



**T.C.**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU**

**RODENT TÜRLERİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI'NIN MOLEKÜLER  
TANIMLAMA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENECEK HAYVANLARDA  
EKOLOJİK VE TIBBİ ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Doç.Dr. Tuba YAĞCI**

**PROJE NOSU: 2019-01.BŞEÜ.01-01**

**ARAŞTIRMACILAR:**

**1- Dr. Öğr. Üyesi Rafiq GURBANOV**

**2- Uygur KABAOĞLU**

**BAŞLAMA TARİHİ: 20-06-2019**

**BİTİŞ TARİHİ: 20-12-2020**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLECİK, 2021**



**T.C.**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU**

**RODENT TÜRLERİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI'NIN MOLEKÜLER  
TANIMLAMA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENECEK HAYVANLARDA  
EKOLOJİK VE TIBBİ ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Doç.Dr. Tuba YAĞCI  
PROJE NOSU: 2019-01.BŞEÜ.01-01**

**ARAŞTIRMACILAR:**

- 1- Dr. Öğr. Üyesi Rafiq GURBANOV**
- 2- Uygur KABAOĞLU**

**BAŞLAMA TARİHİ: 20-06-2019**

**BİTİŞ TARİHİ: 20-12-2020**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLECİK, 2021**

## ÖZET

Memeliler yaşamları boyunca mikrobiyota olarak adlandırılan çeşitli mikroorganizmalar ile simbiyotik bir ilişki içerisinde. Bağırsak mikrobiyotasının gelişimi, diyet ve yaşam tarzı dâhil olmak üzere konak ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimle düzenlenir. Bu çalışmada kentsel ve kırsal olmak üzere farklı ekolojik çevrelerde yaşayan memelilerin bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin detaylı olarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Amaçlarımız doğrultusunda, Bilecik ilinin kentsel ve kırsal alanlarından yakalanan *Rattus rattus* türüne ait yabanıl ve laboratuvar ratlarının bağırsak mikrobiyotasındaki tüm taksonomik değişimler 16S rRNA yeni nesil dizileme tekniği ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak 3 farklı yaşam alanından alınan bağırsak mikrobiyotasında yaklaşık 2000 farklı bakteri türü tanımlanmıştır. Tüm bakteri türlerinde hesaplanan Shannon ve Simpsons değerlerine göre laboratuvar ratları en yüksek tür çeşitliliği göstermiştir. Mikrobiyota profillerinin benzerlikleri pCoA tekniği ile karşılaştırıldığında mikrobiyotayı oluşturan türlere ait bakteri popülasyonları farklı habitatlarda değişkenlik sergilemiştir. Gruplar arasındaki tür zenginliği tür seyreltme tekniği ile karşılaştırıldığında ise kırsal yaşam alanı başta olmak üzere tüm yabanıl ratlardaki toplam farklı tür sayısı laboratuvar ratlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Besin çeşidinin artması mikrobiyotada tür zenginliğinin artmasına neden olurken tür çeşitliliği diğer ekolojik faktörlerin etkisiyle azalmaktadır. Ayrıca filogenetik ilişkiler üzerinde durulmuş bu amaçla *N.xanthodon* (2n=60,54), *Mus musculus* türleri arasındaki mikrobiyotadaki farklılar tespit edilmiştir. Son olarak ratlarda bağırsak mikrobiyotasının kolorektal kansere yatkınlık üzerindeki etkisini belirlemek üzere; Pten/Mtor/Akt sinyal yolağındaki gen ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve Pten gen ekspresyon seviyesinin kırsal yaşam alanından alınan ratlarda yukarı regülasyonu ile açıklanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bağırsak mikrobiyotası, Habitat farklılıkları, Filogenetik, Yeni Nesil Dizileme, Pten, Mtor, Akt.

## **TEŐEKKÖR**

Bu projenin gerçekleŐtirilmesi için mali destek sağlayan Bilecik Şeyh Edebalı  
Öniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teŐekkÖr ederim.

Doç.Dr. Tuba YAğCI

## İÇİNDEKİLER

### İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)'un Habitat ve Besin Tercihi .....	5
2.2. Ağır Metallerin Mikrobiyaya Üzerine Etkisi.....	6
2.3. Zirai İlaçların Mikrobiyota Üzerine Etkisi .....	8
2.4. Bağırsak Mikrobiyotasında Yaygın Olarak Bulunan Bakteriler.....	9
2.4.1. Bacteroidetes .....	9
2.4.2. Firmicutes .....	10
2.4.3. Proteobacteria.....	10
2.4.4. Aktinobacteria.....	11
2.4.5. Verrucomicrobia.....	11
2.4.6. Spirochaetes .....	12
2.4.7. Synergistia .....	12
2.4.8. Mollicutes .....	13
2.4.9. Fusobacteria .....	13
3. MATERYAL VE METOT .....	13
3.1. Hayvan örneklerinin hazırlanması .....	13
3.2. Analiz Adımları.....	14
3.2.1. Örneklerden DNA izolasyonu.....	14
3.2.2. 16s rRNA V3-V4 bölgesinin amplifikasyonu.....	14
3.2.3. Kütüphane hazırlama ve dizileme işlemi.....	14
3.2.4. Ham verinin biyoinformatik analizi .....	14
3.2.5. Raporlama.....	14
3.3. Kolorektal kanser ile ilişkili gen ekspresyonlarının analizi.....	14
3.3.1 Doku örneklerinin hazırlanması .....	14
3.3.2. RNA İzolasyonu.....	15

3.3.3 cDNA Eldesi .....	15
3.3.4 Real Time PCR Protokol .....	16
3.3.5 Real Time PCR verilerinin İstatistiksel İncelenmesi .....	17
4. BULGULAR .....	18
4.1. Rat Gruplarında Belirlenen Tür Seviyesinde Taksonomik Dağılımlar .....	18
4.2. Rat Gruplarında Belirlenen Diğer Taksonomik Dağılımlar .....	21
4.3. Rat Gruplarında Bakteriyal Çeşitlilik Analizleri.....	30
4.4. Rat Gruplarında Belirlenen Mikrobiyota Profilleri.....	31
4.5. Farklı Memeli Gruplarında Belirlenen Taksonomik Dağılımlar .....	34
4.6. Farklı Memeli Gruplarında Bakteriyal Çeşitlilik Analizleri.....	38
4.7. Diğer Memeli Gruplarında Belirlenen Mikrobiyota Profilleri.....	40
4.8. Kolorektal Kansere İlişkili Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi.....	43
5. TARTIŞMA.....	44
5.1. Türlere Göre Mikrobiyotadaki Değişimler.....	44
5.1.1. Kentsel alanlarda yaşayan <i>Rattus rattus</i> 'da bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi.....	44
5.1.2. Kırsal alanlarda yaşayan <i>Rattus rattus</i> 'da bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi.....	47
5.1.3. Laboratuvar ratlarının bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi .....	48
5.2. Rat gruplarında Diğer Taksonomik Birimlere Göre Mikrobiyotadaki Değişimler .....	50
5.3. Filogenetik ve Mikrobiyal Değişimler .....	52
5.4. Kolorektal ilişkili Genler .....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	55
7. KAYNAKLAR.....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Tablo 1</b> Tür seviyesinde taksonomik dağılımlar. RH1: Rattus rattus Habitat1 (Kentsel yaşam) RH2: Rattus rattus Habitat 2 (Kırsal yaşam), RD: Rattus rattus Laboratuvar hayvanı.....	18
<b>Tablo 2.</b> Tür seviyesinde çeşitliliği gösteren Shannon ve Simpsons hesaplamalarının değerleri.....	21
<b>Tablo 3.</b> Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Alem düzeyindeki taksonomik dağılımı. ....	22
<b>Tablo 4.</b> Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Şube düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı. ....	22
<b>Tablo 5:</b> Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Sınıf düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı. ....	24
<b>Tablo 6.</b> Tüm gruplarda mikrobiyota içeriğinin Takım düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı. ....	26
<b>Tablo 7.</b> Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Aile düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı. ....	27
<b>Tablo 8:</b> Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Cins düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı. ....	27
<b>Tablo 9</b> Tür seviyesinde çeşitliliği gösteren Shannon ve Simpsons hesaplamalarının değerleri.....	37
<b>Tablo 10</b> <i>N. xanthodon</i> ve <i>Mus musculus</i> örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının (Alem-Şube-Sınıf) taksonomik dağılımları.....	37
<b>Tablo 11</b> . <i>N. xanthodon</i> ve <i>Mus musculus</i> örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının (Takım-Aile-Cins) taksonomik dağılımları.....	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1 Real time PCR verilerinin standardize edildiği Üç farklı primer standart grafiği ve grafik eğimi (R2 doğruluk payını göstermektedir). .....	17
Şekil 2. Kentsel yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> grubuna ait en yüksek 10 bakteri türün yüzdelik dağılım grafiği. ....	19
Şekil 3. Kırsal yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> (RH2) grubuna ait en yüksek 10 bakteri türünün yüzdelik dağılım grafiği. ....	20
Şekil 4. Laboratuvar ratları (RL) grubuna ait en yüksek 10 bakteri türünün yüzdelik dağılım grafiği. ....	20
Şekil 5. Kentsel yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> grubuna ait Şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzdelik dağılım grafiği. ....	23
Şekil 6. Kırsal yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> grubuna ait Şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzdelik dağılım grafiği. ....	23
Şekil 7. Laboratuvar ratları (RL) grubuna ait şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği. ....	24
Şekil 8 Grupların Proteobakteri alt sınıflarına göre yüzde dağılım grafiği. ....	25
Şekil 9 <i>Rattus rattus</i> Habitat 1 (Kentsel yaşam) grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği. ....	28
Şekil 10 <i>Rattus rattus</i> Habitat 2 (Kırsal yaşam) grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği. ....	29
Şekil 11 <i>Rattus rattus</i> Laboratuvar hayvanı grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği. ....	29
Şekil 12. Grup içerisindeki mikrobiyota tür çeşitlilik eğrisi. ....	30
Şekil 13. Gruplardaki tür çeşitliliğini anlamlandırarak pCoA Plot tekniği ile oluşturulan benzerlik grafiği. ....	31
Şekil 14. OTU'ların okunma tekrarına göre farklı türlerin miktarını gösteren Tür seyreltme eğrisi. ....	31
Şekil 15. Kentsel yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> (RH1) grubunda mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram. ....	32
Şekil 16. Kırsal yaşam alanından alınan <i>Rattus rattus</i> (RH2) grubunda mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram. ....	33
Şekil 17. Laboratuvar ratları grubunda (RL) mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram. ....	34
Şekil 18 <i>Nannospalax xanthodon</i> (2n=60 ve 2n= 52) örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının tür seviyesinde taksonomik dağılımları. ....	35
Şekil 19 <i>Mus musculus</i> örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının tür seviyesinde taksonomik dağılımları. ....	36
Şekil 20 Grup içerisindeki mikrobiyota tür çeşitlilik eğrisi. ....	39
Şekil 21 Gruplardaki tür çeşitliliğini anlamlandırarak pCoA Plot tekniği ile oluşturulan benzerlik grafiği. ....	39
Şekil 22 OTU'ların okunma tekrarına göre farklı türlerin miktarını gösteren Tür seyreltme eğrisi. ....	40
Şekil 23 <i>N. xanthodon</i> , 2n= 60' da mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram. ....	41

<b>Şekil 24</b> <i>N. xanthodon</i> , 2n= 52' de mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram.....	42
<b>Şekil 25</b> <i>M. Musculus</i> ' da mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram.....	43
<b>Şekil 26</b> Kolorektel kanser ile ilişkili genlerin ( <i>Pten</i> , <i>Mtor</i> , <i>Akt</i> ) Rat gruplarının bağırsak epitel dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri. ....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

- °C: Derece Celsius (Sıcaklık birimi)  
♂ : Erkek birey (cinsiyet)  
ul : Mikrolitre (birim)  
*mM*: Minimolar (birim)  
*g* : Merkezkaç kuvvetinin ölçüm birimi  
≈ : Yaklaşık olarak eşittir

### Kısaltmalar

- RH1 : Rattus rattus Habitat 1 (Kentsel yaşam alanından alınan örnekler)  
RH2 : Rattus rattus Habitat 2 (Kırsal yaşam alanından alınan örnekler)  
RL : Rattus sp. Laboratuvar (Laboratuvar ortamında yetiştirilen örnekler)  
rRNA : Ribozomal ribonükleik asit  
DNA : Deoksiribonükleik asit  
FASTQ : Sekanslama dizilerinin hata oranı ile ifade eden yazım formatı  
OTU : Sekanslama ile oluşturulan anlamlı dizi parçaları  
V3-V4 : 16S rRNA ekzon bölgeleri  
dNTP : Deoksiribonükleozit trifosfat

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rodentia, 2000'den fazla türden oluşan en büyük memeli takımıdır ve tüm memelilerin yaklaşık %42' sini içermektedir (Carleton ve Musser, 2005). Bu hayvanlar kara, ağaç, toprak altı ve yarı sucul gibi çok farklı habitatlarda yayılış gösterirler (Yiğit vd., 2006). Farklı çevresel koşullara karşı göstermiş oldukları güçlü çevresel duyarlılıkları ve adaptif kapasiteleri nedeniyle kilit ekolojik gruplar olarak biyolojik araştırmalarda dikkat çekmektedir (Liu, 2019). Doğal rodent popülasyonları ile ilgili yapılan saha çalışmalarında bazı kemirgenlerin mükemmel paraziter hastalık modelleri veya insanları enfekte eden doğal virüs konakçıları oldukları bulunmuştur. Bazı türler ise yaşlanma, kanser veya metabolik hastalıklar için onları önemli modeller haline getiren benzersiz özelliklere sahiptir (Donnely vd., 2015).

Son yıllarda bağırsak mikrobiyomunun insan psikolojisi ve metabolizması üzerinde şaşırtıcı etkilerini ortaya çıkaran araştırmalarda in vivo modeller olarak zebra balığı, *Caenorhabditis elegans* (nematod), *Drosophila melanogaster* (insect)' in yanı sıra fareler ve sıçanlar yaygın olarak kullanılan rodentlerdir (Wei vd., 2018, Lict ve Bahl, 2019). İnsan bağırsak mikrobiyotasında Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes, VadinBE97 olmak üzere toplam 9 bakteri çeşidi tanımlanmıştır. İnsan ve fare mikrobiyotası Fusobacteria' lar dışında mikrobiyal çeşitlilik bakımından benzerlik göstermektedir. Firmicutes ve Bacteroidetes'ler memeli bağırsak mikrobiyotası için baskın türlerdir (Backhed et al., 2005). Hayvan modelleri, mikrobiyotayı değiştirici faktörlerin olumsuz etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir araç oluşturmaktadır (Chung vd., 2012). Bağırsakta meydana gelen mikrobiyal değişikliklerin insanlarda nörolojik hastalıklardan metabolik ve kardiyovasküler hastalıklara ayrıca kanser ve gastrointestinal rahatsızlıklara kadar etkili olması mikrobiyota araştırmalarını ilgi odağı haline getirmiştir (Helmink vd., 2019). Ekolojik ve evrimsel kuvvetler bağırsak mikrobiyotasının mikrobiyal çeşitliliği ile ilişkilendirilen güçlü hipotezlerdir. Bu araştırmada farklı yaşam alanlarından alınan doğal rodent popülasyonlarının (*Rattus rattus*) bağırsak mikrobiyotası, 16S rRNA yeni nesil dizileme tekniği ile tespit edilerek "Ekolojik faktörler ve Mikrobiyota" arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca filogenetik açıdan mikrobiyotada meydana gelen çeşitliliği araştırmak amacı ile *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Nannospalax*

*xanthodon* türünün iki kromozomal formu ( $2n=60$ ,  $2n=52$ ) mikrobiyal açıdan incelenmiştir. Son olarak kolorektal kanser (CRC) ile ilişkili olduğu bilinen genlerin iki farklı habitattan alınan ratlarda ekspresyon seviyeleri araştırılarak bağırsak mikrobiyotasının CRC oluşumunda ve önlenmesindeki etkisi bir ön çalışma niteliğinde çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Gelişmiş organizmalar, çoğunluğunu farklı türde bakterilerin oluşturduğu aynı zamanda mantar, virüs ve diğer tek hücrelileri de içeren çeşitli mikroorganizmalara ev sahipliği yapar. Bu organizmalar yararlı bakterilerle uyumlu, dengeli bir yaşam sürdürmektedir. İnsan ve birçok memelinin ev sahipliği yaptığı mikroorganizmaların oluşturduğu topluluğun tümüne Mikrobiyota, bu topluluğun toplam gen yapısı ve etkileştiği çevreye ise Mikrobiyom adı verilir (Cénit vd., 2014; Walker vd., 2013). Memeli mikrobiyotası deri, üreme organları, solunum ve yaygın olarak bağırsak sisteminde yerleşmiştir. Memeli organizmalarda en yoğun ve en çeşitli mikroorganizma topluluğunun barınmasında bağırsakların kıvrımlı yapısı ve zengin besin içeriğine sahip olması etkilidir (Yılmaz vd., 2017). Bu bakteriler vitaminleri, aminoasitleri ve kısa zincirli yağ asitleri gibi metabolitleri sentezler (Bull vd., 2014). Bu nedenle, bağırsak mikrobiyal topluluklarının karakterizasyonu, sağlık ve hastalıkta konak-mikrop etkileşiminin anlaşılmasında büyük öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar bağırsak mikrobiyomundaki bozulmaları otizm, depresyon, şizofreni, obezite, tip 2 diabetes mellitus, romatoid artrit gibi çeşitli metabolik ve komorbid nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirmiştir (Grochowska vd., 2018; Shreiner vd., 2015). Bu nedenle mikrobiyal topluluğun gelişimi, sağlıklı bir yaşamın bütün evrelerinde büyük bir öneme sahiptir (Gensollen vd., 2016). Bağırsak mikrobiyotasının gelişimi, diyet ve yaşam tarzı dahil olmak üzere konak ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimle düzenlenir (Rothschild vd., 2018). Bağırsak mikrobiyotasının doğumdan yaşlılığa kadar dinamikleri, bu topluluğun konak içindeki değişkenliğine ve hastalık riskleri ile olası ilişkilere ışık tutabilir (Bäckhed vd., 2015). Sağlıklı bireylerde mikrobiyota, doğum şeklinin bile etkilediği ve doğumdan sonra ekolojik çevre ile olan etkileşime bağlı olarak oluşmaya başlar (Wopereis vd., 2014). Mikrobiyotanın olgunlaşma sürecinde beslenme, genetik faktörler, yaş ve yaşanan coğrafik bölgeler etki göstermektedir (Flandroy vd., 2018). Ortamdaki etkenlerden

kaynaklanan çevresel mikrobiyota bağırsak mikrobiyotasıyla etkileşime girip onu destekleyebildiğinden, farklı ortamlar ve karakteristik mikrobiyotlar nörogelişim ve zihinsel sağlığı etkileme potansiyeline sahiptir (Rook, 2013).

İlk yaşlardan itibaren oluşmaya başlayan bağırsak mikrobiyotasının fizyolojik, metabolik ve bağışıklık sistemi üzerinde oldukça karmaşık ve aktif görevler üstlendiği tahmin edilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık sisteminin bakteriler ile ilk defa tanışmasını ve daha sonra bakterilere karşı kullanılmak üzere hafıza hücreleri (B lenfositler) oluşmasında büyük bir etkidir (Chow vd., 2010; Björkstén vd., 2001). Böylece bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri türlerine karşı bağışıklık kazanılarak bağışıklık sistemi güçlendirilir. Gelişen bağışıklık sistemi yararlı ve zararlı bakterileri birbirinden ayırt edebilir. Böylece denge içerisinde uyumlu bakterilere tolerans gösterilirken, hastalık oluşturanlara karşı savunma yanıtı verilir. Bağırsak mikrobiyotası bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını, besin emilimini ve metabolizmayı etkiler, patojen kolonizasyonunu önler (Vrieze vd., 2010; Belkaid vd., 2014). Araştırmacılar bağırsak mikrobiyotası dengesizliğinin genellikle enerji metabolizması, besin emilimi ve bağışıklık sistemi bozuklukları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2015; Jin vd., 2015). Stresin bağırsak bariyer fonksiyonunu önemli ölçüde etkilediği, bağırsak geçirgenliği ve sistemik inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (Lambert, 2009). Örneğin, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bağırsak mikrobiyotası, konak immün tepkisi ve indol türevleri gibi aromatik aminoasit metabolitlerinin epitel bariyer bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Maslowski vd., 2009; Bansal vd., 2010). Prebiyotikler ve probiyotikler, mikrobiyotayı normalleştirmek ve intestinal bariyer fonksiyonunu iyileştirmek için umut verici bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Russo vd., 2012; Wilms vd., 2016). Mikrobiyotanın yetişkinlerde, aşırı bir dış stres etkeni olmadan (örneğin diyet değişiklikleri veya antibiyotik tedavisi) nispeten stabil ve esnek olduğu önerilmiştir (Faith vd., 2013; Rajilić-Stojanović vd. 2013). Mikrobiyotadaki bu esneklik, bir stres etkisi sona erdiğinde ilk durumuna dönmesini sağlar (Palleja vd., 2018). Moleküler temelli mikrobiyal araştırmalar, mikrobiyal ekolojiye bakış açısını büyük ölçüde artırmış ve mikrobiyotadaki değişkenlikle ilgili dış faktörlerin tanımlanmasını hızlandırmıştır (Falony vd., 2016). Louis Pasteur, mikropsuz yaşamın imkânsız olduğunu düşünürken (Pasteur, 1885), bugün mikropsuz farelerin bazı çalışmalar için uygun olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, mikropsuz fareler adı verilen aksenik fareler, konakçı ve

bağırsaktaki bakteriler arasındaki etkileşimi incelemek için yararlı araçlar sağlar (Smith vd., 2007; Yi vd., 2012). Bununla birlikte, mikropsuz hayvanlar, geleneksel spesifik patojen içermeyen (SPF) bireylerden fizyolojik olarak farklıdır ve bu nedenle ksenobiyotiklerin in vivo kullanımında farklılıklar gösterir (Ilett vd., 1990). Bağırsak mikrobiyotasının ağır metaller de dahil olmak üzere çevresel kirleticilerin biyoyararlanımı ve toksisitesinin önemli bir aracı olması muhtemeldir (Breton vd., 2013). Mikrobiyota kendi başına bağırsak içindeki metallerle ya da, aktif alım yoluyla, pasif taşıma veya emme yoluyla etkileşime girebilir (Morozzi vd., 1986; Halttunen vd., 2008). Oral yolla alınmış toksik metallerin girişini kontrol eden bağırsak bariyer bütünlüğü, epitelyal ve mukoza tabakasının fiziksel engellerini içeren bir yapı olarak mikrobiyota konakçı etkileşimlerinde önemli bir yere sahiptir. Bağırsak mikrobiyotası ve metabolitleri, pH, oksidatif denge, detoksifikasyon enzimleri, ksenobiyotik-metabolize eden ve konakçı proteinlerin taşınması gibi çevresel parametreleri de etkileyen önemli faktörlerdir (Claus vd., 2011). Mikrobiyal araştırmaların büyük bir çoğunluğunda, kemirgen hayvanların dışkı mikrobiyomu yüksek verimde sekanslama teknikleri ile analiz edilerek bağırsak mikrobiyotası üzerinde kontaminantların etkisi belirlenmiştir (Brinkman vd., 2011; Breton vd., 2013). Laboratuvar hayvanlarında (*Rattus rattus*, *Mus musculus* vb.) diyet uygulaması ile gerçekleştirilen bu araştırmalarda ağır metaller gibi inorganik ya da pestisitler gibi organik kirleticilerin mikrobiyota üzerine etkisi incelenmiştir (Sizentsov vd., 2019; Breton vd., 2013; Fang vd., 2018; Fazeli vd., 2010; Feng vd., 2017; Jaeggi vd., 2015). Son yıllarda bağırsak mikrobiyomunun insan psikolojisi ve metabolizması üzerinde şaşırtıcı etkilerini ortaya çıkaran araştırmalarda ise in vivo modeller olarak zebra balığı, *Caenorhabditis elegans* (nematod), *Drosophila melanogaster* (insect)' in yanı sıra fareler ve sıçanlar yaygın olarak kullanılan rodentlerdir (Wei vd., 2018; Lict and Bahl, 2019). İnsan bağırsak mikrobiyotasında Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes olmak üzere toplam 8 bakteri grubu tanımlanmıştır. İnsan ve fare mikrobiyotası Fusobacteria' lar dışında mikrobiyal çeşitlilik bakımından benzerlik göstermektedir. Firmicutes ve Bacteroidetes'ler memeli bağırsak mikrobiyotası için baskın türlerdir (Backhed vd., 2005). Hayvan modelleri, mikrobiyotayı değiştirici faktörlerin olumsuz etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir araç oluşturmaktadır (Chung vd., 2012).

