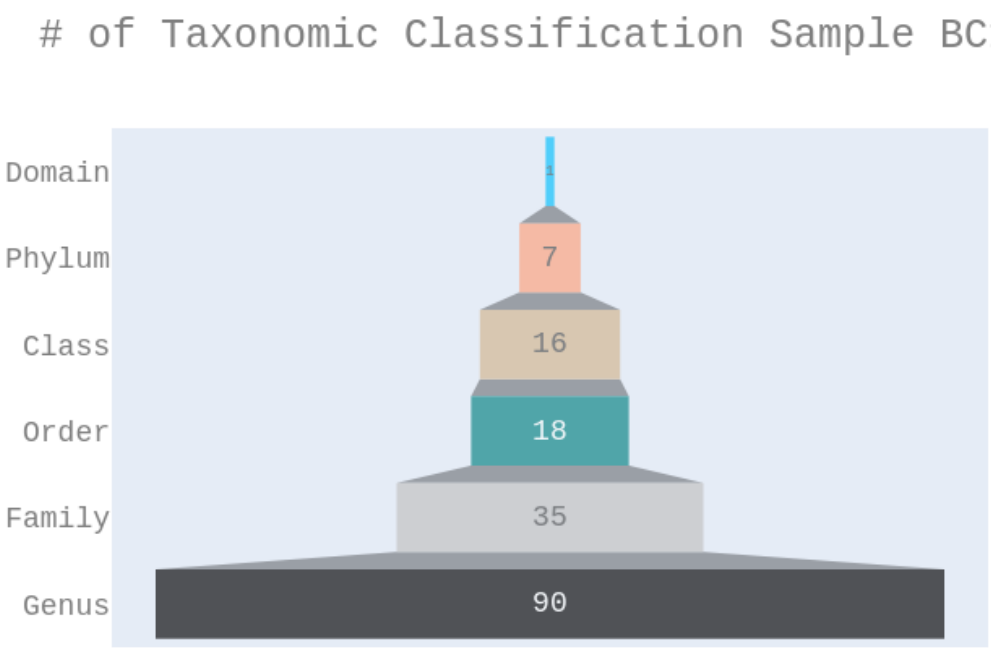

# of Taxonomic Classification Sample BC16
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
18
23
45
130

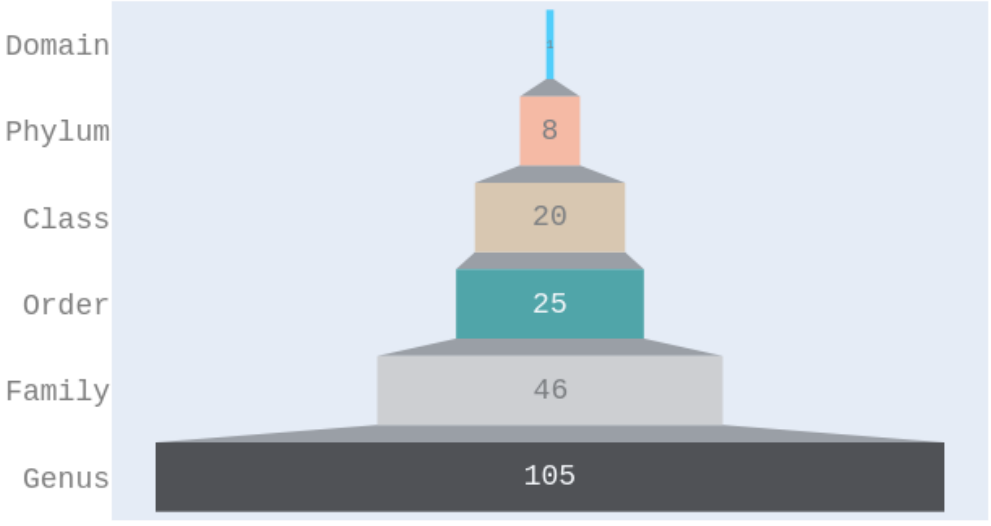
# of Taxonomic Classification Sample BC17