## 2.1. *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758)'un Habitat ve Besin Tercihi

*Rattus* cinsinin üyeleri yaklaşık üç milyon yıl önce Pliyosen döneminde ortaya çıkmış ve Güneydoğu Asya'ya dağılmıştır (Aplin vd., 2003). Geniş habitat çeşitliliğinde yaşamaya adapte olabilmeleri, onların sonraki zamanlarda Antartika hariç her kıtada ve tüm habitat tiplerinde yayılmalarını sağlamıştır (Lund, 1994). *Rattus* (Fischer, 1803) cinsi, 66 türe sahip olup memelilerin en büyük kemirgen cinsini oluşturur (Musser & Carleton, 2005). Bu türler arasında insanlarla yakın ilişkili “kommensal tür” ler olarak bilinen *R. exulans*, *R. nitidus* ve *R. turkestanicus* esas olarak Orta ve Güneydoğu Asya'da bulunurken, *R. norvegicus* ve *R. rattus*'un dağılımı neredeyse dünya çapındadır (Aplin vd., 2003). Türkiye’de *Rattus rattus* (Siyah sıçan) ve *R. norvegicus* (Kahverengi sıçan) olmak üzere iki tür bulunmaktadır (Yiğit vd., 1998). *R. rattus* ve *R. Norvegicus* nadiren yaban hayatında bulunan ve insanlarla birlikte yaşama yakınlığı diğer türlere göre çok daha fazla olan türlerdir (Feng ve Himsforth, 2014). Siyah sıçanlar kentsel alanlarda depolar, konutlar ve diğer insan yerleşim yerlerinin etrafında (binaların çatıları, asma tavan araları, duvar boşlukları, yer altı tünelleri) bulunurlar (Dowding vd., 1994; Bennet vd., 2011). Kırsal alanlarda ise çiftlikler, ahır ve mahsullerin depolandığı odalar gibi alanlar onların besin ihtiyacına uygun yerlerdir (Yabe vd., 1979; Nowak, 1999). Kırsal bölgelerde yaşayan ratlara kıyasla, kentsel ratlar genellikle daha yüksek bir büyüme oranına sahip ve cinsel olgunluğa daha hızlı bir şekilde ulaşır (McGuire vd., 2006). Tipik bir yetişkin siyah sıçan 15 ila 22 cm vücut boyu, 12.75 ila 18.25 cm tam boy uzunluğundadır. Vücut ağırlığı ise alt türlere bağlı olarak 75 ila 230 g arasında değişmektedir (Schwartz vd., 2001; Gillespie, 2004,). Hem kentsel hem de kırsal sıçanlarda, büyüme hızı yaşla birlikte azalır, ancak ergin kentsel sıçanlar yaşlandıkça kütle kazanmaya devam ederken, ergin kırsal sıçanlar ya aynı ağırlıkta kalır ya da kilo verir. Davis (1949), hem kentsel hem de kırsal popülasyonlara ait bireylerin aynı diyetle beslendiğinde aynı oranda büyüdüğünü ve aynı boyuta ulaştığını göstermiştir. Büyüme ve olgunlaşma oranları, değişken kaynak bolluğunun bir fonksiyonu olarak şehirlerarasında ve şehir içindeki farklı alanlar arasında değişebilmektedir (Glass vd., 1988). Siyah sıçanların doğal besin kaynağını salyangozlar, eklembacaklılar, mantarlar, tohumlar, yapraklar, meyveler, çiçekler, ağaç kabuğu ve saplar gibi besinler oluşturmaktadır (Clark, 1980; Marsh, 1994). Bozkır alanlarda yaşayan *R. rattus*'un mide içeriğinde %70 meyveler, % 15 eklembacaklılar, % 8 tohumlu meyveler, % 2 kök, % 1 çiçek, % 1 çimen yaprağı ve iz besinler olarak (= < % 1) çeşitli tohumlar ve yapraklar tespit edilmiştir (Clark vd., 1982). Ancak sıçanlar çok çeşitli

yiyeceklere adapte olabildikleri için besin tercihi büyük ölçüde mevcudiyetle belirlenir. Örneğin, kentsel yaşam durumunda doğal besin bulamayan sıçanlar için çöpte bulunan çürümüş yiyecekler bir besin kaynağıdır (Glass vd., 1988; Traweger ve Slotta-Bachmayr, 2005). Kemirgenlerin birincil besin kaynağı olan bitki örtüsü ve omurgasızlardaki kirletici konsantrasyonları dikkate alınarak yapılan araştırmalar çevre kirliliği hakkında önemli bilgiler sağlanmıştır (Pereira vd., 2006). Karasal yaşam alanlarda rat ve fareler başta ağır metal olmak üzere inorganik kirleticiler, radyoaktif kirleticiler ve organik kirleticilerin oluşturdukları çevre kirliliğini ortaya çıkarmak için biyomonitör olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Wünschmann, 2002; Jankovska vd., 2009).

## **2.2. Ağır Metallerin Mikrobiyata Üzerine Etkisi**

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda özellikle ağır metallerin küçük memeli mikrobiyotasında önemli değişikliklere neden olduğu kaydedilmiştir. Breton vd. (2013), düşük konsantrasyonlarda (10 veya 20 mg / kg) ve yüksek konsantrasyonlarda (100 mg / kg) kadmiyum'a (Cd) maruz bırakılan sıçanlarda Firmicutes'in Bacteroidetes'e oranının önemli ölçüde azaldığını kaydetmiştir. Kadmiyum ile muamele edilmiş sıçanlarda, Bifidobacteri ve Lactobacilli gibi faydalı bakterilerin yoğunluğu önemli ölçüde azalırken, Clostridiales, Prevotella ve S24-7 gibi zararlı bakterilerin yoğunluğu arttırmıştır. Kadmiyum (Cd)'a maruz kalmanın, sıçanların bağırsak kanalındaki mikrobiyom üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir (Liu vd., 2014; Fazeli vd., 2010). Benzer şekilde, Kurşun (Pb) ile muamele edilmiş sıçanlarda, Lactococcus, Enterorhabdus ve Caulobacterales yoğunluğu azalırken kilo ve diğer hastalıklarla ilişkili olan Desulfovibrionaceae, Barnesiella ve Clostridium bakterilerinin yoğunluğu artmıştır (Wu vd., 2016). Krom'a (Cr) maruz bırakılmış sıçanlarda, Bacteroidetes ve Tenericutes oranı artmış ve Firmicutes oranı önemli ölçüde azalmıştır. Ancak Kurşun'a (Pb) maruz kalan sıçanlarda, Bacteroidetes ve Firmicutes oranlarının düştüğü görülmüştür (Wu vd., 2016). Sıçanlarda krom toksisitesinin azaltılması durumunda, probiyotik suşu *L. plantarum* TW1-1'in bağırsak mikrobiyotasının dengesinin korunmasında ve bağırsak bakterilerinin krom azaltma kabiliyetinin artırılmasındaki kritik rolü vurgulanmıştır (Wu vd., 2017.) Probiyotiklerin, ağır metallerin indüklediği bağırsak mikrobiyotasının değişen kompozisyonunu ve fonksiyonunu geri kazanmada rol oynadığını göstermiştir. *L. reuteri* DSM17938 müdahalesi, düşük konsantrasyondaki Nikel (Ni) diyetli sıçanlarda, bağırsak

mikrobiyotası dengesinin restorasyonuna ve laktik asit bakterilerinin (LAB) biyolojik çeşitliliğinin artmasına katkıda bulunmuştur (Randazzo vd., 2014). Ağır metallerin toksisitesini azaltmak için kullanılan probiyotikler genellikle *Lactobacil*'dir (Monachese vd., 2012). Araştırmalar, *Lactobacilli*'nin akut ve kronik kadmiyum (Cd) toksisitesini azaltabildiğini, organizmaları pestisitlerin toksisitesine karşı koruyabildiğini ortaya çıkarmıştır (Kamaladevi vd.,2016; Trinder vd., 2016). Ayrıca antibiyotiklerin diyare ile ilişkili riskini azaltabileceğini ve bağırsak mikrobiyotasının yeniden dengelediğini göstermiştir (Hempel vd., 2012).

Diyetlerinde yüksek bakır seviyesi içeren (120 veya 240 mg / kg) sıçan gruplarında *Christensenellaceae*, *Lachnospiraceae* ve *Allobaculum*, *Flavonifractor*, *Oscillospira*, *Blautia* bakterilerinin popülasyon yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. *Oscillibacter*, *Anaerotruncus*, *Peptococcus* ve *Dorea* artarken, *Allobaculum*, *Flavonifractor* ve *Oscillospira* bolluğu cins düzeyinde 240 mg Cu / kg grubunda azalmıştır (Feng vd., 2017). Cins seviyesinde, 6 mg Cu / kg gruba kıyasla, yüksek bakır seviyesi içeren (120 veya 240 mg/kg) grupta *Ruminococcaceae*, *Defluviitaleaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* ve *Turicibacter*, *Coprococcus*, *Blautia* familyası ile ilişkili olan çoğu cinsin bolluğu artmıştır (Feng vd., 2017). Bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitesi, kirlenici maddelerin indüklediği toksisitenin neden olduğu doku hasarı ve diğer hastalıklara karşı rol oynamaktadır (Pengya vd., 2019). *Allobaculum*'un dekstran sülfat sodyum kaynaklı inflamasyonu önlediği (Wang, 2015) ve ileal (ileum kaynaklı) bağışıklık markerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Cox vd., 2014). Zackular, (2014), bağırsak mikrobiyotasında *Ruminococcaceae* ve *Lachnospiraceae*'nin artış göstermesinin, bu bakterilerin kolorektal kanserin teşhisinde mikrobiyom biyobelirteçleri olabileceğini bildirmiştir. Mikrobiyal çeşitlilik demir ile indüklenmiş ratlarda önemli ölçüde etkilenmiştir (Fang vd., 2018). Düşük bakteri çeşitliliği ve düşük *Lachnospiraceae*, bağırsak iltihabıyla ilişkili ve kolite yatkınlık belirteci olarak kabul edilmiştir (Lepage vd., 2011; Brinkman vd., 2011). Demir (Fe) mikroorganizmalar için kritik bir mikro besin maddesi olmasına rağmen hayvan çalışmalarında aşırı demir takviyesinin bağırsak mikrobiyotasının disbiyosis'ine neden olduğu gösterilmiştir (Lee vd., 2008; Tompkins vd., 2001). Aşırı serbest demir, oksidatif stresi indükleyebilecek zarar verici serbest radikal türlerin üretimine katılabilir (Papanikolaou vd., 2005). Yapılan çalışmalar yüksek diyet içerikli demirin, sıçan kalın bağırsağında kript hücreleri

proliferasyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğunu göstererek ülseratif koliti şiddetlendirebileceğini ortaya koymuştur (Siegers vd., 1992; Carrier vd., 2006). Ratlarda 24 mg Fe uygulaması Ruminococcaceae UCG-014'ün bolluğundaki önemli bir artış, Lachnospiraceae FCS020 ve Allobaculum'un bol miktarda azalması bağırsak sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmıştır. Aynı zamanda Enterobakterileri arttırdığı ve bağırsak iltihabını indüklediği bildirilmiştir (Jaeggi vd., 2015; Zimmermann vd., 2010). Coprococcus 1' in kontrol grubuna göre görülen anlamlı artışın, büyük olasılıkla metabolik yollarındaki hidrojenazlar gibi demir bağımlı enzimlerden dolayı olduğu görülmüştür (Calusinska vd., 2010).

### **2.3. Zirai İlaçların Mikrobiyota Üzerine Etkisi**

Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriler insektisit direnci ile ilişkilendirilmiştir (Dada vd., 2018). Malathion, diazinon ve glifosat pestisitlerin önemli üç temsilcisidir. Diazinonun bağırsak mikrobiyomu üzerine etkisi cinsiyetlere göre sıçan modellerinde incelenmiştir. Spesifik olarak, Bacteroidaceae, Burkholderiales, Clostridiaceae ve Erysipelotrichaceae'e ait Coprobacillus dâhil olmak üzere birçok bakteri cinsi sadece erkek sıçanlardaki mikrobiyomlarda tespit edilmiştir. Lachnospiraceae, Butyrivibrio, Lachnospiraceae, Shuttleworthia, Staphylococcaceae bakterileri diazinon uygulanmasından sonra erkek sıçanlarda tamamen yok oldukları rapor edilmiştir (Gao vd., 2017). Diğer bir yaygın pestisit türü olan organoklorik pestisit (OCP)'in, hayvanlarda bağırsak florası, lipit metabolizması, doku ve vücut ağırlığına zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Sıçanlarda, organoklorik pestisit; Firmicutes ve Proteobacteria popülasyonlarının artmasına Bacteroidetes, Verrucomicrobia ve Actinobacteria popülasyonunun azalmasına neden olmuştur (Liu vd., 2017). Bir diğer pestisit türü Permetrin, sıçanlarda diyet yoluyla uygulandığında, *Bacteroides prevotella* ve *B. porphyromonas* türlerinin popülasyonunda azalmaya ve fekal mikrobiyotada Enterobacteriaceae ve Lactobacillus'un popülasyonunun artışa neden olmuştur (Nasuti vd., 2016). Sıçanların beslenme kaynağı olan mantarları engellemek için tarımda yaygın olarak kullanılan İmidazol uygulanan sıçanların mikrobiyomunda, Lactobacillus ve Bifidobacterium'un popülasyonu azalırken, Deltaproteobacteria ve Desulfovibrio'nun miktarı İmidazol uygulamasına cevap olarak artmıştır (Kan vd., 2015). Zararlı eklembacaklılara karşı kullanılan bir insektisit türü olan Chlorpyrifos'un sıçanlar üzerinde 9 hafta uygulandıktan sonra bakteriyel cinsler arasında farklı paternler

oluşturularak sıçanlarda bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkiler yarattığı görülmüştür (Fanga vd., 2018). Normal diyet ile beslenen sıçanlarda klorpirif (organofosfat pestisit)'lerden etkilenen 12 bakteri cinsinden belirgin bir şekilde; sadece Sutterella cinsi bakterilerin klorterrifos ile iki kattan daha fazla zenginleştiği görülmüştür. Ayrıca düşük klorpirifos dozu, Allobaculum, Candidatus Saccharimonas, Coprococcus, Anaeroplasm, Roseburia ve Sutterella 'da artışa Pseudoflavonifractor, Anaerosporobacter, Aerococcus, Brevundimonas ve Trichococcus' da azalmaya neden olmuştur (Fanga vd., 2018). Memeliler çevresel kirlenmelere oral, inhalasyon ve deri yolu ile maruz kalmaktadır. Kıl ve deri, kirlenici maddelere karşı önemli bir engel sağlasa da rodentlerin genellikle kontamine olmuş besinler aracılığı ile ağır metaller ve zirai kimyasallara maruz kalmaktadır. Solunum yolu ile maruz kalma ise ancak zamanının çoğunu toprak altında geçiren bazı türler için önemli bir maruz kalma yoludur (Smith vd., 2007; Beernaert vd., 2008).

#### **2.4. Bağırsak Mikrobiyotasında Yaygın Olarak Bulunan Bakteriler**

Memeli mikrobiyotası farklı hayvan türlerinde farklı kompozisyonlara sahip olup anatomik ve beslenme alışkanlıklarına (omnivor, karnivor, herbivor) bağlı olarak oldukça karmaşık ve geniştir (Flemer vd., 2016). İnsan ve sıçanlara ait mikrobiyal sekans verilerine göre her ikisinde de benzer olarak Firmicutes ve Bacteroidetes (% 93) türlerinin baskın olduğu tespit edilmiştir (Lleala vd., 2019). Laboratuvar ratlarının kullanıldığı diğer araştırmalarda da farelere göre rat bağırsak mikrobiyotasının insanlara daha çok benzediği doğrulanmıştır (Albert vd., 2008; Manichanh vd., 2010). Bununla birlikte kentsel yaşam alanlarındaki yabancıl sıçanların patojenik bakteri (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Coccidia* ve *Eimeria* spp., *Leptospira icterohaemorrhagiae*) kaynağı olduğu bilinmektedir (Battersby ve Webster 2001; Guenther vd., 2012; Himsworth vd., 2015).

##### **2.4.1. Bacteroidetes**

Bacteroidetes şubesi, toprakta, çökeltelerde, deniz suyunda, bağırsaklarda ve hayvanların derisi de dâhil olmak üzere çevrede yaygın olarak bulunan üç büyük Gram negatif, şekilsiz, anaerobik veya aerobik ve çubuk şeklindeki bakteri sınıfından oluşur. Bazı Bacteroides türleri fırsatçı patojenler olsa da, birçok Bacteroidetes, gastrointestinal sisteme yüksek oranda bulunan simbiyotik türlerdir. Bacteroidetes bağırsaklarda çok fazla miktarda bulunur. Proteinlerin veya kompleks şeker polimerlerinin parçalanması

gibi konakçı için gerekli olan metabolik dönüşümleri gerçekleştirirler. Anne sütündeki sindirilmeyen oligosakaritler her ikisinin de büyümesini desteklediğinden Bacteroidetes ve Bifidobacterium türleri zaten bebeklerde bulunan gastrointestinalde bulunmaktadır. Böylece spesifik etkileşimler yoluyla konağın immün sistemi tarafından seçici olarak tanınır (Rajilić-Stojanović vd., 2014).

#### **2.4.2. Firmicutes**

Firmicutes çoğu gram-pozitif hücre duvarı yapısına sahip olan bir bakteri şubesini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, Megaspheera, Pectinatus, Selenomonas ve Zymophilus gibi birkaçı, gram-negatif boyanmalarına neden olan gözenekli bir sahte dış zara sahiptir. Genellikle cocci (tekil coccus) veya çubuk benzeri formlarda (basil) hücre yapısına sahiptir. Birçok Firmicute, kurumaya dirençli olan ve aşırı koşullara dayanabilen endosporlar üretir (Ley vd., 2006-a). Çeşitli ortamlarda bulunurlar ve grupta bazı önemli patojenler bulunur. Bu aile üyelerinden heliobakteriler, anoksijenik fotosentez yoluyla enerji üretir. Firmicutes, farenin ve insan bağırsağı mikrobiyomunun en büyük bölümünü oluşturur (Ley vd., 2006-b). Bağırsak florasının bir parçası olarak Firmicutes bölümünün enerji emiliminde rol oynadığı ve potansiyel olarak diyabet ve obezite gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ley vd., 2005). Sağlıklı yetişkin insanların bağırsaklarında, bol miktarda bulunan (toplam bağırsak mikrobiyosunun %5'i) *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), Firmicutes şubesinin bir üyesidir. Bu tür doğrudan obezitede düşük dereceli inflamasyonla ilişkilidir (Chakraborti, 2015). Daha yüksek Firmicute miktarları, farelerde daha fazla yağlanma ve vücut ağırlığı ile de ilişkilendirilmiştir (Turnbaugh, 2008). Spesifik olarak, obez farelerde, Mollicutes sınıfı (Firmicutes şubesi) en yaygın olanıdır. Yüksek Firmicutes bolluğuna sahip olan obez farelerin mikrobiyotası, obez olmayan farelerin bağırsaklarına nakledildiğinde, kontrol grubu mikrobiyotası nakledilenlere kıyasla önemli miktarda vücuttaki yağ oranını artmıştır (Million, 2013).

#### **2.4.3. Proteobacteria**

Proteobakteriler Gram negatif olup (bazıları pratikte Gram pozitif veya Gram değişkeni tarafından boyanabilir) esasen lipopolisakaritlerden oluşan bir dış membrana sahiptir. Flagella kullanımıyla hareket edebilirler ancak bazıları hareketsizdir. Metabolizma türlerinde geniş bir çeşitlilik mevcuttur. Çoğu üye fakültatif veya zorunlu olarak anaerobik, kemolitototopofik ve heterotroftir, ancak çok sayıda istisna ortaya çıkar.

"Proteobakteriler", kadınlarda alt üreme sisteminin mikrobiyota dengesizliği ve iltihap ile ilişkilidir (Bennett, 2015).

#### **2.4.4. Aktinobacteria**

Aktinobakteriler, karasal veya sucul olabilen Gram pozitif bakteri şubesini oluşturur. (Servin vd., 2008). Toprakta, mantarlar gibi davranarak ölü organizmaların organik maddelerinin ayrışmasına yardımcı olurlar. Actinomycetales (actinomycetes), kolonilerin sıklıkla bir mantar gibi geniş miseller oluşturması bu bakteri üyelerinin uzun süre mantar olduğunu düşündürmüştür. Bazı toprak Actinobacteria'ları (Frankia gibi), kökleri toprağı saran bitkilerle simbiyotik olarak yaşar ve bitkinin sakkaritlerine erişim karşılığında bitkiler için nitrojen sağlar. Mycobacterium cinsinin birçok üyesi gibi diğer türler önemli patojenlerdir. Actinobacteria'ya toprakta sağladığı faydanın dışında henüz hakkında çok fazla bilginin bulunmadığı bir gruptur. Birincil olarak toprak bakterileri olarak anlaşılmış olmasına rağmen, tatlı sularda daha fazla bulunabilirler (Ghai vd., 2011). Actinobacteria baskın bakteriyel şubelerden biridir ve en büyük bakteri cinslerinden biri olan Streptomyces'i içerir. Tıbbi veya ekonomik öneme sahip çoğu Actinobacteria, Actinomycetales sınıfına ait, Actinobacteridae alt sınıfındadır. Bazıları insanlarda hastalığa neden olurken, Streptomyces antibiyotik kaynağı olarak dikkat çekmektedir. Actinobacteria'lar, özellikle Streptomyces, tıpta insanlar için faydalı olan birçok biyoaktif metabolitin üreticisi olarak tanınır. Antibakteriyeller, antifungaller, antiviraller, antitrombotikler, immüno-karıştırıcılar, antitümör ilaçlar ve enzim inhibitörleri, insektisitler, pestisitler, herbisitler, antifungal, bitki ve hayvanlar için büyümeyi teşvik edici maddeler dâhil olmak üzere tarımda birçok zirai ilaç üretiminde de kullanılmaktadır (Bressan, 2003, Atta, 2009).

#### **2.4.5. Verrucomicrobia**

Bu şube sadece birkaç tane tanımlanmış tür içerir (Örneğin; *Verrucomicrobium spinosum*). Tespit edilen türler; tatlı su, deniz ve toprak ortamlarından ve insan dışkısından izole edilmiştir. Gametlerinde yaşayan nematodların ekstrüzyon patlayıcı ektosimbiyoları ve endosimbiyomları da dâhil olmak üzere ökaryotik konaklarla birlikte yaşayan henüz laboratuvar şartlarında kültüre edilmemiş bir dizi tür tanımlanmıştır. Genellikle ellerde ve ayaklarda bulunan siğiller için Verrucae ismi kullanılsa da, bu isim siğil nedeni olduklarından değil benzer morfolojisi nedeniyle verilmiştir (Cho vd., 2004).

#### **2.4.6. Spirochaetes**

Spirochaete, çoğu uzun, heliksel olarak sarılmış (tirbuşon şeklinde veya spiral) hücrelere sahip ayırt edici didermal (çift membranlı) bakteriler içeren Spirochaetes'in bir üyesidir (Ryan vd., 2004). Doğada kemoheterotrofik olan Spirochaetler' in uzunlukları 3 ila 500 µm arasında ve çapları yaklaşık 0,09 ila en az 3 µm arasındadır (Margulis vd., 1993). Spirochaetler, diğer bakteriyel filamanlardan, flagellalarının bakteri iç zarı ile dış zarı arasında uzunlamasına uzanan aksenal filamentler olarak konumlanmaları ile ayırt edilirler. Bu yapılar, Spirochaete'nin hareket etmesini sağlayan bükülme hareketine neden olur. Spirochaete eşeysiz enine ikili bölünmeyle çoğalır. Spirochaet'lerin çoğu serbest yaşayan ve anaerobiktir, ancak çok sayıda istisna vardır. Spirochaetes bakterileri patojenik kapasiteleri ve yaşadıkları ekolojik ortamların yanı sıra guanin-sitozin içeriği ve genom büyüklüğü gibi moleküler özelliklerde çeşitlilik gösterir (Paster, 2011).

#### **2.4.7. Synergistia**

Sinerjist'lerin iki katlı hücre zarfı olmasına rağmen, lipopolisakarit biyosentezinde yer alan çeşitli proteinlerden yola çıkılarak, normalin dışında bir dış hücre zarfına sahip olabileceklerini belirtilmektedir fakat Sinerjist'lerde henüz hücre zarfı tam olarak tespit edilmemiştir (Gupta, 2011; Sutcliffe, 2010). Sinerjistler, hayvan gastrointestinal yolları, toprak, petrol kuyuları ve atık su arıtma tesisleri de dâhil olmak üzere anaerobik ortamların çoğunda yaşarlar ve aynı zamanda kistler, apseler ve periodontal hastalık gibi insan hastalıkları bölgelerinde de bulunurlar (Gay vd., 2007). Hastalıkla ilişkili dokularda var olmalarından dolayı, Synergistet'lerin fırsatçı patojenler olduğu öne sürülmektedir, ancak sağlıklı bireylerde umbilikusun (göbek deliği) mikrobiyomunda ve normal vajinal florada da bulunabilirler (Marchandin vd., 2010). Bu şube içindeki türler ayrıca periodontal hastalık, gastrointestinal enfeksiyonlar ve yumuşak doku enfeksiyonlarında da gösterilmiştir (Horz vd., 2006). Şubeye ait diğer türlerin, anaerobik çürütücülerde biyogaz üretimi için organik yapıların bozulmasına önemli katkıları olduğu ve hidrojen gazı üretimi yoluyla yenilenebilir enerji üretiminde kullanım için potansiyel adaylar olduğu tespit edilmiştir (Riviere vd., 2009). Bilinen Synergistetes türlerinin ve cinslerinin tümü şu anda tek bir sınıf (Synergistia), takım (Synergistiales) ve ailesinin (Synergistaceae) bir parçasıdır (Jumas-Bilak vd., 2009).

#### **2.4.8. Mollicutes**

Mollicutes, hücre duvarının yokluğuyla ayırt edilen bir bakteri sınıfıdır. "Mollicutes" kelimesi Latin mollis ("yumuşak" veya "bükülebilir" anlamına gelir) ve cutis ("cilt" anlamına gelir) kelimesinden türemiştir. Bireyler çok küçüktür, tipik olarak sadece 0.2-0.3 µm (200-300 nm) boyutundadır ve çok küçük bir genom boyutuna sahiptir. Çoğu, hücre zarını biraz daha sert kılan sterollere sahip olmasına rağmen, formları değişmektedir. Birçoğu kayma ile hareket edebilir, ancak Spiroplasma cinsinin üyeleri sarmal şekilde ve bükülerek hareket ederler. Mollicutes'deki en iyi bilinen cins Mycoplasma'dır (Razin vd., 1998). Mollicutes, konağın hücrelerinde veya içinde yaşayan çeşitli hayvan ve bitkilerin parazitleridir. Birçoğu insanlarda hastalıklara, solunum veya ürogenital yollardaki hücrelere, özellikle de Mycoplasma ve Ureaplasma türlerine bağlanır. Fitoplazma ve Spiroplazma, böcek vektörleri ile bağlantılı bitki patojenleridir (Wolf vd., 2004).

#### **2.4.9. Fusobacteria**

Fusobacteria, zorunlu olarak anaerobik, spor yapmayan Gram-negatif basillerdir. Asakolitik yapıları ve rutin biyokimyasal testlerde genel olarak olumlu sonuçların azlığı nedeniyle Fusobacteria'ların laboratuvarında tanımlanması oldukça zordur. Bununla birlikte, yeni moleküler biyolojik tekniklerin taksonomiye uygulanması, Fusobacterium necrophorum ve *F. nucleatum*'un alt türleriyle birlikte bir dizi yeni tür oluşturmuş ve tanımlanması için yeni yöntemler sağlamıştır. Fusobakterilerin doku nekrozu ve septisemiye neden olan geniş bir insan enfeksiyonu spektrumuna dâhil olduğu bilinmektedir. Yakın zamanda amniyotik enfeksiyonlarda, erken doğum ve tropik ülserlerdeki önemleri bildirilmiştir. Açıklanan yeni türler arasında tropikal ülserlerden *F. ülserans* ve ağız boşluğundan birkaç türü tespit edilmiştir. *F. necrophorum* ve *F. nucleatum*'un alt türlerinin tespiti de mümkün olmuştur. Fusobakterilerin taksonomisinin gelecekte daha da geliştirilebileceği muhtemeldir (Bennett vd., 1993).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Hayvan örneklerinin hazırlanması**

Doğal yaşamlarından yakalanan 3 tür *Rattus rattus* 6♂ (kentsel yaşam alanı, kırsal yaşam alanı, deney hayvanı), *Mus musculus* 2♂, *Nannospalax xanthodon* 4♂ (2n=52 ve 2n=60)'a ait 12 bireyin anüs ve rektum yolu üzerinden dışkı-epitel süprüntüsü alınarak steril kaplarda moleküler analizler için muhafaza edilmiştir.

## **3.2. Analiz Adımları**

### **3.2.1. Örneklerden DNA izolasyonu**

Çevresel örneklerden genomik DNA izolasyonu Zymo Research firmasına ait “QuickDNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Cat. No.: D6010” veya “Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit, Cat. No.: D6005” kullanılarak yapılmıştır. İzole edilmiş DNA'nın miktar ve saflığı florometrik olarak Qubit ile tayin edilmiştir.

### **3.2.2. 16s rRNA V3-V4 bölgesinin amplifikasyonu**

Tür tayininde kullanılacak olan 16s rRNA genine ait V3-V4 bölgeleri 341F-805R primer dizileri ile SimpliAmp Thermal Cycler kullanarak amplifiye edilmiştir.

### **3.2.3. Kütüphane hazırlama ve dizileme işlemi**

16s rRNA V3-V4 amplicon ürünleri dizileme işleminden önce ABMGood firmasına ait “Column-Pure PCR Clean-Up Kit, Cat. No.: D509” ile saflaştırılmıştır. 16s rRNA V3-V4 amplicon ürünleri için kütüphane hazırlama Illumina'nın “Nextera XT DNA Library Prep Kit, Cat. No.: FC-131-1096” ile index işlemi ise “TG Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples), Cat. No.: TG-131-2001” ile yapılmıştır. Dizileme işlemi Illumina Miseq platformu ile paired-end (PE) 2x150 olarak yapılmıştır.

### **3.2.4. Ham verinin biyoinformatik analizi**

Ham veri okumaları (FASTQ), Kraken Metagenomik sistemi ile OTU sınıflarına ayrılmıştır. Kraken uygulaması, yüksek hassasiyet ve hızda kısa DNA sekanslarına taksonomik etiketler atar. Daha fazla bilgi için “Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3), R46.” referanslı makaleye bakınız.

### **3.2.5. Raporlama**

Örneklerdeki tür seviyesinde bakteriyal dağılım ve çeşitlilik rapor ve görsel halinde sunulmuştur.

## **3.3. Kolorektal kanser ile ilişkili gen ekspresyonlarının analizi**

### **3.3.1 Doku örneklerinin hazırlanması**

*Nannospalax xanthodon* ve *Rattus rattus* ait -80 °C'de muhafaza edilen bağırsak dokularından 20 mg alınarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

### 3.3.2. RNA İzolasyonu

Örnek dokulardan RNA izolasyonu, Analytikjena İnuu PREP RNA mini Kit 2.0 kullanılarak yapılmıştır. Bu prosedüre göre;

1. 20 mg doku örneği steril lam üzerinde parçalanıp homojenat haline getirilerek doku bütünlüğü bozuldu ve üzerine 450 µL Lysis solüsyon RL eklenerek homojen hale gelmesi sağlandı.
2. Homojenat maximum hızda (15.000 rpm) 1dk santrifüj yapıldı. Spin filter D yeni bit toplama kabına takarak Süpernatant Spin filter D ye aktarıldı. 11.000g' de 2 dk santrifüj yapıldı.
3. Spin filter R yeni bir toplama kabına alındı. Spin filter D atılarak toplama tüpündeki süpernatant miktarı kadar (450µL) %70 Etanol eklendi ve Spin Filter R ye aktarıldı. 11.000g' de 2 dk santrifüj yapıldı.
4. Spin filter R (RNA'lar burada) yeni bir toplama kabına takıldı ve 500 µL Washing solüsyon HS eklenip 11.000g' de 1 dk santrifüj yapıldı.
5. Spin filter R yeni bir toplama tüpüne takıldı ve 700 µL Washing Solüsyon LS eklenip 11.000g' de 1 dk santrifüj yapıldı.
6. Spin filter R yeni bir toplama tüpüne takıldı, 11.000g' de 2 dk santrifüj yapıldı ve bütün etanol ve solüsyonların uzaklaştırılması sağlandı.
7. Spin filter R yeni bir steril ependorfa takıldı. Dikkatli bir şekilde filtrenin merkezine 50 µL RNase Free Water eklendi. 1dk oda sıcaklığında İnkübe edildi ve 11.000g' de 1 dk santrifüj yapılarak RNA'lar Ependorfa aktarıldı. - 80 ° C de saklanmak üzere kaldırıldı.

### 3.3.3 cDNA Eldesi

İzolasyonu tamamlanan RNA'lardan Jena Bioscience SCRIPT cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA elde edilmiştir.

Random primer 100 µM	0,5 µL
RNA 10 ng/µL	10 µL

- 65°C 'de 5 dakika primerlerin RNA bağlanması için inkübe edildi ve daha sonra buza alındı.

SCRIPT RT BUFEER 5x	8 µL
dNTP Mix 10mM	2 µL
DTT Stock 100mM	2 µL
RNase İnhibitor 40 units/µL	1 µL
SCRIPT Rever Transcriptase 200units/µL	1 µL
RNase Free water	15,5 µL

Hazırlanan reaksiyon ortamı termal cycler ile 50 °C 'de 60 dk ve 42 °C 10dk inkübe edildi. cDNA 'lar termal reaksiyon sonrasında -20 °C de saklamak üzere kaldırıldı.

### 3.3.4 Real Time PCR Protokol

Dokulardan elde edilen cDNA' lar Analytikjena İnnuMix qPCR SYBR GREEN MASTERMİX ile Agilent AriaMx Real time PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Deneyler için 96 kuyucuklu DNase ve RNase free Plate kullanılmıştır.

DNase Free water	3 µL
Forward Primer 100 µM	0,5 µL
Reverse Primer 100 µM	0,5 µL
İnnuMix MasterMix 2x	5 µL
cDNA	1 µL
Total	10 µL

### Termal Profil

Hot START (1 cycle)

95°C 03.00 dk

Amplification (40cycle)

95 °C 00.05 dk

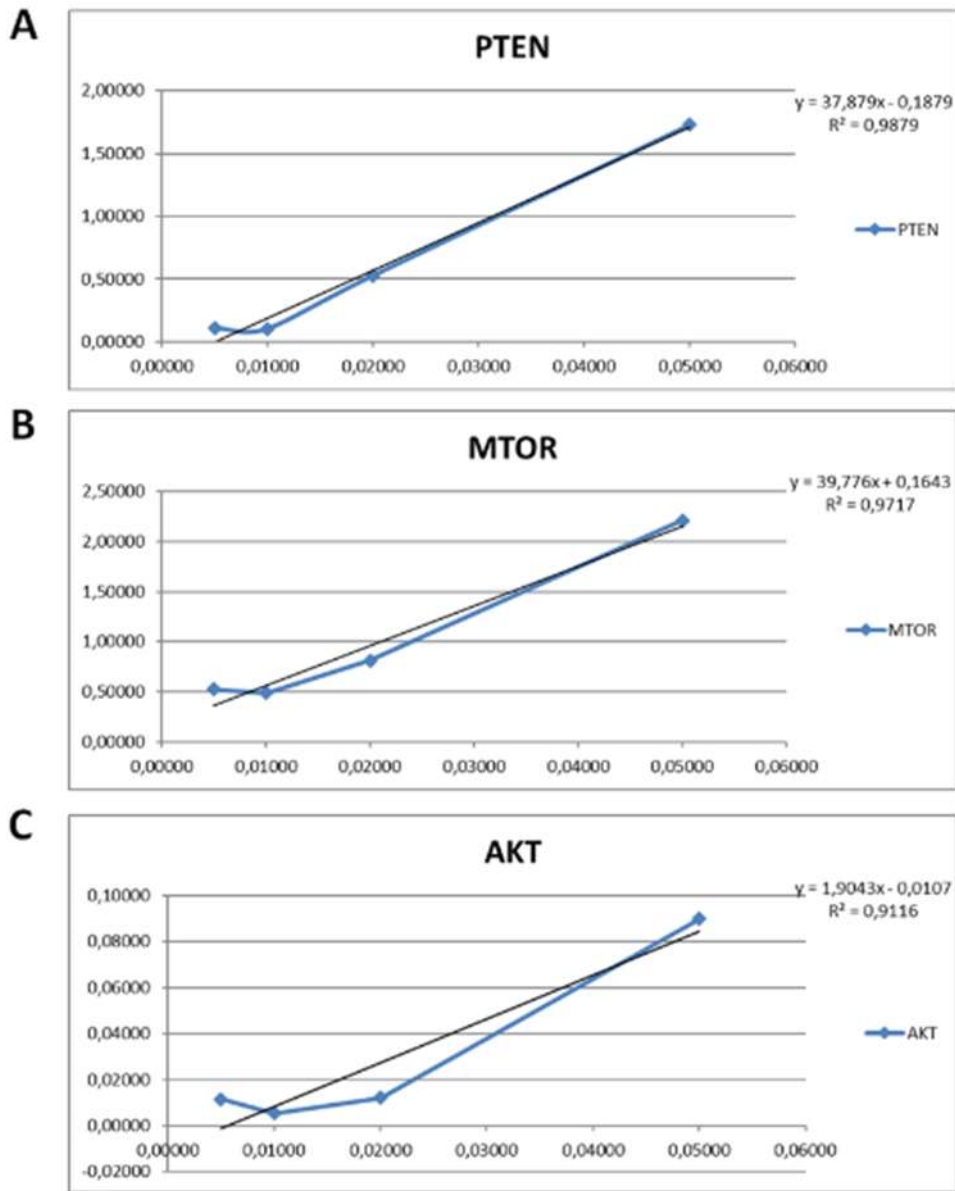
60 °C 00.30 dk

MELT (1 cycle, Resolution: 0,5 °C, SoakTime 5s)

95 °C 00.30 dk

65 °C 00.30 dk

95 °C 00.30 dk



**Şekil 1** Real time PCR verilerinin standardize edildiği primer standart grafiği ve grafik eğimi (R2 doğruluk payını göstermektedir).

### 3.3.5 Real Time PCR verilerinin İstatistiksel İncelenmesi

Agilent AriaMx Software programı kullanılarak gen ekspresyonu sırasında değişen Cq ( $\Delta R_n$ ) değerleri standart grafiği yardımı ile Quantity (relative) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 1). Her örnek için 2 farklı organizma ve 3 tekrarlı olmak üzere n=6 değer kullanılmıştır. GraphPad Prism 7.0 istatistik programı ile Hedeflenen gen Quantity değeri ile GAPDH gen değerleri birbirine oranlanarak hedeflenen cDNA miktarı farklılıkları ortadan kaldırılmıştır. Örnekler arasındaki en düşük değer 1'e normalize edilerek tespit edilen farklar bu değer katları olarak hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Rat Gruplarında Belirlenen Tür Seviyesinde Taksonomik Dağılımlar

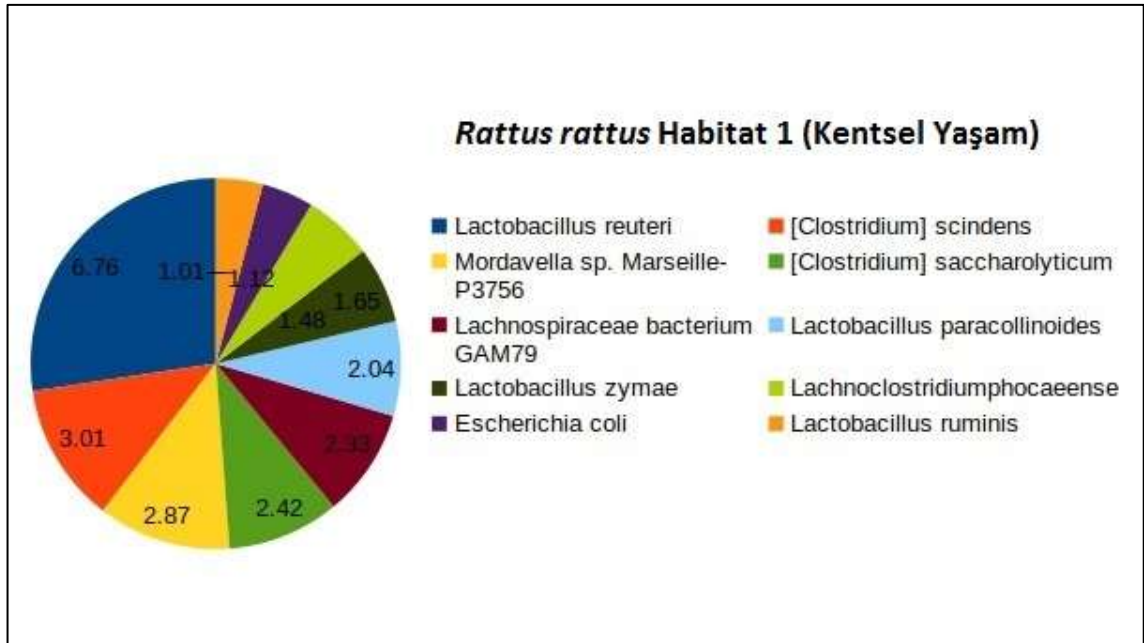
Ekolojik faktörlerin bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklere olan etkisi Deneysel hayvanı, Kırsal yaşam ve Kentsel yaşam bölgesinden alınan rodent örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Örneklerdeki tür seviyesindeki bakteriyal dağılım en yüksek okuma dizisi bulunan 10 türe ait veriler halinde tablo ve dairesel grafikler hazırlanarak gösterilmiştir (Tablo 1, Şekil: 2-4).