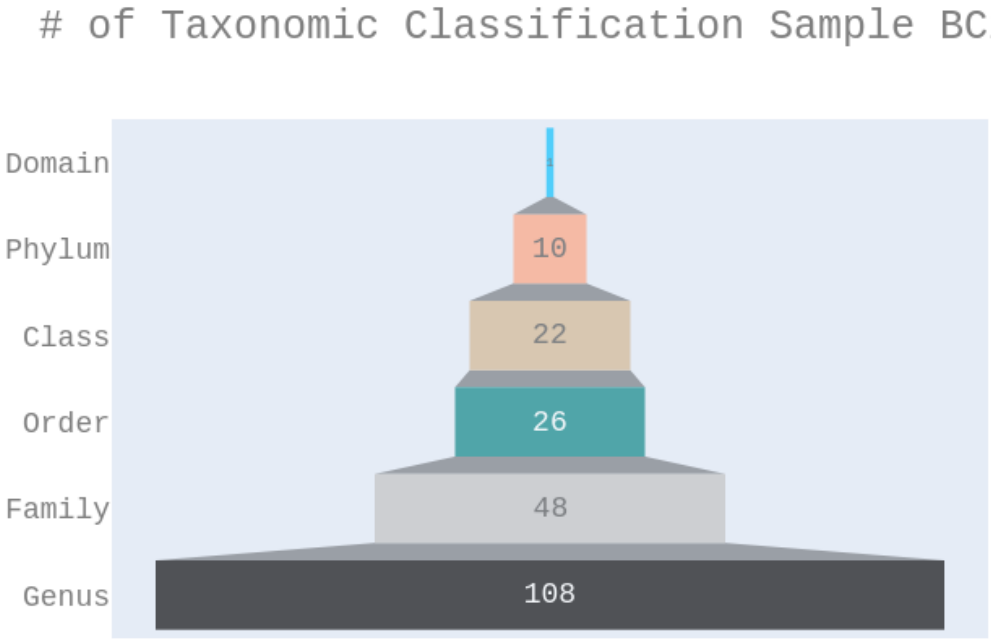


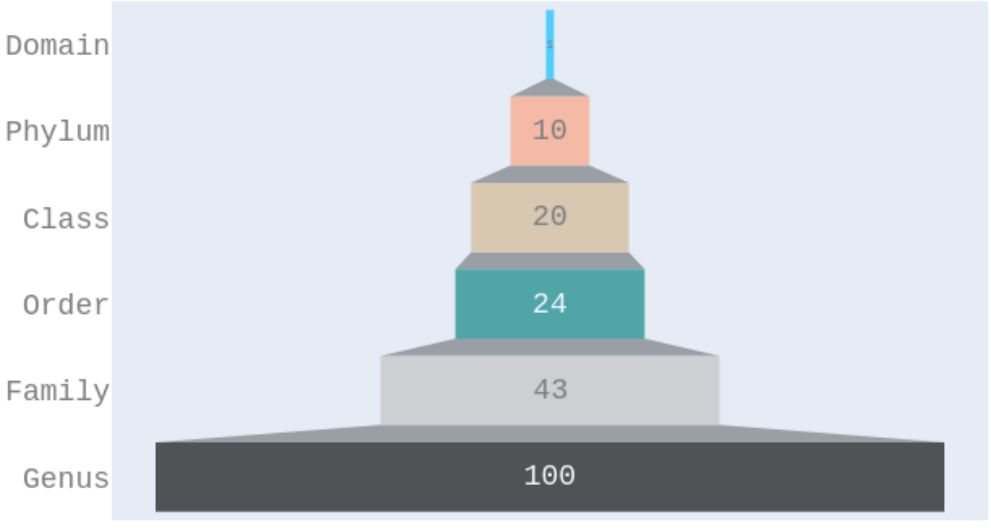
# of Taxonomic Classification Sample BC18