**Tablo 1** Tür seviyesinde taksonomik dağılımlar. RH1: *Rattus rattus* Habitat1 (Kentsel yaşam) RH2: *Rattus rattus* Habitat 2 (Kırsal yaşam), RD: *Rattus rattus* (Laboratuvar ratları).

Tür	RH1		RH2		RD	
	Okuma	%	Okuma	%	Okuma	%
<i>Lactobacillus reuteri</i>	37973	6.76	65633	8.87	-	-
<i>[Clostridium] scindens</i>	16898	3.01	32435	4.38	-	-
<i>Mordavella sp. Marseille P3756</i>	16131	2.87	17463	2.36	-	-
<i>[Clostridium] saccharolyticum</i>	13600	2.42	15399	2.08	-	-
<i>Lachnospiraceae bacterium GAM79</i>	13090	2.33	8639	1.17	4732	1.26
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	11480	2.04	-	-	-	-
<i>Lactobacillus zymae</i>	9280	1.65	-	-	-	-
<i>Lachnoclostridium hocaense</i>	8301	1.48	11052	1.49	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6315	1.12	-	-	-	-
<i>Lactobacillus ruminis</i>	5685	1.01	7929	1.07	-	-
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	-	-	50722	6.86	-	-
<i>Anaerostipes rhamnosivorans</i>	-	-	5657	0.76	-	-
<i>Lachnospiraceae bacterium Choco86</i>	-	-	5485	0.74	-	-
<i>Duncaniella sp. B8</i>	-	-	-	-	8283	2.2
<i>Flavonifractor plautii</i>	-	-	-	-	7565	2.01
<i>Muribaculum intestinale</i>	-	-	-	-	7420	1.97
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	-	-	-	-	6225	1.66
<i>Candidatus Saccharimonas aalborgensis</i>	-	-	-	-	5841	1.55
<i>Clostridiales bacterium CCNA10</i>	-	-	-	-	5757	1.53
<i>Marinilactibacillus sp. 15R</i>	-	-	-	-	5739	1.53
<i>Oscillibacter valericigenes</i>	-	-	-	-	4782	1.27
<i>Faecalibaculum rodentium</i>	-	-	-	-	4438	1.18

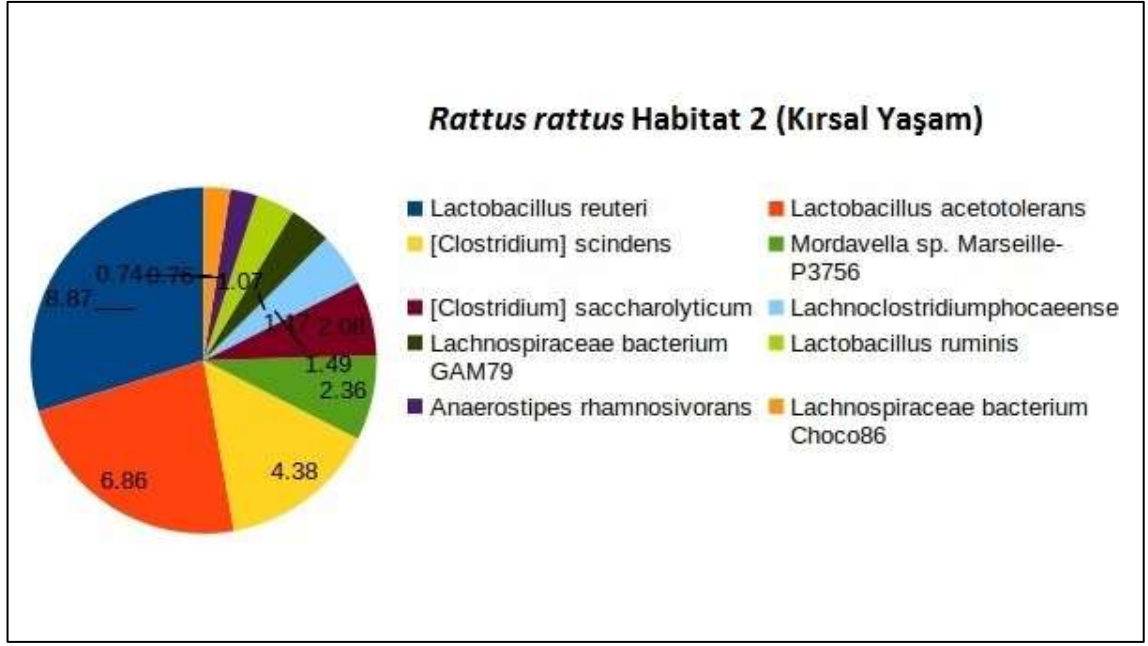
\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.

Yabanıl yaşam alanından alınan rat (RH1 ve RH2) örneklerinin mikrobiyotası tür düzeyinde benzer profiller göstermektedir. *Lactobacillus reuteri* türü RH1 grubu için % 6.76 ve RH2 grubu % 8.87 oranlarıyla yabanıl yaşam örneklerinde tür düzeyinde en yoğun bulunan bakteri çeşididir. Benzer şekilde [*Clostridium*] *scindens*, *Mordavella sp. Marseille P3756*, [*Clostridium*] *saccharolyticum*, *Lachnospiraceae bacterium GAM79* türleri de her iki grup için en yüksek yüzdeliğe sahip ilk 5 bakteri türüdür. Bu türler arasında sadece *Lachnospiraceae bacterium GAM79* türü, laboratuvar hayvanları grubu için (RL) en yüksek yoğunluklara sahip on bakteri türünde ortak olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

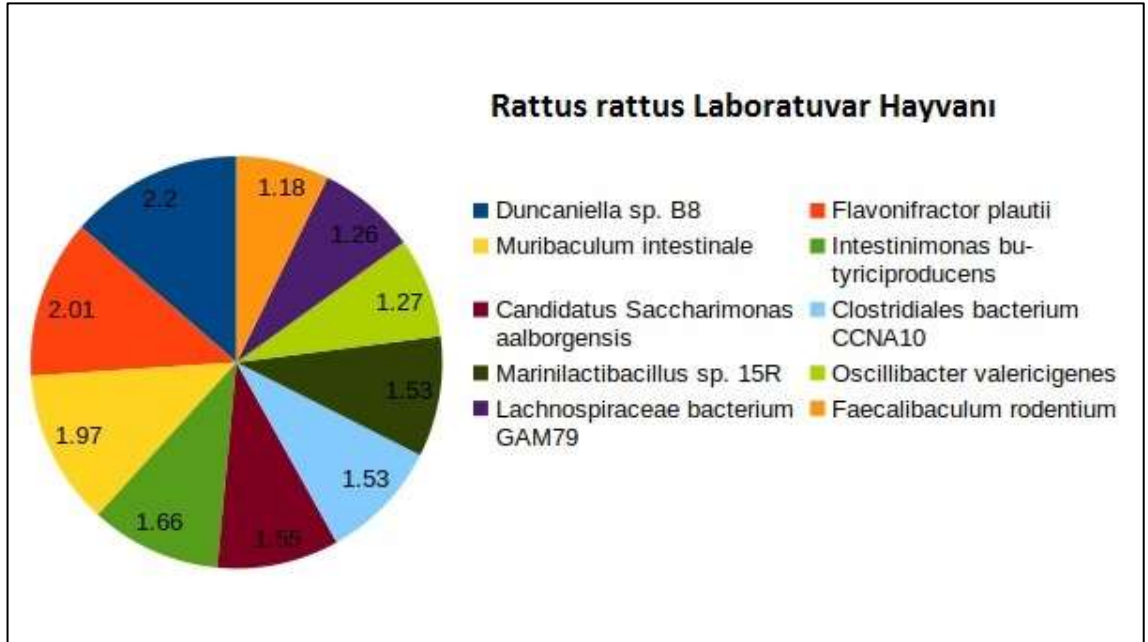


**Şekil 2.** Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus* grubuna ait en yüksek 10 bakteri türünün yüzdeleri dağılım grafiği.

Ekolojik farklılığa bağlı olarak mikrobiyotadaki değişimler dikkate alındığında RH1 (Kentsel yaşam) grubu için *Lactobacillus reuteri* türünün RH2 (Kırsal yaşam alanı) grubuna göre daha az bulunduğu ve *Lactobacillus paracollinoides*, *Lactobacillus zymae*, *Escherichia coli* türlerini diğer bakteri türlerine kıyasla daha yüksek düzeyde barındırdığı kaydedilmiştir (Şekil 2,3). Mikrobiyotada bulunan en yoğun bakteri popülasyonlarına bakılarak doğal yaşam gruplarının (RH1 ve RH2) %8-10 düzeylerinde *Lactobacillus sp.* %4 düzeyinde *Clostridium sp.* türlerini bulundurduğu gözlenmiştir (Şekil 2,3).



**Şekil 3.** Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus* (RH2) grubuna ait en yüksek 10 bakteri türünün yüzdeleri dağılım grafiği.



**Şekil 4.** Laboratuvar ratları (RL) grubuna ait en yüksek 10 bakteri türünün yüzdeleri dağılım grafiği.

Laboratuvar ratları (RL) grubuna bakıldığında en yüksek yoğunluğa sahip *Duncaniella sp. B8* % 2.2, *Flavonifractor plautii* % 2.01 bakterileri bulunmaktadır. Bu türlerin dışında *Muribaculum intestinale*, *Intestinimonas butyriciproducens*, *Candidatus Saccharimonas aalborgensis*, *Clostridiales bacterium CCNA10*, *Marinilactibacillus sp. 15R*,

*Oscillibacter valericigenes*, *Faecalibaculum rodentium* türleri RL grubu için mikrobiyotayı oluşturan ilk on bakteri türü olarak görülmüştür. *Duncaniella sp. B8* %2 ile en yüksek popülasyonu oluştururken diğer türler %1-2 arasında çeşitlilik göstermiştir. Bu grup için mikrobiyotada tam bir baskın tür söz konusu değildir (Şekil 4).

Tür seviyesinde tespit edilen çeşitliliği istatistiksel olarak anlamlandırabilmek için tüm bakteri türlerinde Shannon ve Simpsons değerleri hesaplanmıştır (Tablo 2). Bu verilere bakılarak RL grubu RH1 ve RH2 gurubuna göre daha fazla tür içererek en yüksek tür çeşitliliğe sahiptir. RH1 grubu ise RH2 grubuna göre daha fazla bakteri çeşitliliği sergilemiştir. RH2 grubu kırsal yaşam ve kirleticilerin az olduğu bir habitattan alınan örnekleri kapsamaktadır. Bu nedenle çeşitlilik artışının çevresel kirleticilere maruz kalma ve çeşitli enfeksiyonların mikrobiyotada bulunması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

**Tablo 2.** Tür seviyesinde çeşitliliği gösteren Shannon ve Simpsons hesaplamalarının değerleri.

Tür seviyesinde çeşitlilik		
Örnek	Shannon Index (H) / (H / LN (N))*	Simpsons Index (D-1)*
RH1	3.841 / 0.5631	0.9485
RH2	3.766 / 0.5159	0.9223
RD	4.592 / 0.6749	0.9791

\*Örneklerdeki tür çeşitliliğini gösterir. Simpsons indeksi 0-1 arasında bir değer alır. 1 çeşitliliği, 0 ise çeşitlilik yok anlamına gelir. Shannon indeksi genellikle 1,5-3,5 arasında bir değer alır ve bu indeks arttıkça çeşitlilik de artar.

#### 4.2. Rat Gruplarında Belirlenen Diğer Taksonomik Dağılımlar

16S yeni nesil metagenomik sekanslama analizinde tespit edilen mikrobiyota içerisindeki bakteriyal dağılım; Alem, Şube, Sınıf, Takım, Aile, Cins düzeylerinde de belirlenerek hayvan grupları arasında karşılaştırılmıştır. Örneklerdeki bakteriyal dağılım en yüksek okuma dizisi bulunan 10 taksonomik birimin verileri halinde tablo hazırlanarak verilmiştir (Tablo 3-8).

**Tablo 3.** Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Alem düzeyindeki taksonomik dağılımı.

<i>Alem</i>	<i>RH1*</i>		<i>RH2*</i>		<i>RD*</i>	
	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>
<i>Bacteria</i>	541014	96.27	718363	97.1	338382	90.02
<i>Eukaryota</i>	108	0.02	41	0.01	32	0.01
<i>Archaea</i>	23	0.0	4	0.0	11	0.0
<i>Viruses</i>	4	0.0	2	0.0	-	-

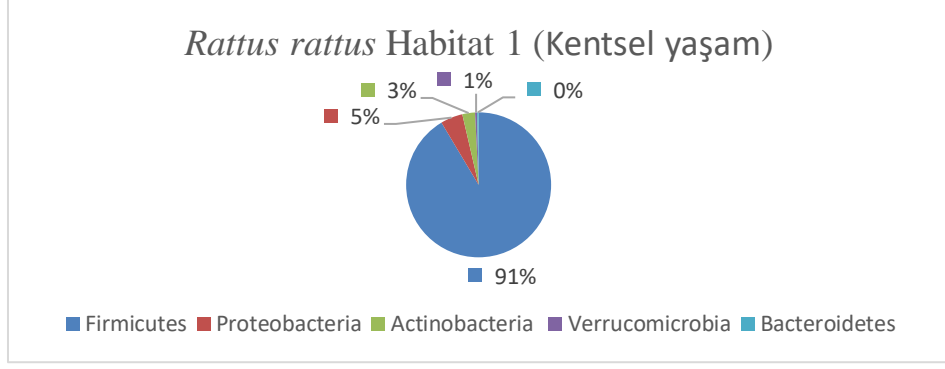
\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.

Grupların mikrobiyota içeriklerinin yeni nesil metagenomik sekanslama analizi kullanılarak RH1 grubunun %96.29, RH2 grubunun %98.2, RL grubunun %90 'ü tanımlanarak taksonomik birimlere ayrılmıştır. Laboratuvar ratlarında %10'a yakın tanımlanamayan bir kısım bulunmaktadır. Ayrıca sadece yabancı gruplarda Viral rRNA bulunmuştur. RH1 (Kentsel yaşam) grubundaki *Eukaryota* ve *Archaea* miktarının diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür.

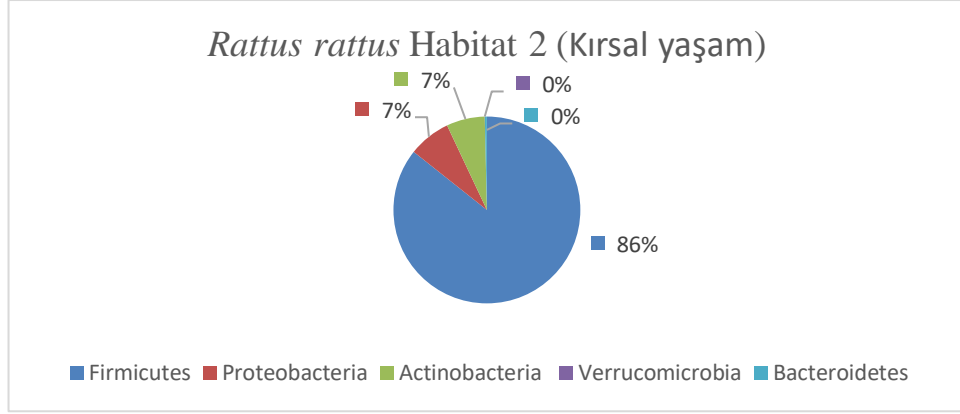
**Tablo 4.** Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Şube düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdelik dağılımı.

<i>Şube</i>	<i>RH1*</i>		<i>RH2*</i>		<i>RD*</i>	
	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>
<i>Firmicutes</i>	471304	83.87	590863	79.86	234248	62.32
<i>Proteobacteria</i>	25475	4.53	50446	6.82	16657	4.43
<i>Actinobacteria</i>	14630	2.6	45720	6.18	6689	1.78
<i>Verrucomicrobia</i>	2362	0.42	-	-	-	-
<i>Bacteroidetes</i>	1686	0.3	2464	0.33	47063	12.52
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1553	0.28	1876	0.25	-	-
<i>Candidatus</i>	919	0.16	2020	0.27	6785	1.8
<i>Saccharibacteria</i>						
<i>Tenericutes</i>	819	0.15	927	0.13	3678	0.98
<i>Chloroflexi</i>	333	0.06	3547	0.48	509	0.14
<i>Cyanobacteria</i>	170	0.03	-	-	-	-
<i>Planctomycetes</i>	-	-	1044	0.14	-	-
<i>Chlamydiae</i>	-	-	900	0.12	-	-
<i>Thermotogae</i>	-	-	-	-	1559	0.41
<i>Ignavibacteriae</i>	-	-	-	-	939	0.25

\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.



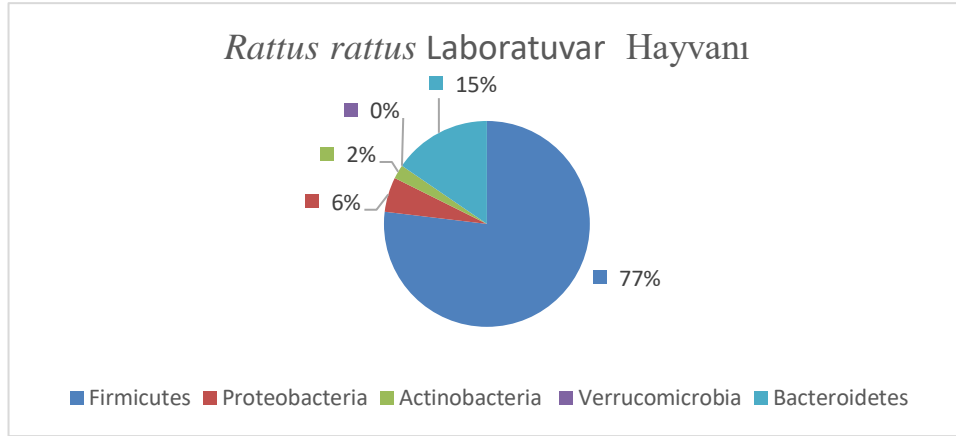
**Şekil 5.** Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus* grubuna ait Şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzdelik dağılım grafiği.



**Şekil 6.** Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus* grubuna ait Şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzdelik dağılım grafiği.

Farklı habitatlardaki ekolojik çevrenin şube düzeyindeki etkisine bakıldığında *Firmicutes*'lar RH1 grubunda % 91 iken RH2 grubunda % 86 olarak bulunmuştur. Ayrıca sadece RH1 grubunda, türleri ve mikrobiyotadaki işlevleri çok net bilinmeyen *Verrucomicrobia* bakterileri %0.42 oranı ile artış göstermiştir. Bu değişim ekolojik kirleticilerle birlikte *Firmicutes* ve *Verrucomicrobia* türlerinin arttığını göstermektedir. Bunun aksine *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, ve *Chloroflexi* türlerinin azalış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 5-6). Laboratuvar rat örneklerinin mikrobiyotası, yabancı örneklerle karşılaştırıldığında serbest yaşama göre daha az (% 62.32) *Firmicutes* türü bulundurmaktadır. Benzer şekilde *Proteobacteria*, *Actinobacteria* türleri diğer gruplarda (RH1, RH2) yerleşik bakteri türleri olarak bulunmasına rağmen, RL grubunda bu türler çok daha az oranlara sahiptir. Fakat RL grubunda diğer gruplardan farklı bir şekilde *Bacteroidetes* % 12.52 düzeyinde oldukça yüksek bir popülasyona sahiptir. RH1 ve RH2

gruplarında yaklaşık % 0,3 olan bu bakteri türlerinin RL grubunda oldukça yüksek olması dikkat çekmektedir (Şekil 7).



**Şekil 7.** Laboratuvar ratları (RL) grubuna ait şube düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği.

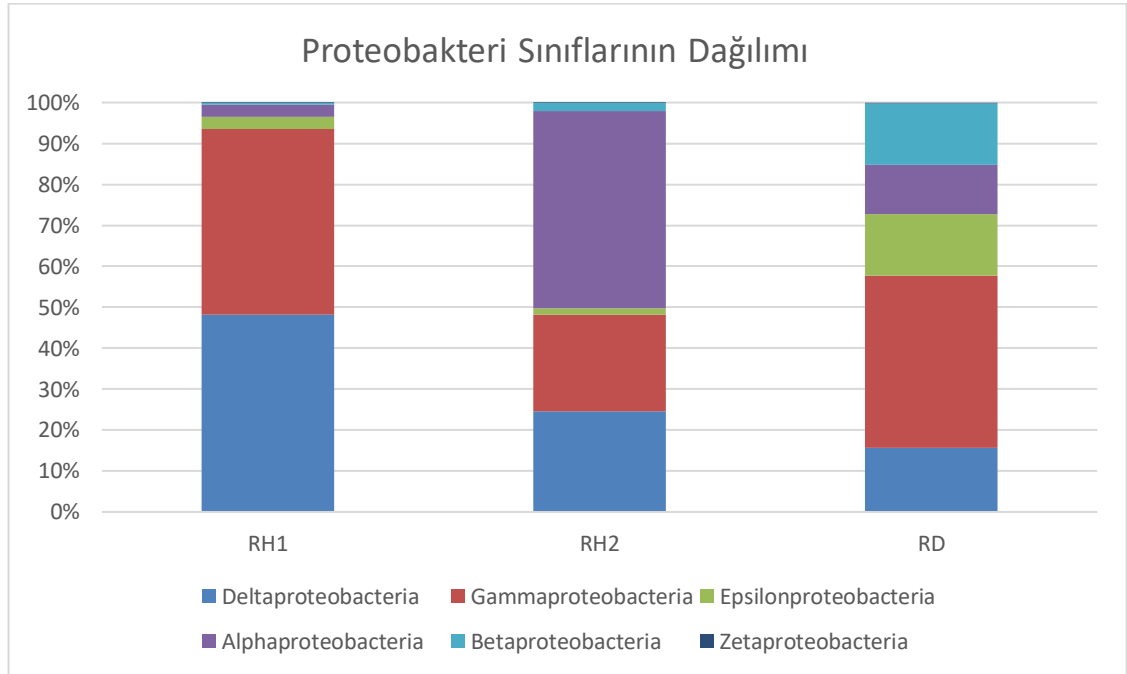
Sınıf düzeyinde incelendiğinde yabanıl rat örnekleri (RH1, RH2) ile laboratuvar ratları (RL) arasında önemli ölçüde farklar tespit edilmiştir. RH1 ve RH2 grupları için *Bacilli* sınıfı büyük bir popülasyona sahipken (ortalama olarak % 45), RL grubunda %14.19 gibi düşük bir oranda bulunmuştur. *Clostridia* bakterileri ise RH1 ve RH2 gruplarında ortalama olarak %35 düzeyinde bulunurken, RL grubunda % 42.69 gibi yüksek bir oranda bulunmaktadır. Şube düzeyine benzer bir şekilde *Verrucomicrobiae* türü RH1 grubu için ayırt edici şekilde diğer gruplara göre daha yüksektir. Özellikle % 2 lik bir orana sahip *Erysipelotrichia* türü olmak üzere *Betaproteobacteria*, *Mollicutes* türleri RL grubu için önemli bir topluluğu oluştururken, diğer gruplarda bu türler için anlamlı düzeyde bir popülasyon yoktur (Tablo 5).

**Tablo 5:** Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Sınıf düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdeler dağılımı.

Sınıf	RH1*		RH2*		RD*	
	Okuma	%	Okuma	%	Okuma	%
<i>Bacilli</i>	242699	43.19	333543	45.08	53331	14.19
<i>Clostridia</i>	222474	39.59	246048	33.26	160484	42.69
<i>Alphaproteobacteria</i>	-	-	23645	3.2	-	-
<i>Betaproteobacteria</i>	-	-	-	-	2161	0.57
<i>Gammaproteobacteria</i>	10993	1.96	11590	1.57	6047	1.61
<i>Deltaproteobacteria</i>	11637	2.07	12075	1.63	2246	0.6

<i>Actinobacteria</i>	8835	1.57	38368	5.19	-	-
<i>Coriobacteriia</i>	5027	0.89	5175	0.7	4287	1.14
<i>Verrucomicrobiae</i>	2339	0.42	-	-	-	-
<i>Negativicutes</i>	2066	0.37	3601	0.49	4757	1.27
<i>Deinococci</i>	1553	0.28	1876	0.25	-	-
<i>Bacteroidia</i>	1459	0.26	1796	0.24	41223	10.97
<i>Erysipelotrichia</i>	-	-	-	-	7217	1.92
<i>Mollicutes</i>	-	-	-	-	2223	0.59

\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.



**Şekil 8** Grupların Proteobakteri alt sınıflarına göre yüzde dağılım grafiği.

Proteobakteri çeşitliliği sınıf düzeyinde gruplar arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. 6 farklı sınıfta incelenen proteobakteriler her grup için farklı bir profil sergilemektedir. RH1 grubu tüm proteobakterilere oranlandığında % 50'ye yakın *Deltaproteobacteria* ve % 40 *Gammaproteobacteria* türlerine sahipken diğer türler %10 içerisinde daha düşük oranlarda bulunmaktadır. RH2 grubu için bakıldığında diğer türlerde esen miktarlarda bulunan *Alphaproteobacteria* bu grup için % 40 gibi yüksek bir oran yanında, % 20 *Deltaproteobacteria* ve %20 *Gammaproteobacteria* içeriğine sahiptir. RL grubunda ise diğer gruplarda oldukça düşük düzeyde bulunan *Betaproteobacteria* % 15 ve *Epsilonproteobacteria* % 15 oldukça yüksek bir popülasyona

sahiptir. Ayrıca % 10 Alphaproteobacteria, %15 Deltaproteobacteria, % 45 Gammaproteobacteria türlerine sahiptir. Proteobakteri alt sınıflarına göre en zengin tür çeşitliliğini RL grubu bulundururken, Deltaproteobacteria türünde en büyük popülasyona sahip grup RH1'dir (Şekil 8).

**Tablo 6.** Tüm gruplarda mikrobiyota içeriğinin Takım düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdelik dağılımı.

<i>Takım</i>	<i>RH1*</i>		<i>RH2*</i>		<i>RD*</i>	
	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>
<i>Lactobacillales</i>	231909	41.27	311963	42.17	46454	12.36
<i>Clostridiales</i>	220219	39.19	243285	32.88	157886	42.0
<i>Desulfovibrionales</i>	10882	1.94	10871	1.47	-	-
<i>Enterobacterales</i>	9001	1.6	6772	0.92	-	-
<i>Bacillales</i>	7467	1.33	14650	1.98	6190	1.65
<i>Bacteroidales</i>	-	-	-	-	35169	9.36
<i>Micrococcales</i>	3220	0.57	16079	2.17	-	-
<i>Eggerthellales</i>	2842	0.51	-	-	2282	0.61
<i>Verrucomicrobiales</i>	2339	0.42	-	-	-	-
<i>Veillonellales</i>	1869	0.33	2858	0.39	3555	0.95
<i>Streptosporangiales</i>	1839	0.33	3598	0.49	-	-
<i>Rhizobiales</i>	-	-	11327	1.53	-	-
<i>Rhodobacterales</i>	-	-	7032	0.95	-	-
<i>Erysipelotrichales</i>	-	-	-	-	7217	1.92
<i>Chromatiales</i>	-	-	-	-	2114	0.56
<i>Campylobacterales</i>	-	-	-	-	2089	0.56

\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.

Tespit edilen mikrobiyota profilleri her grup için takım ve aile düzeyine incelenmiştir. Bağırsak inflamatuvarı ile doğrudan ilişkisi bulunan *Enterobacteriaceae* türü RH1 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Bununla birlikte *Eubacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Leuconostocaceae* türleri sadece RH1 grubunda anlamlı düzeyde bir popülasyona sahiptir. Diğer gruplardan bulunmayan *Muribaculaceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Oscillospiraceae*, *Carnobacteriaceae* türleri RL gurubunda önemli oranlara sahip ve spesifik olarak bulunan bakterilerdir (Tablo 6-7).

**Tablo 7.** Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Aile düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdelik dağılımı.

<i>Aile</i>	<i>RH1*</i>		<i>RH2*</i>		<i>RD*</i>	
	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>
<i>Lactobacillaceae</i>	204448	36.38	277795	37.55	37348	9.94
<i>Lachnospiraceae</i>	148854	26.49	159871	21.61	54471	14.49
<i>Clostridiaceae</i>	22733	4.05	21440	2.9	13063	3.48
<i>Streptococcaceae</i>	15046	2.68	18152	2.45	-	-
<i>Desulfobionaceae</i>	10534	1.87	10452	1.41	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	8885	1.58	6551	0.89	-	-
<i>Eubacteriaceae</i>	6570	1.17	-	-	-	-
<i>Clostridiales Family XIII</i>	4620	0.82	7417	1.0	-	-
<i>Staphylococcaceae</i>	3093	0.55	-	-	-	-
<i>Leuconostocaceae</i>	2947	0.52	-	-	-	-
<i>Micrococcaceae</i>	-	-	8036	1.09	-	-
<i>Rhodobacteraceae</i>	-	-	6897	0.93	-	-
<i>Ruminococcaceae</i>	-	-	6149	0.83	22568	6.0
<i>Muribaculaceae</i>	-	-	-	-	19453	5.17
<i>Hungateiclostridiaceae</i>	-	-	-	-	8575	2.28
<i>Oscillospiraceae</i>	-	-	-	-	8172	2.17
<i>Carnobacteriaceae</i>	-	-	-	-	5745	1.53
<i>Peptococcaceae</i>	-	-	-	-	5389	1.43

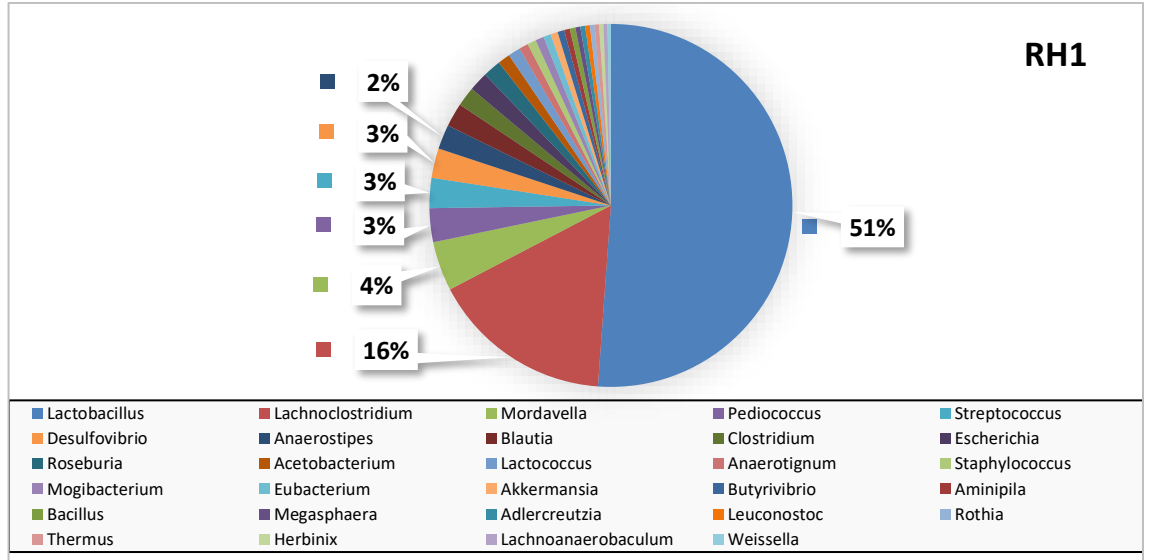
\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.

**Tablo 8:** Örnek gruplarındaki mikrobiyota içeriğinin Cins düzeyinde en yüksek ilk 10 taksonomik birim ve yüzdelik dağılımı.

<i>Cins</i>	<i>RH1*</i>		<i>RH2*</i>		<i>RD*</i>	
	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>	<b>Okuma</b>	<b>%</b>
<i>Lactobacillus</i>	187768	33.41	272079	36.78	37253	9.91
<i>Lachnoclostridium</i>	59485	10.59	76364	10.32	13321	3.54
<i>Clostridium</i>	-	-	-	-	10315	2.74
<i>Mordavella</i>	16131	2.87	17463	2.36	-	-
<i>Pediococcus</i>	11076	1.97	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	9860	1.75	16598	2.24	-	-
<i>Desulfobrio</i>	9653	1.72	9931	1.34	-	-
<i>Anaerostipes</i>	8026	1.43	6619	0.89	-	-
<i>Blautia</i>	7734	1.38	6179	0.84	-	-
<i>Clostridium</i>	6340	1.13	-	-	-	-
<i>Escherichia</i>	6325	1.13	4664	0.63	-	-
<i>Herbinix</i>	-	-	4751	0.64	-	-

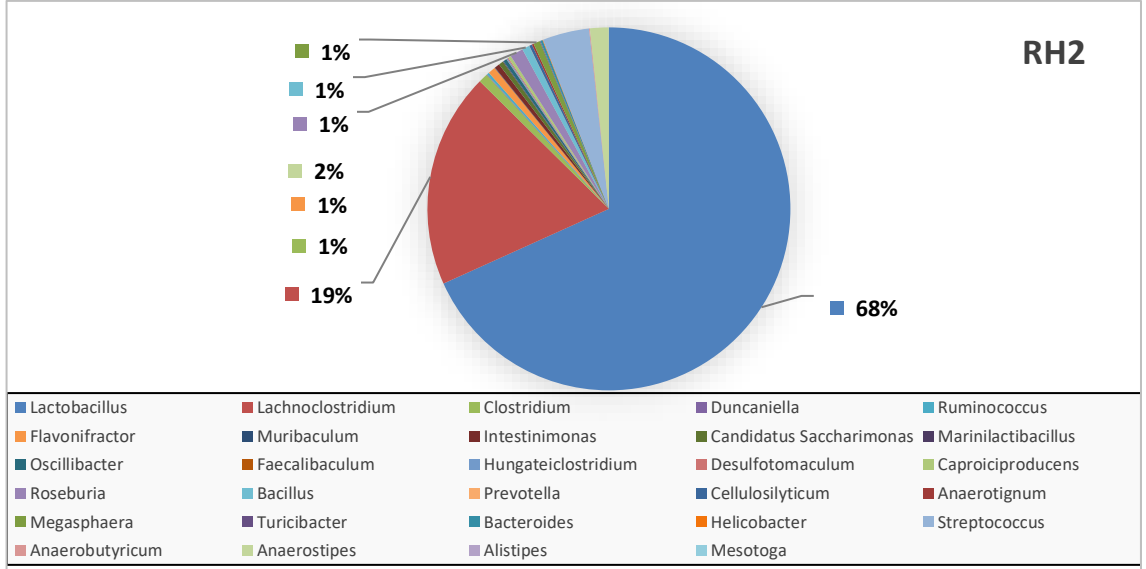
<i>Roseburia</i>	-	-	4718	0.64	-	-
<i>Duncaniella</i>	-	-	-	-	8283	2.2
<i>Ruminococcus</i>	-	-	-	-	7962	2.12
<i>Flavonifractor</i>	-	-	-	-	7565	2.01
<i>Muribaculum</i>	-	-	-	-	7420	1.97
<i>Intestinimonas</i>	-	-	-	-	6225	1.66
<i>Candidatus</i>	-	-	-	-	5841	1.55
<i>Saccharimonas</i>	-	-	-	-	5739	1.53
<i>Marinilactibacillus</i>	-	-	-	-	5739	1.53

\*RH1: Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RH2: Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus*, RL: Laboratuvar ratları.



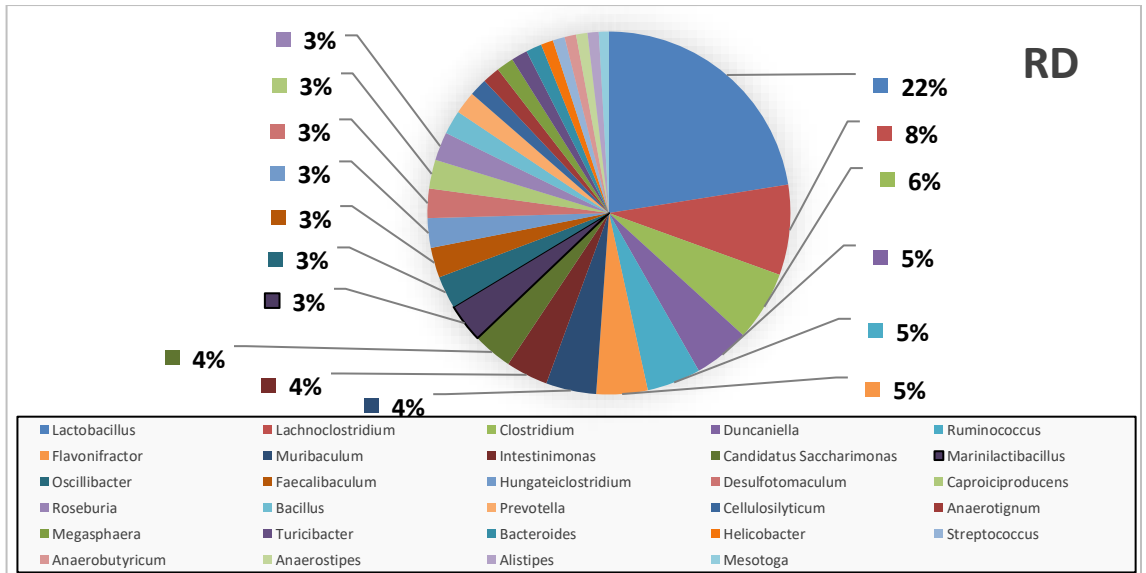
**Şekil 9** *Rattus rattus* Habitat 1 (Kentsel yaşam) grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği.

Kentsel yaşam alanından alınan (Sanayi alanı) *Rattus rattus* (RH1) örneklerinin mikrobiyotasında cins düzeyinde en belirgin tür *Lactobacillus* 'tur. En yüksek ikinci tür ise *Lachnospiridium* 'dur. Bu iki cins RH1 ve RH2 grubu için ortaktır. RH1 popülasyonunun çoğunluğunu oluşturan *Lactobacillus* RH2 grubuna göre azalma gösterirken, *Lachnospiridium* ' cinsinde iki grup arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Benzer bir şekilde *Streptococcus*, *Desulfovibrio* cinsleri RH1 gurunda azalma gösterirken *Mordavella*, *Anaerostipes*, *Blautia*, *Escherichia* cinsleri diğer gruplara göre artış göstermiştir. Ayrıca *Pediococcus* ve *Clostridium* ait bir cins iki yabancı grubu ayırt edici olarak sadece RH1 gurubunda anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 9).



**Şekil 10** *Rattus rattus* Habitat 2 (Kırsal yaşam) grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği.

RH1 grubuna benzer şekilde kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus* örneklerinin mikrobiyotasında en yüksek iki popülasyona sahip cinsler sırasıyla, *Lactobacillus* ve *Lachnoclostridium* 'dur. Aynı zamanda bu grup % 2'lik oranla *Mordavella*, *Streptococcus* ve *Desulfovibrio* cinslerine ev sahipliği yapmaktadır. Diğer gruplardan farklı olarak RH2 grubunda % 0.6'lık oranlarda *Herbinix* ve *Roseburia* cinslerinin bulunduğu görülmüştür (Şekil 10).

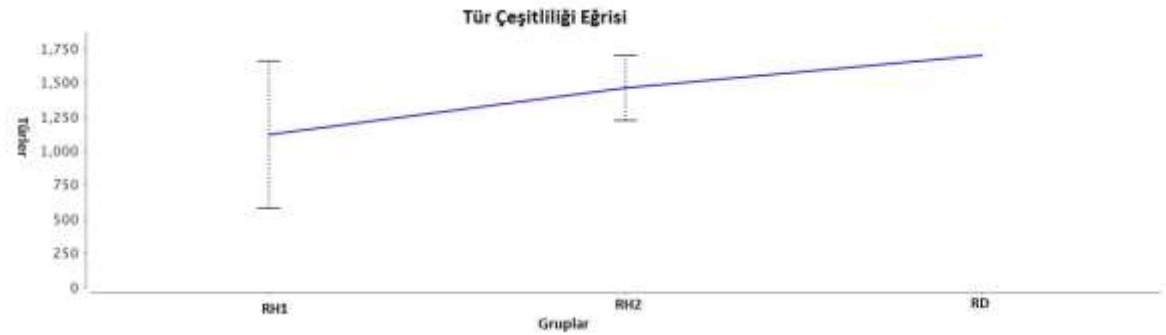


**Şekil 11** *Rattus rattus* Laboratuvar hayvanı grubuna ait Cins düzeyindeki taksonomik birimlere göre yüzde dağılım grafiği.

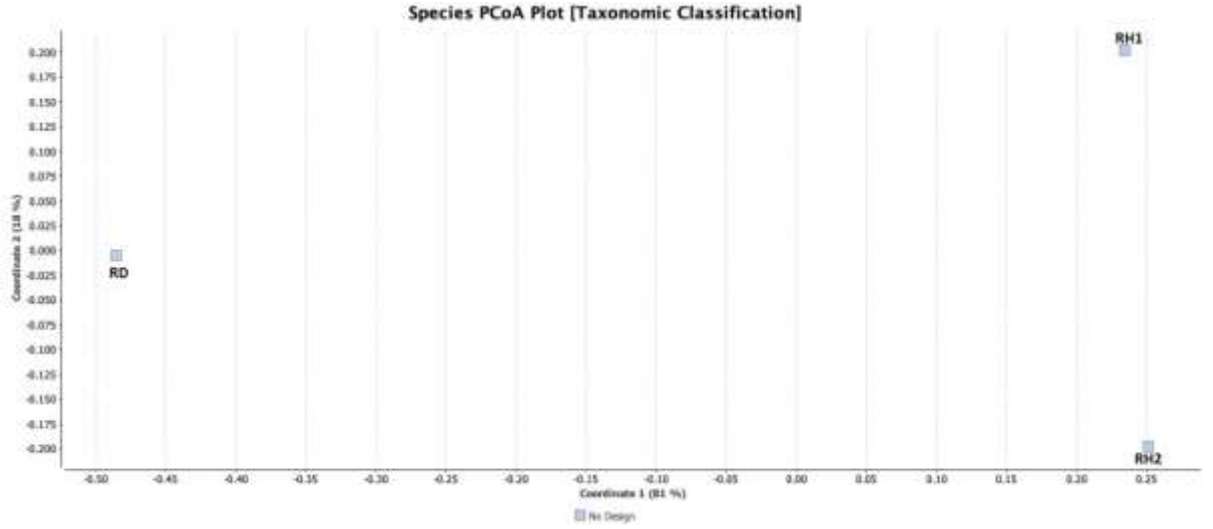
Laboratuvar ratları grubunda (RL) mikrobiyota profili cins düzeyinde yabancı örneklerle (RH1, RH2) benzerlik gösterse de mikrobiyotayı oluşturan bazı cinslerin populasyon yoğunluğu diğer gruplardan oldukça farklıdır. Örneğin RH1 ve RH2 gruplarında ortalama % 35 oranında bulunan *Lactobacillus*, RL grubunda % 9.91 oranıyla en büyük popülasyona sahip cinstir. Benzer şekilde *Lachnoclostridium* cinsi % 3.54 oranla diğer gruplara göre 3 kat daha az bulunmaktadır. Bu azalmaya karşı oranları %1.5-2.5 arasında değişen *Duncaniella*, *Ruminococcus*, *Flavonifractor*, *Muribaculum*, *Intestinimonas*, *Candidatus Saccharimonas*, *Marinilactibacillus* cinsleri mikrobiyotadaki tür çeşitliliğini önemli ölçüde artırmıştır (Şekil 11).