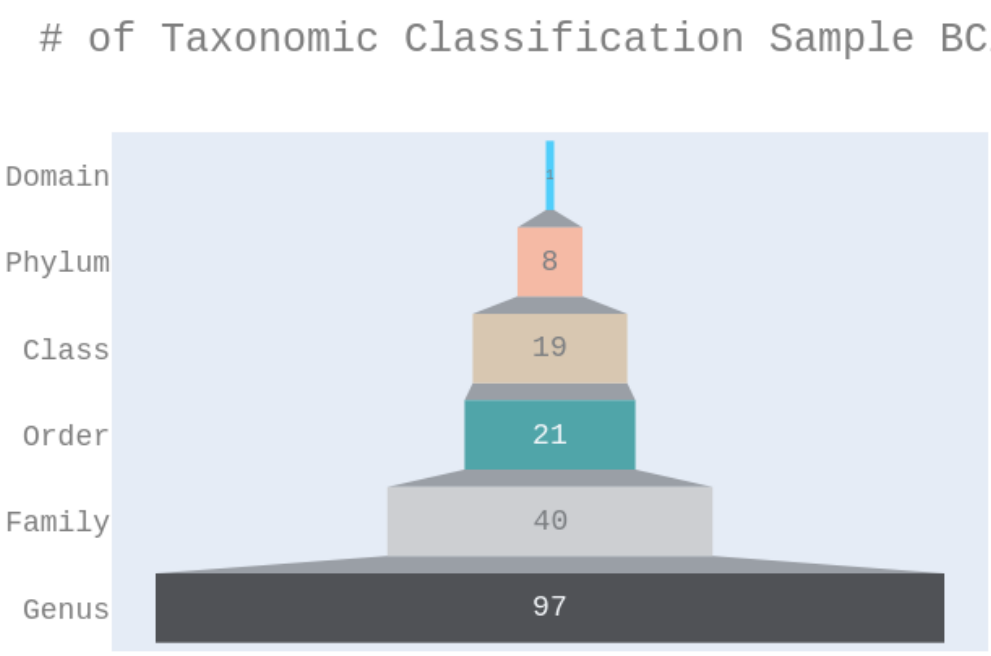


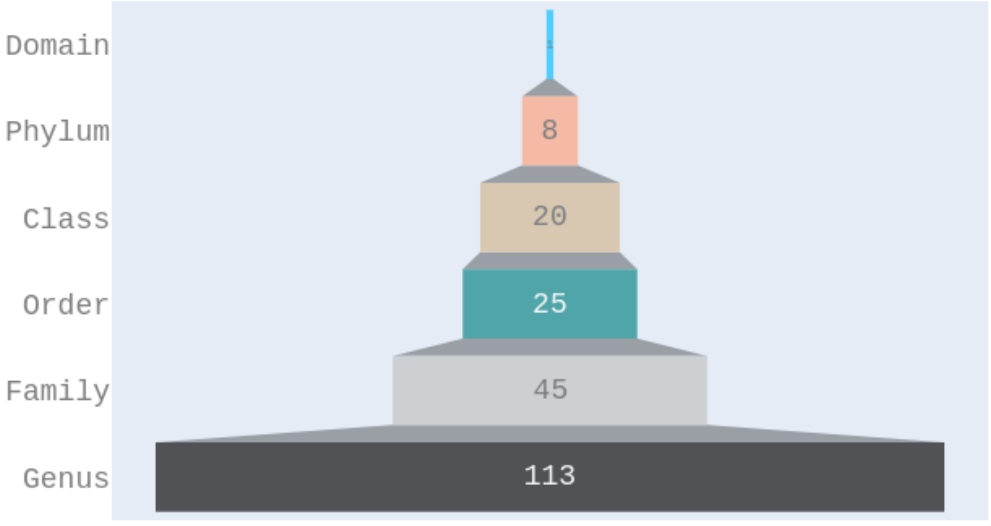

# of Taxonomic Classification Sample BC19
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
7
16
18
35
90

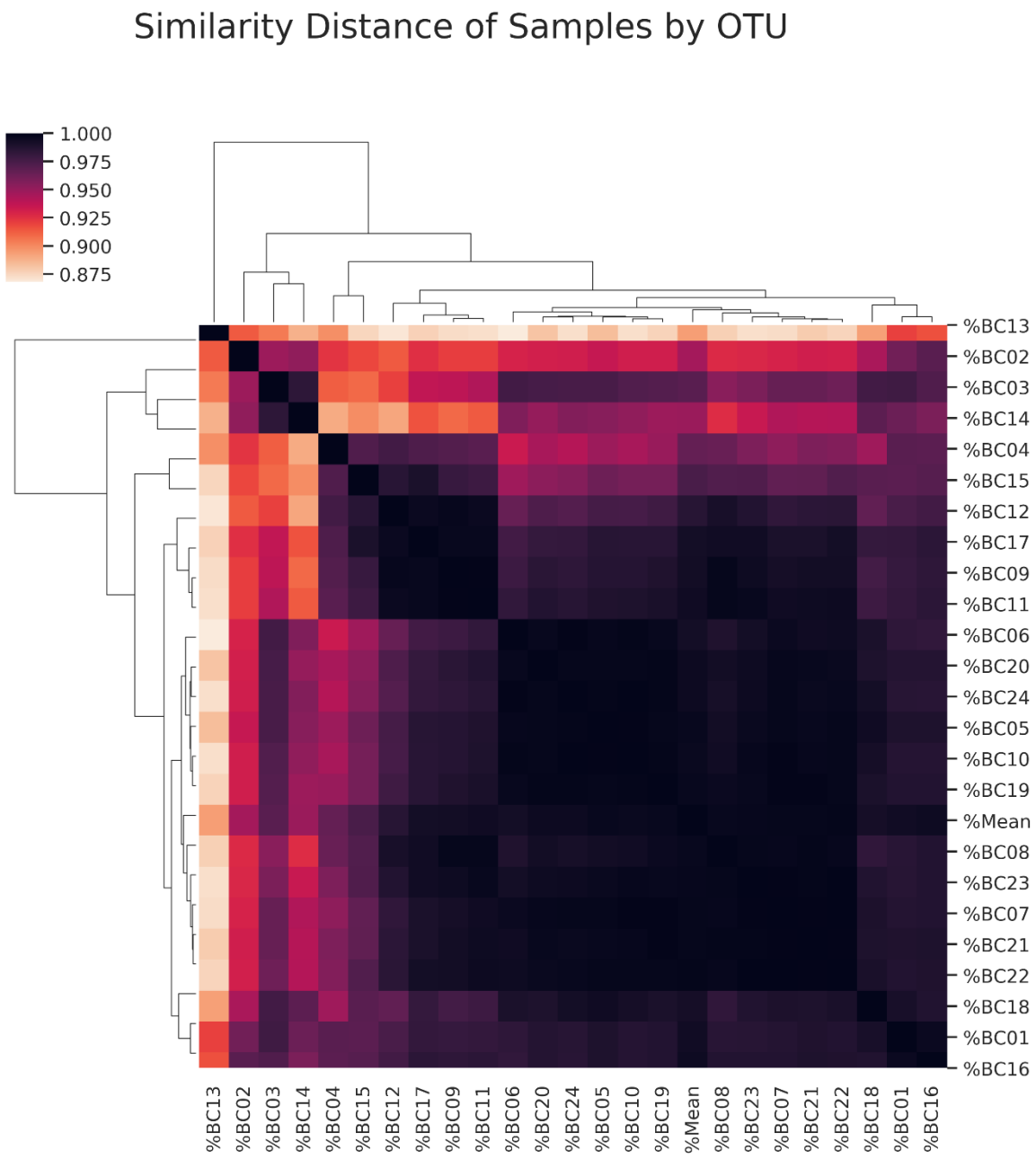

# of Taxonomic Classification Sample BC20
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
20
25
46
105


# of Taxonomic Classification Sample BC21
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