### 4.3. Rat Gruplarında Bakteriyal Çeşitlilik Analizleri

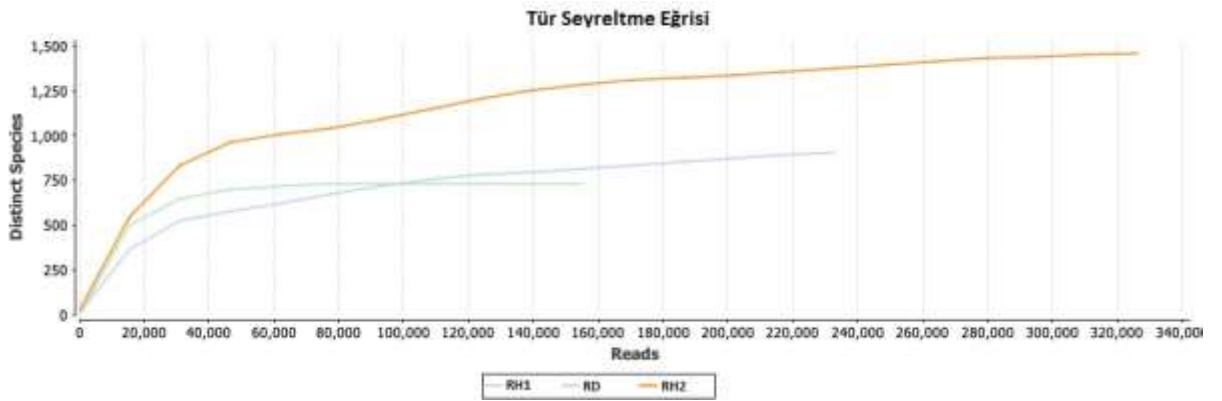
Tüm gruplar arasındaki Kentsel yaşam alanından alınan *Rattus rattus* (RH1) , Kırsal yaşam alanından alınan *Rattus rattus* (RH2), Laboratuvar ratları (RL) bağırsak mikrobiyotasında belirlenen bakteriyal çeşitliliğin dağılımları analiz edilmiştir. Örneklerdeki toplam OTU'ların minimum, ortalama ve maximum sayısı (Çeşitlilik Eğrisi), örnekler arasındaki benzerlik ve farklılıklar (PCoA plot), örneklerdeki tür çeşitliliği (richness),(Seyreltme eğrileri) incelenmiştir (Şekil 12,13,14).



Şekil 12. Grup içerisindeki mikrobiyota tür çeşitlilik eğrisi.



**Şekil 13.** Gruplardaki tür çeşitliliğini anlamlandırarak pCoA Plot tekniği ile oluşturulan benzerlik grafiği.



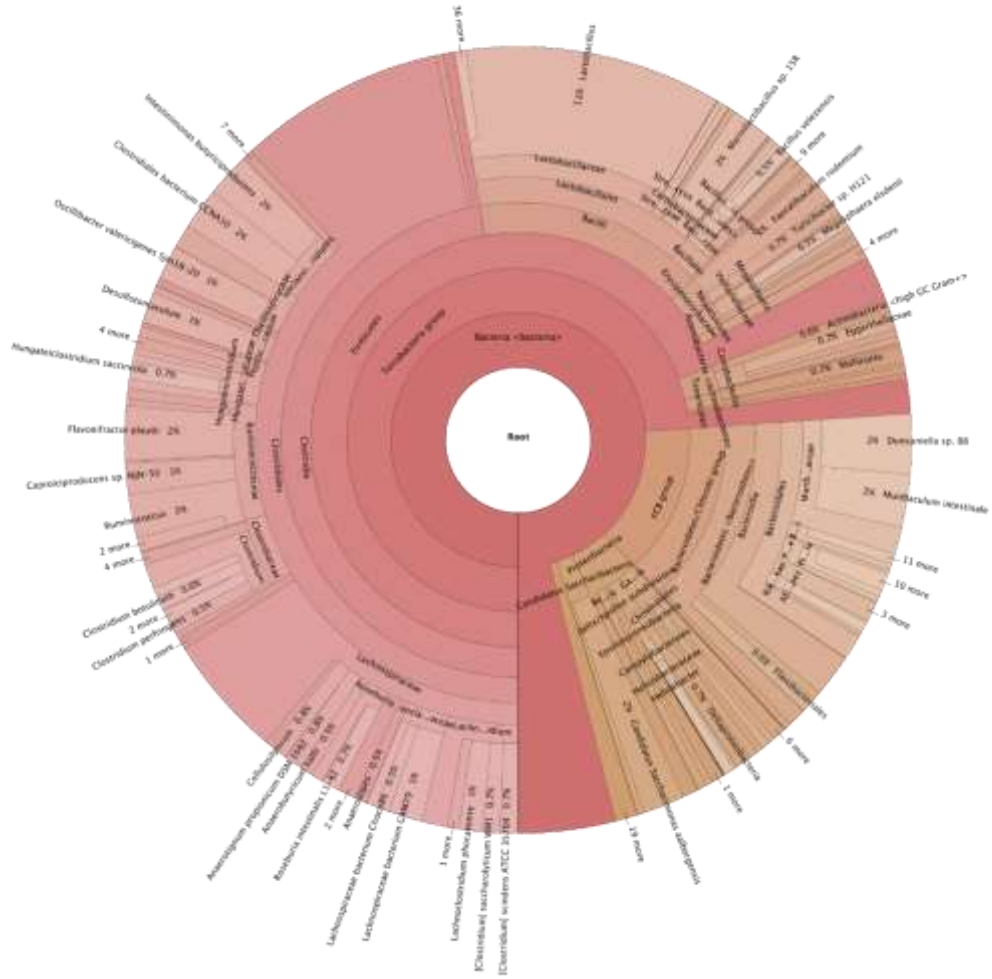
**Şekil 14.** OTU'ların okunma tekrarına göre farklı türlerin miktarını gösteren Tür seyrelme eğrisi.

#### 4.4. Rat Gruplarında Belirlenen Mikrobiyota Profilleri

Tespit edilen mikrobiyota profilleri belirgin türler ve taksonomik birimlerin yüzdeliklerine göre her grup için hazırlanarak kladogramlar halinde aşağıda verilmiştir (Şekil 15-17).



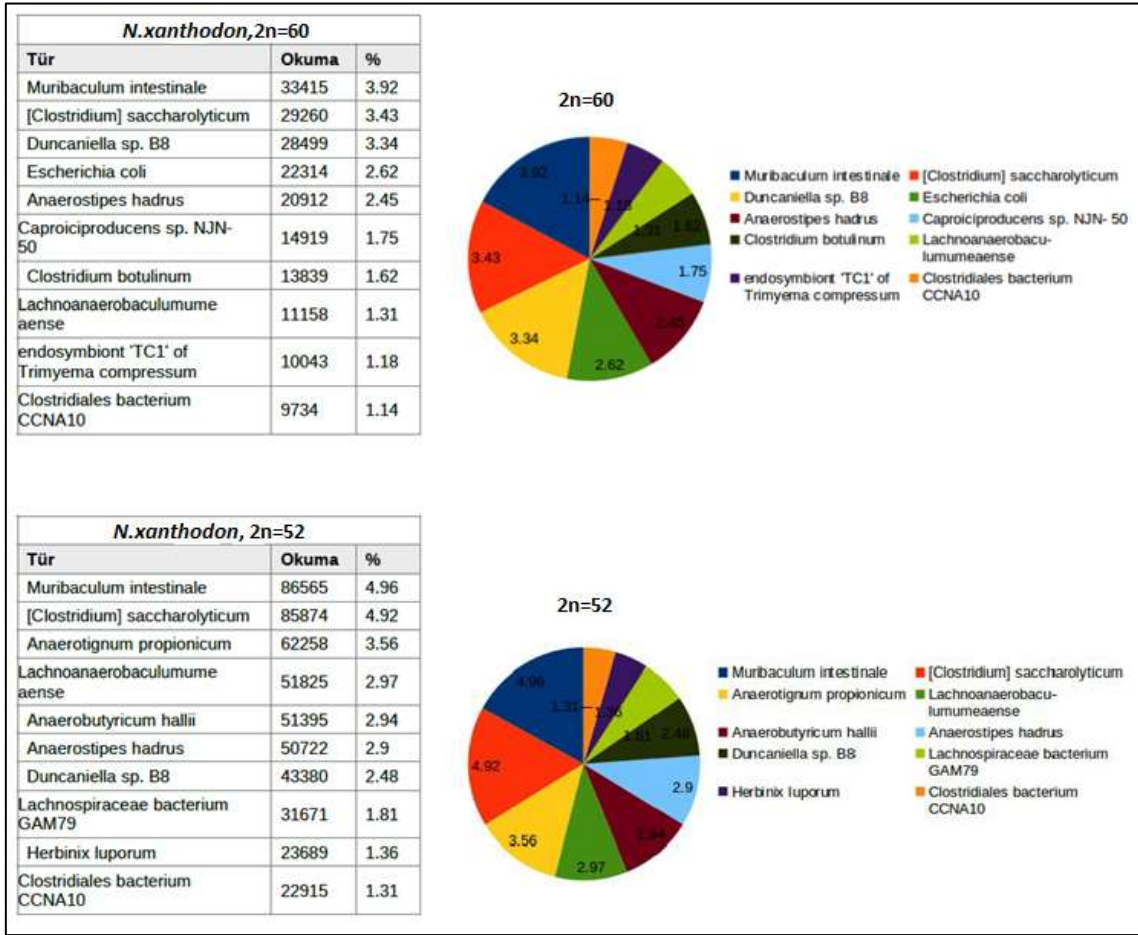




**Şekil 17.** Laboratuvar ratları grubunda (RL) mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram.

#### 4.5. Farklı Memeli Gruplarında Belirlenen Taksonomik Dağılımlar

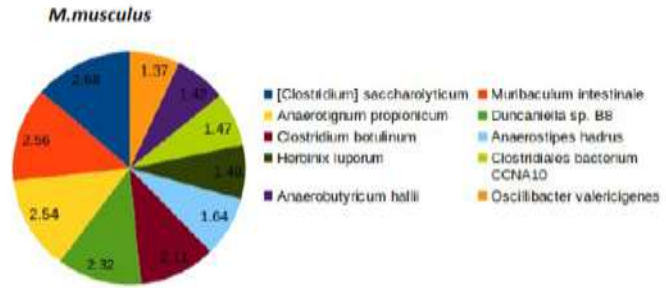
Türler arasında bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ve filogenetik ilişkilerin mikrobiyotaya olan etkisini araştırmak amacı ile doğal ortamından alınan *Rattus rattus*, *Mus musculus* ve *Nannospalax xantodon* türünün iki kromozomal formu ( $2n=60$  ve  $2n=52$ )'na ait örneklerin mikrobiyota profilleri karşılaştırılmıştır. Örneklerdeki tür seviyesinde belirlenen bakteriyal dağılımı en yüksek okuma dizisi bulunan 10 türe ait veriler halinde sunulmuştur (Şekil 18-19). Tür seviyesinde çeşitliliği gösteren Shannon ve Simpsons hesaplamalarının değerleri verilmiştir (Tablo 9). Ayrıca diğer taksonomik dağılımlar tablolar halinde sunulmuştur (Tablo 10,11).



**Şekil 18** *Nannospalax xanthodon* (2n=60 ve 2n= 52) örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının tür seviyesinde taksonomik dağılımları.

*Muribaculum intestinale*, *Clostridium saccharolyticum* *N.xanthodon* türünün her iki kromozomal formunda da en baskın türler olarak tespit edilmiştir (sırasıyla, % 3.92, %4.96; %3.43, %4.92). *Escherichia coli* (% 2.62), *Caproiciproducens* sp.NJN-50 (% 1.75), *Clostridium botulinum* (% 1.62), endosymbiont TC1 of *Trimyema compressum* (% 1.18) sadece 2n= 60 formunda, *Anaerotignum propionicum* (% 3.56) *Anaerostipes hallii* (% 2.94), *Lachnospiraceae bacterium* GAM79 (% 1.81), *Herbinix luporum* (% 1.36) sadece 2n= 52 formunda tespit edilmiş olup kromozomal formlar arasında ayırıcı türler olarak saptanmıştır. Memeli grupları arasında *Mus musculus*' un tür seviyesinde bakteriyel dağılımına bakıldığında ise *N.xanthodon*' dan farklı olarak bağırsak florasında *Oscillibacter valericigenes* (%1.37) türünü içerdiği kaydedilmiştir.

<i>M.musculus</i>		
Tür	Okuma	%
[Clostridium] saccharolyticum	10130	2.68
Muribaculum intestinale	9687	2.56
Anaerostipes propionicum	9606	2.54
Duncanella sp. B8	8800	2.32
Clostridium botulinum	7972	2.11
Anaerostipes hadrus	6206	1.64
Herbinix luporum	5589	1.48
Clostridiales bacterium CCNA10	5558	1.47
Anaerobutyricum hallii	5388	1.42
Oscillibacter valericigenes	5192	1.37



**Şekil 19.** *Mus musculus* örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının tür seviyesinde taksonomik dağılımları.

Projemizin bu bölümünde besin ve habitat farklılıkları değil, mikrobiyotanın memeli filogenetiğine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Tür seviyesinde tespit edilen çeşitliliği istatistiksel olarak anlamlandırabilmek için tüm bakteri türlerinde Shannon ve Simpsons değerleri hesaplanmıştır (Tablo 9). Tüm taksonomik kategorilerde tespit edilen bakteriyal flora tablolar halinde sunulmuş olup (Tablo 10,11), özellikle kromozomal olarak olağanüstü çeşitlilik göstererek taksonomik olarak problemlili olan *N. xanthodon* türüne odaklanılmıştır. Bu verilere göre *N. xanthodon*,  $2n=60$  ise *N.xanthodon*  $2n=52$  grubuna göre daha fazla bakteri çeşitliliği sergilemiştir. *Mus musculus* ise daha fazla tür içererek en yüksek tür çeşitliliğine sahiptir. *N. xanthodon* yaşamının büyük çoğunluğunu toprak altında geçirir ve bitki kökleri ile beslenmektedir. *M. Musculus* ise yüzey üzerinde yaşayan ve daha fazla besin çeşitliliğine sahip bir memeli türüdür. Aynı zamanda toprak altı yaşam buradaki memeliler için daha sınırlayıcı ve kapalı bir habitat sağlamaktadır. Bu durum onları yüzey üzerindeki çevresel dalgalanmalardan korunmayıda beraberinde getirir. Kentsel yaşam rat gruplarında görülen çeşitlilik artışının çevresel kirleticilere maruz kalma ve çeşitli enfeksiyonların mikrobiyotada bulunması ile ilgili olduğu kanısına kolektif olarak *M. Musculus* türünün yüzey üzerinde, *N.xanthodon* türüne göre daha fazla çevresel kirleticilere ve besin çeşitliliğine sahip olması tür farklılığının yanısıra etkili çevresel bir neden olarak görülebilmektedir.

**Tablo 9** Tür seviyesinde çeşitliliği gösteren Shannon ve Simpsons hesaplamalarının değerleri.

Tür seviyesinde çeşitlilik		
Örnek	Shannon Index (H) / (H / LN (N))*	Simpsons Index (D-1)*
<i>N.xanthodon</i> , 2n=60	4.106 / 0.6051	0.9663
<i>N.xanthodon</i> , 2n=52	3.723 / 0.5524	0.9533
<i>M.Musculus</i>	4.332 / 0.6324	0.9757

\* örneklerdeki tür çeşitliliğini gösterir. Simpsons indeksi 0-1 arasında bir değer alır. 1 çeşitliliği, 0 ise çeşitlilik yok anlamına gelir. Shannon indeksi genellikle 1,5-3,5 arasında bir değer alır ve bu indeks arttıkça çeşitlilik de artar.

**Tablo 10** *N. xanthodon* ve *Mus musculus* örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının (Alem-Şube-Sınıf) taksonomik dağılımları.

<i>N.xanthodon</i> , 2n=60			<i>N.xanthodon</i> , 2n=52			<i>M. musculus</i>		
Alem	Okuma	%	Alem	Okuma	%	Alem	Okuma	%
Bacteria <bacteria>	777214	91.2	Bacteria <bacteria>	1562201	89.45	Bacteria <bacteria>	348076	91.92
Eukaryota	54	0.01	Eukaryota	96	0.01	Eukaryota	54	0.01
Archaea	2	0.0	Viruses	5	0.0	Archaea	1	0.0
Viruses	2	0.0	Archaea	1	0.0	Viruses	1	0.0

<i>N.xanthodon</i> , 2n=60			<i>N.xanthodon</i> , 2n=52			<i>Mus musculus</i>		
Şube	Okuma	%	Şube	Okuma	%	Şube	Okuma	%
Firmicutes	504978	59.25	Firmicutes	1057955	60.58	Firmicutes	231689	61.19
Bacteroidetes <Bacteroidetes>	120699	14.16	Bacteroidetes <Bacteroidetes>	333980	19.12	Bacteroidetes <Bacteroidetes>	48911	12.92
Proteobacteria	87645	10.28	Proteobacteria	55153	3.16	Proteobacteria	30947	8.17
Actinobacteria <actinobacteria>	15366	1.8	Actinobacteria <actinobacteria>	18394	1.05	Actinobacteria <actinobacteria>	18551	4.9
Chloroflexi <Chloroflexi>	3235	0.38	Deinococcus-Thermus	1964	0.11	Candidatus		
Tenericutes	3209	0.38	Ignavibacteriae	1768	0.1	Saccharibacteria	1884	0.5
Deinococcus-Thermus	2195	0.26	Chloroflexi <Chloroflexi>	1597	0.09	Deinococcus-Thermus	1152	0.3
Candidatus			Tenericutes	1390	0.08	Chloroflexi <Chloroflexi>	962	0.25
Saccharibacteria	657	0.08	Elusimicrobia <phylum>	1292	0.07	Tenericutes	958	0.25
Synergistetes	638	0.07	Thermotogae <phylum>	1274	0.07	Thermotogae <phylum>	300	0.08
Cyanobacteria	467	0.05				Verrucomicrobia	262	0.07

<i>N. xanthodon</i> , 2n=60			<i>N.xanthodon</i> , 2n=52			<i>Mus musculus</i>		
Sınıf	Okuma	%	Sınıf	Okuma	%	Sınıf	Okuma	%
Clostridia	426025	49.99	Clostridia	1012981	58.0	Clostridia	204080	53.89
Bacteroidia	113093	13.27	Bacteroidia	300221	17.19	Bacteroidia	43490	11.49
Bacilli	41650	4.89	Gammaproteobacteria	22829	1.31	Gammaproteobacteria	18822	4.97
Gammaproteobacteria	39969	4.69	Deltaproteobacteria	22686	1.3	Bacilli	15298	4.04
Deltaproteobacteria	38950	4.57	Bacilli	13477	0.77	Actinobacteria <high GC Gram+>	11377	3.0
Coriobacteriia	7068	0.83	Flavobacteriia	13388	0.77	Deltaproteobacteria	8346	2.2
Actinobacteria <high GC Gram+>	6436	0.76	Tissierella	11986	0.69	Coriobacteriia	5915	1.56
Alphaproteobacteria	3302	0.39	Coriobacteriia	8508	0.49	Erysipelotrichia	3758	0.99
Negativicutes	3113	0.37	Actinobacteria <high GC Gram+>	8458	0.48	Negativicutes	2091	0.55
Tissierella	3084	0.36	Alphaproteobacteria	5892	0.34	Alphaproteobacteria	1368	0.36

**Tablo 11 .** *N. xanthodon* ve *Mus musculus* örneklerinin bağırsak mikrobiyotasının (Takım-Aile-Cins) taksonomik dağılımları.

<i>N.xanthodon, 2n=60</i>			<i>N.xanthodon,2n=52</i>			<i>Mus musculus</i>		
Takım	Okuma	%	Takım	Okuma	%	Takım	Okuma	%
Clostridiales	414177	48.6	Clostridiales	999209	57.21	Clostridiales	201704	53.27
Bacteroidales	98455	11.55	Bacteroidales	263111	15.06	Bacteroidales	35104	9.27
Desulfovibrionales	36128	4.24	Desulfovibrionales	19883	1.14	Lactobacillales	11610	3.07
Enterobacterales	34192	4.01	Enterobacterales	17736	1.02	Bifidobacteriales	8492	2.24
Lactobacillales	32313	3.79	Flavobacteriales	13388	0.77	Desulfovibrionales	7732	2.04
Bacillales	6684	0.78	Bacillales	8674	0.5	Enterobacterales	7119	1.88
Eggerthellales	3439	0.4	Tissierellales	6788	0.39	Legionellales	5330	1.41
Limnochordales	2777	0.33	Cytophagales	4856	0.28	Pseudomonadales	4220	1.11
Tissierellales	2287	0.27	Lactobacillales	4436	0.25	Erysipelotrichales	3758	0.99
Cellvibrionales	2206	0.26	Eggerthellales	3920	0.22	Eggerthellales	3429	0.91

<i>N. xanthodon, 2n=60</i>			<i>N.xanthodon, 2n=52</i>			<i>Mus musculus</i>		
Aile	Okuma	%	Aile	Okuma	%	Aile	Okuma	%
Lachnospiraceae	178893	20.99	Lachnospiraceae	634736	36.34	Lachnospiraceae	103542	27.34
Ruminococcaceae	82787	9.71	Muribaculaceae	161312	9.24	Ruminococcaceae	26979	7.12
Muribaculaceae	72752	8.54	Ruminococcaceae	65886	3.77	Muribaculaceae	21489	5.67
Enterobacteriaceae	34020	3.99	Clostridiaceae	36042	2.06	Clostridiaceae	15660	4.14
Lactobacillaceae	28271	3.32	Oscillospiraceae	27149	1.55	Lactobacillaceae	9040	2.39
Clostridiaceae	26633	3.13	Enterobacteriaceae	17574	1.01	Bifidobacteriaceae	8492	2.24
Desulfovibrionaceae	23154	2.72	Rikenellaceae	15917	0.91	Desulfovibrionaceae	7313	1.93
Oscillospiraceae	15224	1.79	Hungateiclostridiaceae	15528	0.89	Enterobacteriaceae	6880	1.82
Desulfomicrobiaceae	11960	1.4	Porphyromonadaceae	15192	0.87	Oscillospiraceae	6344	1.68
Hungateiclostridiaceae	8882	1.04	Desulfovibrionaceae	14612	0.84	Coxiellaceae	5292	1.4

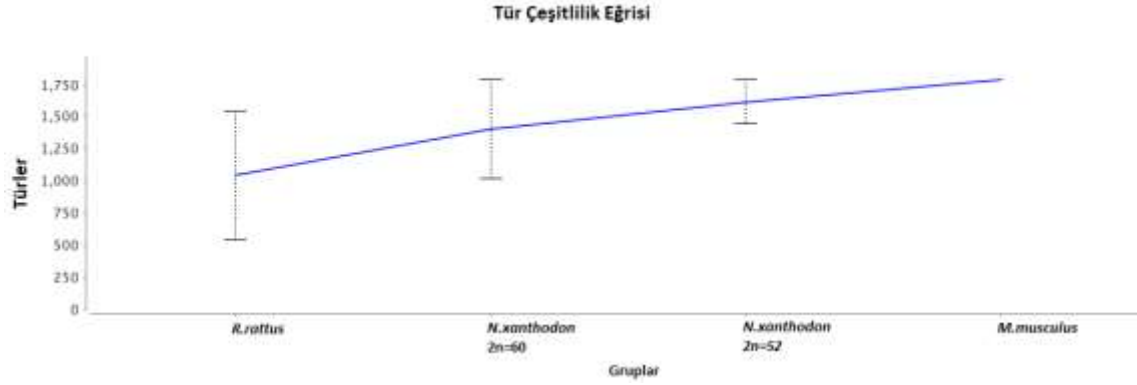
  

<i>N. xanthodon, 2n=60</i>			<i>N.xanthodon, 2n=52</i>			<i>Mus musculus</i>		
Cins	Okuma	%	Cins	Okuma	%	Cins	Okuma	%
Lachnoclostridium	49558	5.82	Lachnoclostridium	137717	7.89	Lachnoclostridium	22372	5.91
Ruminococcus	45074	5.29	Muribaculum	86565	4.96	Clostridium	12127	3.2
Muribaculum	33415	3.92	Anaerostipes	62365	3.57	Muribaculum	9687	2.56
Duncaniella	28499	3.34	Anaerotignum	62258	3.56	Anaerotignum	9606	2.54
Lactobacillus	27136	3.18	Lachnoanaerobaculum	51825	2.97	Duncaniella	8800	2.32
Anaerostipes	25500	2.99	Anaerobutyricum	51395	2.94	Lactobacillus	8666	2.29
Clostridium	23276	2.73	Duncaniella	43380	2.48	Ruminococcus	8405	2.22
Escherichia	22314	2.62	Clostridium	29610	1.7	Anaerostipes	8374	2.21
Caproiciproducens	14919	1.75	Ruminococcus	26470	1.52	Bifidobacterium	8325	2.2
Desulfomicrobium	11960	1.4	Butyrivibrio	24489	1.4	Herbinix	5589	1.48

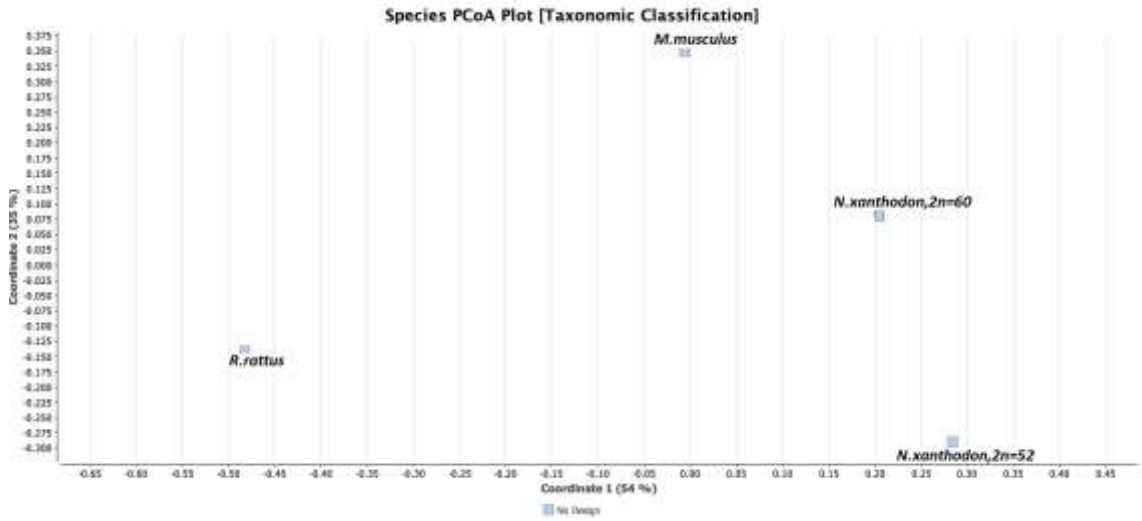
#### 4.6. Farklı Memeli Gruplarında Bakteriyal Çeşitlilik Analizleri

*Rattus rattus*, *N. xanthodon*, *2n=60*, *Nannospalax xanthodon 2n=52* ve *M. Musculus* türleri arasındaki bağırsak mikrobiyotasında belirlenen bakteriyal çeşitliliğin dağılımları analiz edilmiştir. Örneklerdeki toplam OTU'ların minimum, ortalama ve maximum sayısı (Çeşitlilik Eğrisi), örnekler arasındaki benzerlik ve farklılıklar (PCoA plot), örneklerdeki tür çeşitliliği (richness),(Seyreltme eğrileri) incelenmiştir (Şekil 20-22). Memeli grupları olarak 2 farklı tür ve 2 kromozomal form arasında yapılan bakteriyal

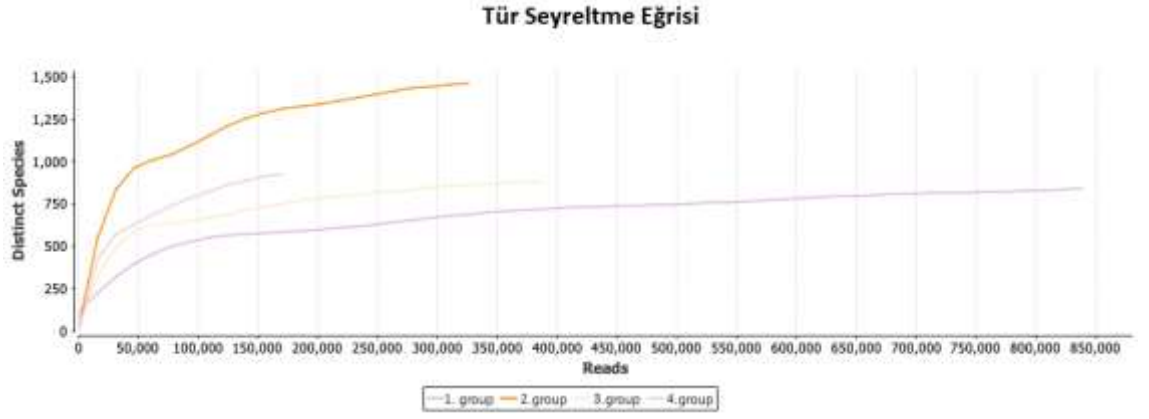
çeşitlilik analizleri ile farklı memeli türlerinin ve *N.xanthodon* türünün kromozomal formlarının birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 20 Grup içerisindeki mikrobiyota tür çeşitlilik eğrisi.



Şekil 21 Gruplardaki tür çeşitliliğini anlamlandırarak pCoA Plot tekniği ile oluşturulan benzerlik grafiği.

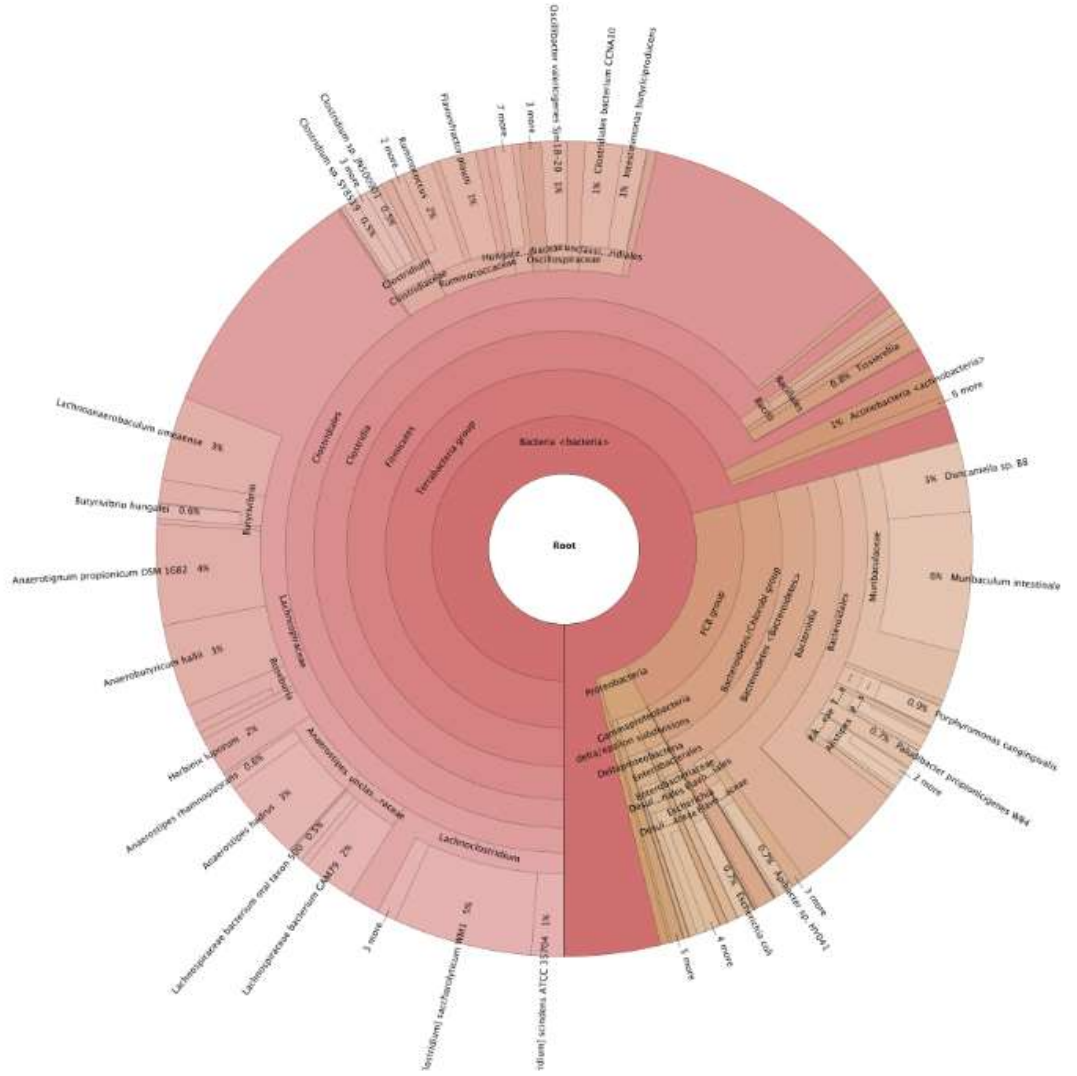


**Şekil 22** OTU'ların okunma tekrarına göre farklı türlerin miktarını gösteren Tür seyreltme eğrisi.

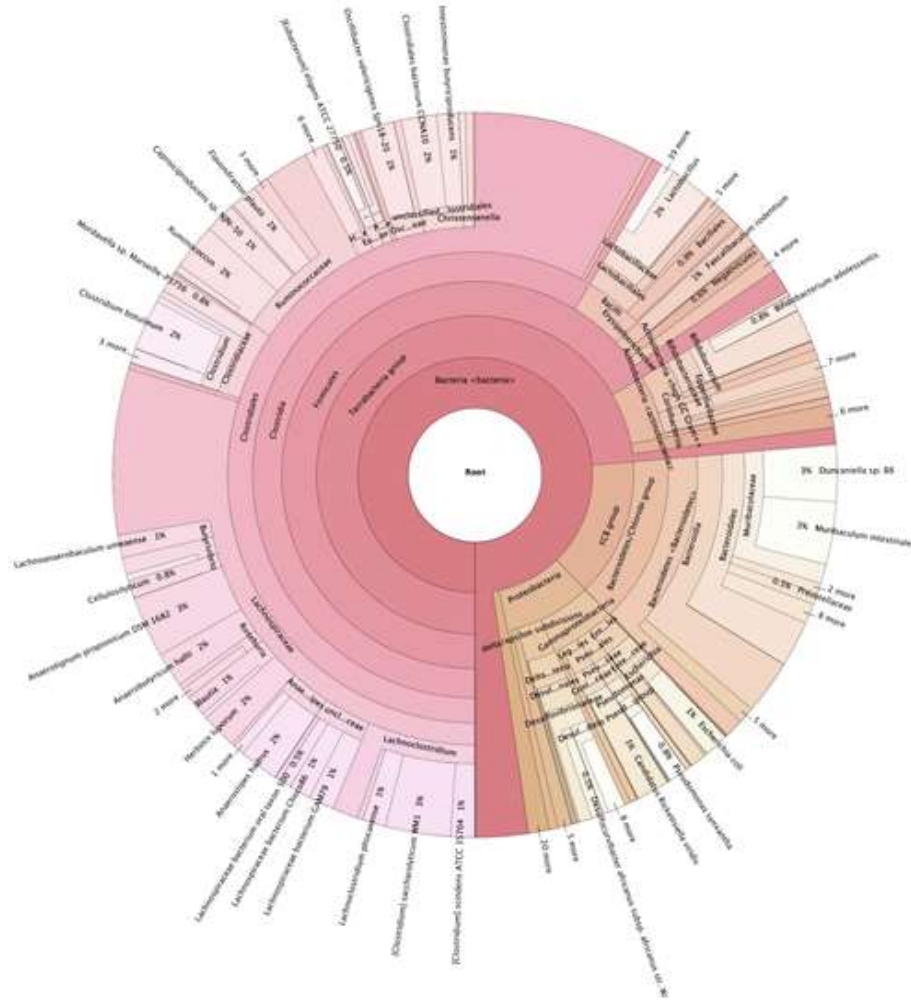
#### **4.7. Diğer Memeli Gruplarında Belirlenen Mikrobiyota Profilleri**

Tespit edilen mikrobiyota profilleri belirgin türler ve taksonomik birimlerin yüzdeliklerine göre her grup için hazırlanarak kladogramlar halinde aşağıda verilmiştir (Şekil 23-25).





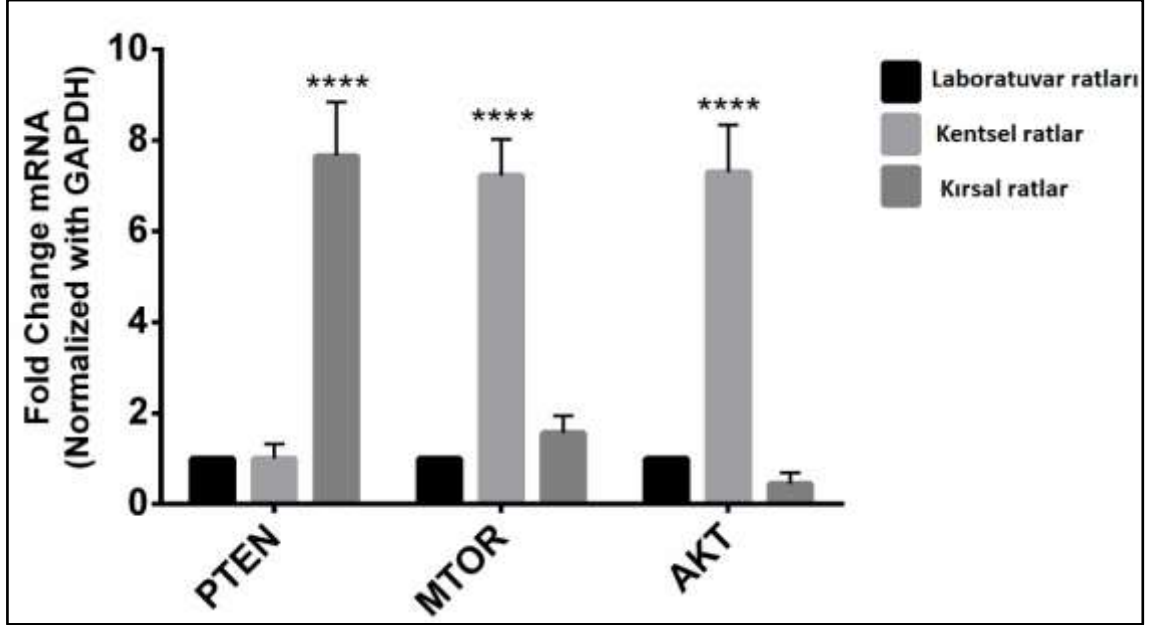
**Şekil 24** *N. xanthodon*, 2n= 52' de mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram.



**Şekil 25** *M. Musculus*' da mikrobiyota üyelerini taksonomik birimler ile gösteren kladogram.

#### 4.8. Kolorektal Kanser ile İlişkili Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

Kolorektal kanser ile ilişkili olduğu bilinen genlerin (*Pten*, *Mtor*, *Akt*) iki farklı habitattan alınan ratlarda ekspresyon seviyeleri laboratuvar ratları ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Şekil 26). *Pten* geni en fazla kırsal ratlarda eksprese edilirken, *Mtor* ve *Akt* geni en fazla kentsel yayılış gösteren ratlarda eksprese edilmiştir. Laboratuvar ratları araştırılan her üç gen için benzer oranlarda eksprese edilirken *Pten* geni kentsel ratlarla benzer kırsal ratlardan oldukça düşük, *Mtor* geni doğal yaşam alanından alınan ratlara göre düşük, *Akt* geni ise kırsal ratlardan yüksek, kentsel ratlara göre oldukça düşük seviyede eksprese edilmiştir.



Şekil 26. Kolorektel kanser ile ilişkili genlerin (*Pten*, *Mtor*, *Akt*) Rat gruplarının bağırsak epitel dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri.

## 5.TARTIŞMA

### 5.1. Türlere Göre Mikrobiyotadaki Değişimler

#### 5.1.1. Kentsel alanlarda yaşayan *Rattus rattus*'da bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi

Kentsel yaşam grubunda (RH1) diğer gruplara göre oldukça yüksek oranda bulunan ve aynı zamanda en yüksek popülasyonu oluşturan *Lactobacillus zymae* ilk olarak bir buğday türünün ekşi hamurundan izole edilen bir bakteri türüdür (Ganzle, vd., 1998). Laktik asit bakterileri (LAB) arasında olan *L. zymae* ekşi mayalı ekmek, klasik ekmek, atıştırmalıklar, pizza ve tatlı pişmiş ürünlerin üretimi için kullanılan yiyecekleri küf ve bakteri bozulmasından koruyan bir türdür (Vuysta, vd., 2007). Bu türün mikrobiyotadaki varlığı buğday, çavdar, pirinç gibi un içerikli besinlerden kaynaklanmaktadır (De Vuyst ve Ga'nzle, 2005). Kentsel yaşam alanlarındaki ratların mikrobiyotasında *Lactobacillus zymae*'nin yüksek miktarda olması, insan besin artıklarında bulunan unlu gıda tüketimi ile açıklanabilir. *Pediococcus pentosaceus* ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında bu

grupta 40 kat daha fazla tespit edilmiştir. *P. pentosaceus* bitki materyallerinde, olgunlaşmış peynirlerde ve çeşitli işlenmiş etlerde bulunabilmektedir (Osmanagaoglu, vd., 2001). Ayrıca çeşitli etler, sebzeler ve peynirler gibi yiyecekleri mayalayabilen bir başlangıç kültürü olması nedeniyle endüstriyel olarak önemli bir tür olduğu bilinmektedir (Hu, vd., 2006). Kentsel yaşam grubunun beslenme diyetlerinde işlenmiş et, peynir ürünlerinin yer aldığı ve mikrobiyotadaki bu şekillenmenin alınan besinlerden kaynaklandığı görülmüştür. RH1 grubunda yüksek yoğunlukta bulunan bakteri popülasyonlarından biri de *Lactococcus garvieae*' dir. Bu tür vasküler endotelde lezyonlara neden olarak iç organların yüzeyinde kanamalara yol açmaktadır. Ayrıca immünoşüpresyon veya karaciğer sirozunu neden olduğu düşünülmektedir (Wilbring, 2011). Genellikle suda yaşayan türler olmakla birlikte birçok çiftlik hayvanı için patojen etki gösterdiği ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir. *L. garvieae* kanatlı eti, çiğ inek sütü, çiğ et ürünleri, endüstriyel mezbahalarda, kedi ve köpeklerde bulunmuştur (Zuily, 2011). Beslenme tercihlerinde kuşlar gibi küçük omurgalılar da olan ratların bu ve benzeri bakteri türlerini mikrobiyota içerisinde taşımaları olasıdır. Kırsal yaşam alanları ve laboratuvar ratlarına göre *L. garvieae*'nin 10 kat daha yüksek oranda bulunması, kentsel yaşam grubundaki ratların daha fazla çiğ et ve süt ürünü ile beslenmeleri veya yaşadıkları bölgedeki diğer evcil memeliler (kedi, köpek vb.) ile aynı ekolojik çevrede yaşamalarından kaynaklanmış olabilir. Kentsel yaşam grubunda artış gösteren *Kurthia zopfii* ise *Planococcaceae* familyasından bir bakteri cinsidir. *Kurthia sp.* gram-pozitif, spor yapmayan, çubuk benzeri bir bakteridir. Çeşitli et, süt ve topraklarda da bulunmuştur (Mei, 2009). *Kurthia zopfii*'nin patojen olmamakla birlikte ishal etkilerinin olduğu bilinmektedir. (Keddie, 1981). Beslenme tercihlerinde çiğ et ve süt ürünlerinin bulunması muhtemel olan RH1 grubu mikrobiyotasında yer alan *Kurthia zopfii* zararsız olmasına rağmen bu grupta metabolizmayı etkileyebilecek diğer türlerin popülasyonunun artmasına neden olabilmektedir. *Kurthia zopfii*'nin yanı sıra RH1 mikrobiyotasında farklı patojen türler de tespit edilmiştir.