10
22
26
48
108

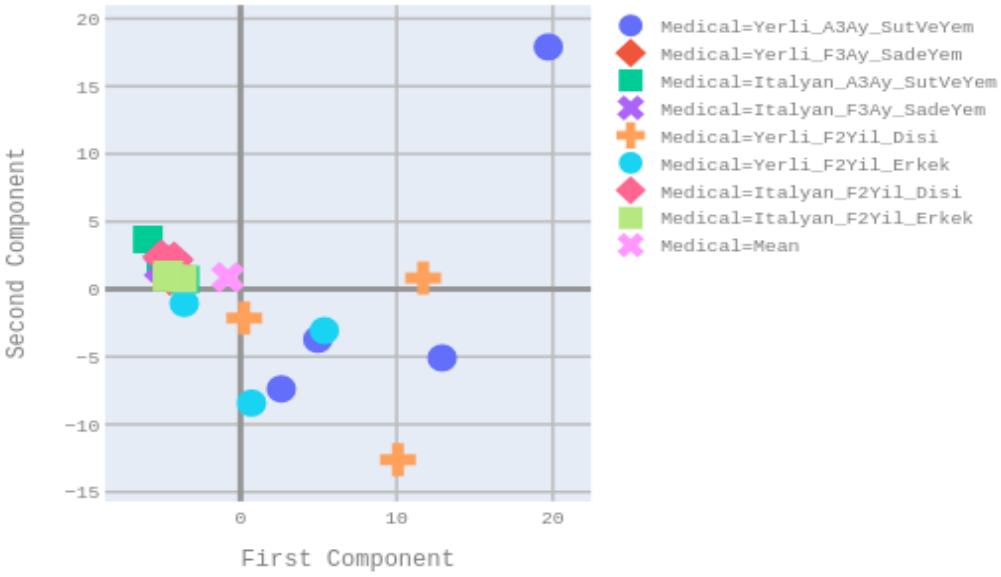

# of Taxonomic Classification Sample BC22
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
10
20
24
43
100

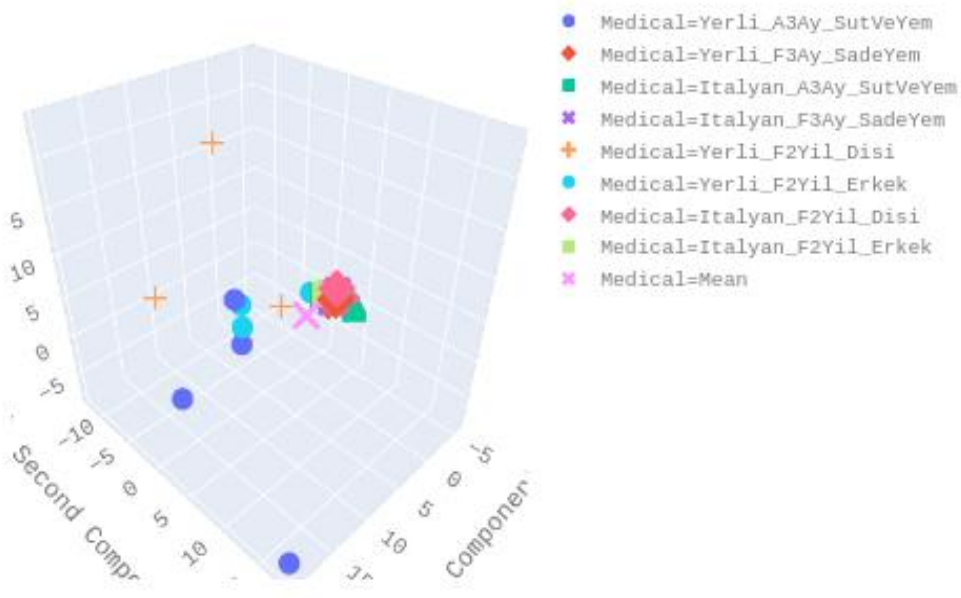

# of Taxonomic Classification Sample BC23
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
19
21
40
97


# of Taxonomic Classification Sample BC24
Domain
Phylum
Class
Order
Family
Genus
1
8
20
25
45
113

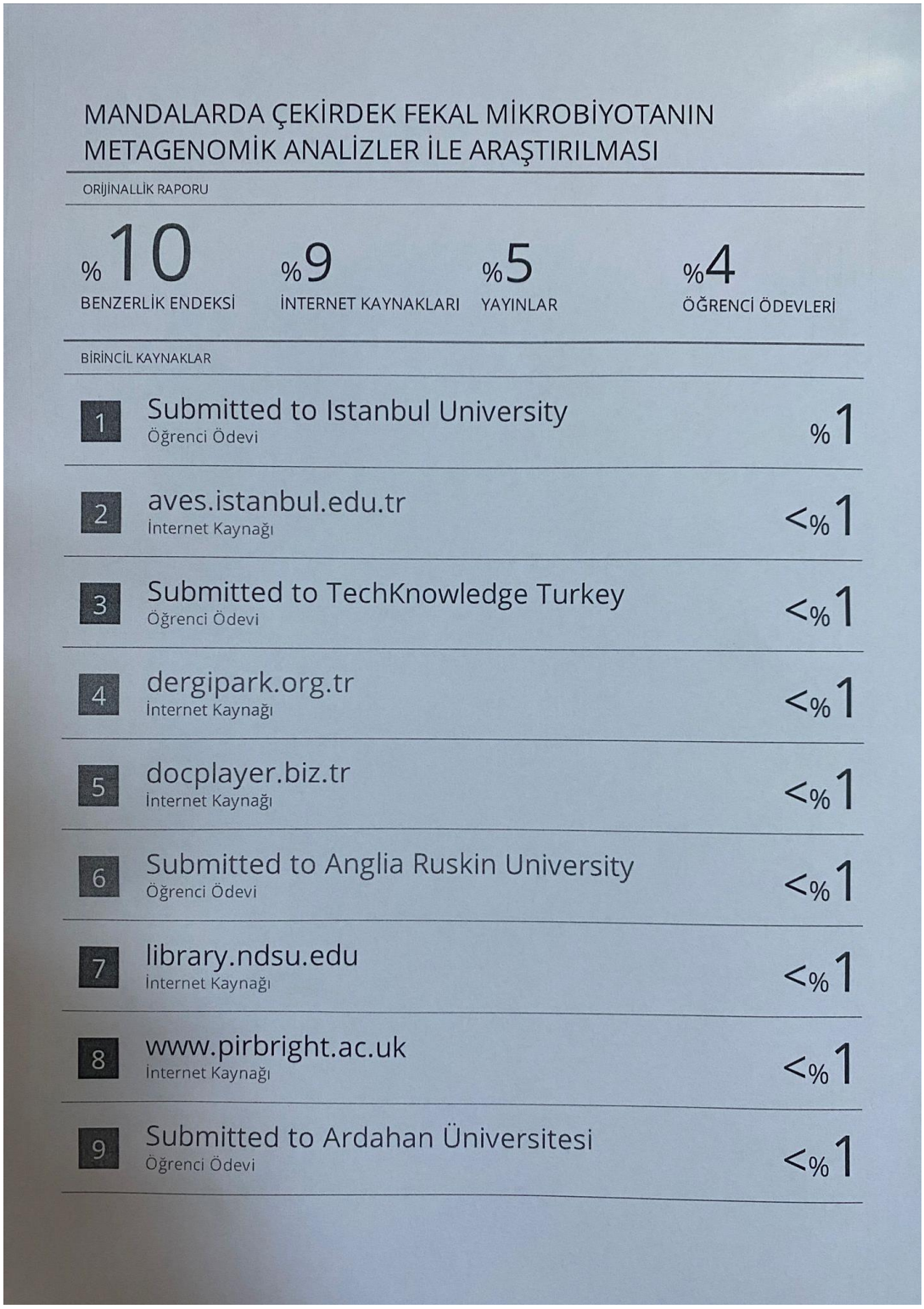

Similarity Distance of Samples by OTU
1.000
0.975
0.950
0.925
0.900
0.875
%BC13
%BC02
%BC03
%BC14
%BC04
%BC15
%BC12
%BC17
%BC09
%BC11
%BC06
%BC20
%BC24
%BC05
%BC10
%BC19
%Mean
%BC08
%BC23
%BC07
%BC21
%BC22
%BC18
%BC01
%BC16

Örneklerin cins düzeyinde 2 boyutlu ve 3 boyutlu PCA grafikleri:





İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



MANDALARDA ÇEKİRDEK FEKAL MİKROBİYOTANIN METAGENOMİK ANALİZLER İLE ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%5	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	aves.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Anglia Ruskin University Öğrenci Ödevi	<%1
7	library.ndsu.edu İnternet Kaynağı	<%1
8	www.pirbright.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
9	Submitted to Ardahan Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1