Yukarıda tespit edilen türlerin yanı sıra kentsel yaşam grubunda 4 kata kadar artış gösteren *Lactobacillus brevis*, fermente gıdalar gibi birçok farklı ortamda ve normal mikrobiyotada bulunabilir. *L. brevis*'in başlıca metabolitleri arasında laktik asit ve etanol bulunur. Böylece probiyotiklerde ve gıda korunmasında kullanılmaktadır (Sami, ve diğerleri, 1997) (Schmalreck, vd., 1975). *L. brevis*'in çoğunlukla çikolatalarda ve

balıklarda da fermantasyon sonucu oluşan tiraminini ürettiği bulunmuştur. Ayrıca *L. brevis*, kefir yapımında kullanılan başlıca *Lactobacillus* türlerinden biridir (Pidoux, 1989). Bu tür üzerine yapılan birçok çalışmada insan bağışıklık fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. RH1 grubunda bu türün artması alınan besinlerin toksik etkilerini azaltıcı, bağışıklık sistemini destekleyici bakteri türlerinin artmasına yardımcı olduğu ve diğer gruplara göre mikrobiyotasında farklı probiyotik türlerini taşımasında önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir.

Kentsel yaşam grubunda diğer gruplara göre 100 kat daha fazla bulunan iki benzer tür *Weissella paramesenteroides* ve *Weissella ceti*, *Leuconostocaceae* familyasına ait gram-pozitif bakteri cinsleridir (Woese, 1987). Bu cinse ait birçok suş probiyotik potansiyeli ve anti-enflamatuar etkinlik gibi çeşitli yararlı özellikler göstermektedir (Björkroth K, vd., 2002). *Weissella ceti* türü toprak, taze sebzeler ve fermente gıdalar veya et ve et ürünleri gibi çok çeşitli endüstriyal ürünlerden izole edilmiştir. Bu türün özellikle RH1 grubunda arttığı gözlemlenmiş ve bu gruptaki proteabakteri çeşitliliğini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Farklı endüstriyal ürünlerle beslenebilen kentsel yaşayan ratlar diğer gruplara göre önemli ölçüde farklı probiyotik türlerine sahip olsa da toplam probiyotik miktarı diğer gruplardan daha azdır. Benzer bir şekilde *Anaerostipes hadrus* insan dışkısından izole edilmiş *Anaerostipes* cinsinden Gram pozitif bir bakteridir. Bu türlerin bütirat ürettiği gösterilmiştir. Butiratın, bağırsak epitel hücrelerinin büyümesini arttırdığı ve anti-enflamatuar bir ajan olarak etki ettiği için gastrointestinal sistem homeostazı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Vercoe, vd., 2012). *Anaerostipes hadrus*'un kentsel yaşam grubundaki artışı, çevresel ekolojik kirleticilere karşı bir savunma adaptasyonu olarak düşünülebilir. Çünkü kentsel yaşam ratları diğer gruplara göre birçok kirleticiye maruz kalmakta ve mikrobiyotasında kirleticilerin emilimini azaltmak için bu bakteri türlerinin varlığına ihtiyaç duymaktadır.

Birçok bakteri türünden taksonomik olarak çok ayrı özellikler taşıyan ve kentsel yaşam grubunda belirgin bir şekilde 400 kat artışı görülen *Akkermansia muciniphila*, 2004 yılında Muriel Derrien ve diğerleri tarafından önerilen, insan bağırsağının müsin bozundurucu bakteri türüdür (Vos, vd., 2017, Derrien, vd., 2004). Obezite, diyabet ve iltihaplanma ile olan ilişkisini anlamak için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Everard, vd., 2013, Caesar, vd., 2015). *A. muciniphila*'nın insanlarda anti-enflamatuar etkilere sahip olduğuna inanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda *A. muciniphila* kolonizasyonu,

apandisit veya enflamatuar barsak hastalığı (IBD) gibi enflamatuar durumlar arasında negatif korelasyon olduğu kaydedilmiştir. (Dao, vd., 2015; Derrien, vd., 2016).

Son olarak proteobakteri sınıfında yer alan iki farklı tür *Lactobacillus mucosae* ve *Lactobacillus reuteri* RH1 grubunda benzer bir şekilde 5 kat artış göstermiştir. *Lactobacillus mucosae* çubuk şeklinde bir laktik asit bakterisi türüdür. Mukus bağlama aktivitesine sahiptir (Lee, vd., 2012). *Lactobacillus mucosae* dahil birçok *Lactobacillus* türü, intestinal mukusdaki bileşenlere bağlanan mub olarak bilinen bir hücre yüzeyi mukus bağlayıcı proteini kodlayan bir gene sahiptir. Bu yapışma proteininin, bakterilerin gastrointestinal sistem gibi açık akışlı bir ortamda hayatta kalmasını sağladığı belirtilmiştir (Roos, vd., 2000). *Lactobacillus mucosae*'nin epitel geçirgenliğini azalttığı ve epitelyal bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu mikroorganizmanın varlığı, patojenik organizmaların çoğuna karşı rekabetçi bir dışlama sağlar ve yeni probiyotik gıda ürünlerinin geliştirilmesine yardımcı olur. Artmış epitelyal aktivite aynı zamanda birçok bağırsak hastalığına neden olan faktörlerden biridir (Watanabe, vd., 2010).

### **5.1.2. Kırsal alanlarda yaşayan *Rattus rattus*'da bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi**

Kırsal yaşam grubunda (RH2) diğer gruplara kıyasla önemli miktarda artan *Anaerostipes rhamnosivorans*, zorunlu anaerobik, spor oluşturan, bütirat üreten kıvrıkcık ya da çubuk şeklinde bir bakteridir (Bui, ve diğerleri, 2014). Bu tür şekerlerden ziyade asetik ve laktik asitlerden bütirat üretebilen bağırsak mikrobiyotasının başlıca temsilcileridir (Flint, ve diğerleri, 2012a). Bütiratın kansere ve ülseratif kolite karşı koruma sağlayabildiği belirtilmiştir (Hague, vd., 1997). Ayrıca farelerde insülin direnci ve obezite gelişiminin önlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Flint, vd., 2012b). RH2 grubunda artış gösteren ve *A. rhamnosivorans* ile benzer metabolik işleve sahip *Herbinix luporum*, karbon kaynağı olarak glikoz, mannoz, arabinoz, çözünen nişasta, galaktoz, selobiyoz ve selüloz kullanabilen bir bakteridir. Bu substratlardan elde edilen başlıca fermantasyon ürünleri etanol, asetik asit, bütirik asit ve hidrojen dir (Bui, vd., 2014).

RH2 grubundaki artışı ile dikkat çeken *Micropruina glikojenika*, aktif çamurdan izole edilen *Micropruina* cinsinden Gram pozitif ve spor oluşturmeyen bir bakteridir (Shintani, vd., 2000). Bu türler substratları hücre içi glikojen olarak depolayabilir. Hücreler

anaerobik koşullar altında nitratı nitrite indirgemekle birlikte, nitriti nitrojene indirgeyemez. Diğer türlerden farklı olarak antifungal bir etkiyle mantarlar üzerinde beslendiği bilinen *Streptomyces koyangensis*, turp ekim arazilerinden izole edilen *Streptomyces* cinsinden bir bakteri türüdür (Lee, vd., 2005). Kırsal yaşam alanlarındaki ratların mikrobiyotasında bu türlerin bulunması, kentsel yaşam grubundakilere göre daha çok bitkisel ve mantar kökenli besinler tükettiğine işaret etmektedir. Kırsal yaşam grubunun ekolojik çevreleriyle de uyum gösteren iki farklı bakteri türünden *Clostridium cellulosi*, inek gübresi içeriğinde ve bir mandıra toprağından izole edilmiştir. Aynı ekolojik çevrelerde bulunan bir diğer tür *Staphylococcus muscae*'nin ise hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu tür ilk olarak inek çiftliklerinde yakalanan sineklerden izole edilmiştir (Hájek vd., 1992). Bu bakteri türlerinin kırsal yaşam alanlarındaki rat bağırsak mikrobiyotasındaki artışı, mikrobiyota bileşenlerinin çevresel faktörlerden doğrudan etkilendiği yönünde önemli bir göstergedir. Bunların dışında RH2 grubunda yer alan *Actinomyces viscosus*, yetişkin insanların % 70' inin ağızını kolonize eden insan ve hayvan patojeni / patobiontudur (Eng, vd., 1981) *A. viscosus* düşük bir virülans seviyesine sahip olup hayvanlarda periodontal hastalığa neden olurken insanlarda endokardite neden olduğu gösterilmiştir (Mardis, vd., 2001).

### **5.1.3. Laboratuvar ratlarının bağırsak mikrobiyotasının değerlendirilmesi**

Laboratuvar ratları (RL) grubuna ait mikrobiyotada tespit edilen türler arasında 3 tür, dikkat çekici şekilde *Candidatus* cinsinde sınıflandırılmıştır. Bu cins henüz kültürlenmemiş mikroorganizmalar için geçici bir taksonomik kategoridir. *Candidatus Saccharimonas aalborgensis*, *Candidatus Cyclonatronum proteinivorum*, *Candidatus Tachikawaea gelatinosa* metabolik özellikleri tam olarak bilinmeyen türler arasındadır. Bu türlerin yabanıl rat mikrobiyotasındaki (RH1, RH2) popülasyonları oldukça düşük olmasına rağmen, laboratuvar ratları grubunda ortalama olarak 5-8 kat daha fazladır. *Candidatus Saccharimonas aalborgensis* daha önce sadece laboratuvar hayvanı gruplarına uygulanan düşük intektisit uygulamalarında rapor edilmiştir (Fanga, vd., 2018). Yabanıl rat gruplarıyla (RH1, RH2) karşılaştırıldığında laboratuvar ratları grubunda (RL) 3 kat daha yüksek olan bir diğer bakteri *Oscillibacter valericigenes*, bir glikoz ortamında büyütüldüğünde baskın olarak valerat üreterek fermantatif olarak büyümektedir. İnsan bağırsak mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalarda, sağlıklı

kontrol gruplarında *O. valericigenes* türü, Crohn (Bağırsak iltihabı) hastalığı tanısı olan hastalara göre anlamlı derecede daha fazla bulunmuştur (Mondot, ve diğerleri, 2011). RL grubunda bu türün daha yüksek olması daha sağlıklı bir mikrobiyotayı ifade etmektedir. Yabanıl rat örneklerinde daha az olması mikrobiyotaya bağlı hastalıklara yatkınlığın bir göstergesi olarak düşünülebilir. Benzer bir şekilde birçok hastalıkla ters orantılı olduğu düşünülen *Ruminococcus albus* ve *Ruthenibacterium lactatiformans* türleri laboratuvar ratları gurubunda 3 kat daha fazla miktarda bulunmaktadır. Bu türler *Ruminococcus* cinsine ait keşfedilen çeşitli türlerden olup ilk olarak insan bağırsağında bulunduğu bildirilmiştir (Rajilić-Stojanović, vd., 2014). İnsan ve hayvan konakçılarından dışkı, rumen ve bağırsak içeriğinden elde edilmiştir (Rainey, 2009). Bağırsaktaki bitki hücre duvarı yıkımında rol oynayabilirler. *Ruminococcus albus*' un enflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerde daha az olduğu bulunmuştur (Nagao-Kitamoto, vd., 2017; Henke, vd., 2019). Laboratuvar ratlarının (RL) besinleri bitkisel kökenli işlenmiş hayvansal yem statüsünde olduğundan, yabanıl rat gruplarına göre çok farklı bir beslenme diyetleri vardır. Beslenme, mikrobiyotayı doğrudan etkileyen bir faktör olarak görülmektedir. Örneğin doğada toprak, hava ve suda bolca bulunan *Brevibacillus brevis* türü daha çok çürüten bitkisel kaynaklarda yaygın olarak bulunan Gram pozitif, aerobik, spor oluşturan bir basildir. Nadiren bulaşıcı hastalıklarla ilişkilidir. Laboratuvar hayvanı grubunda 10 kat daha fazla bulunan bu tür beslenmeye bağlı olarak mikrobiyotada yer alır. RL grubunda diğer gruplara göre 4 kat daha büyük bir popülasyona sahip *Bacteroides cellulosilyticus* türü ise *Bacteroides* cinsindeki bir bakteridir. Bu bakterilerin, mikrobiyotadaki selülozun (selülitik) bozunmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Selüloz, bitki hücre duvarlarında bulunan ve önemli bir diyet lifi kaynağı olan bir polisakkarittir. Bağırsaktaki çoğu bakteri bitki polisakkaritlerini parçalayamaz (Flint, 2008). Selülozun *Bacteroides cellulosilyticus* tarafından bozunması asetat, propionat ve süksinat üretimiyle sonuçlanır (Robert, 2007). Bu grupta artış gösteren diğer bir tür ise *Pseudomonas koreensis*' tir. *P. koreensis* *Pseudomonas* cinsinin tarımsal topraklarda yaygın olarak bulunan bir türüdür. Organik maddelerin ayrışması ve bitki büyümesinin desteklenmesi ile ilgili çeşitli işlevlere sahip oldukları ve ayrıca patojenik etkiler gösterebildikleri bildirilmiştir (Palleroni, 1993).

## 5.2. Rat gruplarında Diğer Taksonomik Birimlere Göre Mikrobiyotadaki Değişimler

Mikrobiyotadaki tür bazındaki değişikliklerin yanı sıra şube, aile ve cins düzeyinde karşılaştırmalar yapılmıştır. Kentsel yaşam grubu (RH1) mikrobiyotası şube düzeyinde incelendiğinde *Firmicutes* bakterilerindeki artışa karşı *Proteobacteria*, *Actinobacteria*'larda azalmalar görülmüştür. Literatürdeki birçok ağır metal uygulamalarının oral olarak deneysel uygulamasında *Firmicutes*'ların azaldığı, pestisit uygulamasında ise arttığı tespit edilmiştir (Breton, ve diğerleri, 2013) (Breton, ve diğerleri, 2013). Bağırsak mikrobiyotasındaki *Fimicutes*'lar besinlerin sindirilmesi ve enerji dönüşümleri ile ilişkilendirilerek obezite ile ilgili çalışmalarda *Firmicutes*'un arttığı bildirilmiştir (Ley, vd., 2005). Bu çalışmada kentsel yaşam ratlarındaki *Firmicutes* bakterilerindeki artışı, insan besin atıklarına kolay bir şekilde ulaşabilmeleri ile besinlerini daha çok un, şeker gibi yüksek enerjili gıdaların oluşturmasına bağlı olarak hızlı bir metabolizma gereksinimi ile ilişkilendirilebilir. Mikrobiyota değişikliğinde besinin yanı sıra çevresel kirlenmeler de etkili bir faktördür. Bu nedenler sanayi alanından alınan RH1 örneklerinde bu türün artışı çevresel toksiklere karşı geliştirilen bir mikrobiyal savunma sisteminin gereksinimi ile de açıklanabilir. Toksik maddelerin mikrobiyotadaki değişikliklerini inceleyen birçok çalışmada ağır metallerin mikrobiyota içerisindeki *Proteobacteria*'leri pestisitlerin ise *Actinobacteria*'ları azalttığı gösterilmiştir (Wu, vd., 2017). Kentsel yaşam grubundaki rat mikrobiyotasındaki *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* türlerinin azalması, diğer gruplara göre çevresel kirlenmelere daha çok maruz kaldığını göstermektedir. Sınıf düzeyindeki değişimlerin de besin-mikrobiyota arasındaki ilişkiyi destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Kentsel yaşam grubunda artış gösteren *Clostridiales*, *Desulfovibrionales*, *Enterobacterales* türleri, diğer çalışmalarda da uygulanan çevresel kirlenmeler ile mikrobiyota içerisinde arttığı bildirilmiştir (Jaeggi, vd., 2015). Aile düzeyinde önemli işlevlere sahip *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, başta olmak üzere mikrobiyotada önemli azalmalar tespit edilmiştir. Bunlar aileler; *Streptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Actinomycetaceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae*, *Planococcaceae*, *Microbacteriaceae*, *Nocardioideaceae*'dir. Ancak bağırsak bariyer bütünlüğünü destekleyici görevi olduğu bilinen *Akkermansiaceae* başta

olmak üzere zararlı etkilerinin de olduğu bilinen *Leuconostocaceae*, *Eubacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Eggerthellaceae*, *Prevotellaceae* popülasyonlarında diğer gruplara göre artış görülmüştür. Tüm gruplardaki mikrobiyota profilleri genel olarak incelendiğinde, belirlenen 3 şubenin popülasyon büyüklükleri arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Mikrobiyotanın büyük bir kısmını oluşturan bu 3 Şube; *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* yabanıl rat örneklerine göre laboratuvar ratlarında oldukça düşük düzeydedir. Laboratuvar ratları grubundaki mikrobiyota içeriği yabanıl gruplarınkine zıt bir şekilde cins düzeyinde birbirine yakın büyüklükteki popülasyonlardan oluşmaktadır. Yabanıl ratların mikrobiyotasında %80 oranında *Firmicutes* bulunurken, laboratuvar ratlarında bu oran %60'tır. Aile ve cins düzeyindeki sonuçlara bakıldığında laboratuvar ratlarının mikrobiyotasında türlerin popülasyon yüzdeliğinin diğer gruplara göre daha az olduğu görülmüştür. Örneğin çoğu türünün probiyotik olduğu bilinen *Lactobacillales*, yabanıl rat gruplarında ortalama %40 iken, laboratuvar ratları grubunda %12 oranına sahiptir. Ayrıca *Bacillales*, *Lachnospirillum* türlerinin de laboratuvar ratlarında daha düşük oranlarda olduğu görülmüştür. Laboratuvar hayvanlarının steril temiz ve ekolojik kirleticilerden daha uzak bir ortamda yaşadıkları göz önüne alındığında mikrobiyotanın işlevsel olarak bu etkenlere karşı bir bariyer görme işlevi serbest yaşayan rat örneklerine göre daha azdır. Bu yüzden yabanıl rat grupları (RH1,RH2) ile karşılaştırıldığında birçok patojen ve inflamatuvar etkiye sahip bakterilerinde bulunduğu çok sayıda cins laboratuvar ratları (RL) grubunda düşük oranda bulunmaktadır. Genellikle işlenmiş gıdalar, çiğ et ve süt ürünlerinde bulunan *Streptococcaceae*, *Desulfobibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Thermomonosporaceae*, , *Propionibacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Aerococcaceae*, *Planococcaceae*, *Microbacteriaceae*, *Nocardioideaceae*, *Ardenticatenaceae*, *Streptomycetaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Parachlamydiaceae* cinslerinin laboratuvar ratlarında diğer gruplara göre oldukça düşük popülasyonlarda bulunduğu görülmüştür. Mikrobiyotada azalan bu popülasyonların laboratuvar ratlarının bitkisel besinlerle beslenmesi, steril bir ortamda büyümeleri ve birçok ekolojik faktörden uzak bir yaşam geçirmeleri ile ilişkili olduğu muhtemeldir. Mikrobiyotanın konakçının ihtiyaçlarına ve beslenmesine göre şekillenmesi öngörülen bir hipotezdir. Bu çalışmada laboratuvar hayvanlarının mikrobiyotasında şube, sınıf ve cins düzeyinde artış gösteren bakteriler bu

hipotezi desteklemektedir. Laboratuvar ratlarında özellikle bitkisel polisakkaritleri ve besin kaynaklarını sindirmeye yardımcı olduğu düşünölen *Bacteroidetes* sınıfı başta olmak üzere, *Lachnospiraceae* ve *Verrucomicrobiae*'de, cins düzeyinde ise *Bacteroidia* ve *Clostridiales*'lerde artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca RL grubu, diğler gruplarda çok az (%1-5) bulunan probiyotik görevi olan proteobakteri sınıfına dahil Epsilonproteobacteria (%15) Alphaproteobacteria (% 10) ve Deltaproteobacteria (%15) türlerini oldukça yüksek oranlarda barındırmaktadır. Cins düzeyinde incelendiğinde de farklı proteobakteri cinslerini diğler gruplardan daha yüksek oranlarda bulundurmaktadır. Ayrıca Laboratuvar hayvanları gurubunda daha yüksek oranda bulunan diğler bakteri cinsleri *Eggerthellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptococcaceae*, *Muribaculaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Prevotellaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Helicobacteraceae*, *Acholeplasmataceae*, *Sporomusaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Paludibacteraceae*, *Planctomycetaceae*'dir. Bu grupta birçok farklı metabolizmaya sahip ve konak ile simbiyoz olarak yaşayabilen bakteri türleride görölmektedir. Mikrobiyotadaki tür çeşitliliğini belirlemek üzere yapılan Simpsons ve Shannon endexlerine bakıldığında Laboratuvar ratları grubunun en yüksek değere sahip olması mikrobiyotadaki tür çeşitliliğini ifade etmektedir. Laboratuvar ratlarının mikrobiyotalarında diğler gruplarla karşılaştırıldığında birçok tür ortak olmasına rağmen laboratuvar ratlarında daha fazla cins çeşitliliği bulunmuştur. Mikrobiyotada belirlenen bakterilerin populasyon büyüklüğü açısından gruplar arasında farklılıklar olmasına rağmen, birçok tür her grupta ortak olarak tespit edilmiştir. Ancak gruplara spesifik olan bakteri türleri de bulunmuştur. Kentsel yaşam grubunda; *Verrucomicrobiales*, *Eubacteriaceae*, *Leuconostocaceae* ve *Pediococcus* cinsleri, Kırsal yaşam grubunda *Rhodobacterales* ve *Rhizobiales* cinsleri, Laboratuvar ratları grubunda ise *Erysipelotrichales*, *Chromatiales*, *Campylobacterales*, *Flavobacteriales*, *Duncaniella*, *Ruminococcus*, *Flavonifactor*, *Muribaculum*, *Intestinimonas*, *Candidatus Saccharimonas* ve *Marinilactibacillus* cinsleri gruplar arası ayırt edici bakterial florayı oluşturmaktadır.

### 5.3. Filogenetik ve Mikrobiyal Değişimler

Diyet, yaş, cinsiyet, esaret ve tür bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin güçlü etkenleridir. Bağırsakta yerleşen bakteri kolonilerinin memelilerin evrimde oldukça etkili

olduğu düşünölmektedir. Aynı türün üyelerinin bağırsak mikrobiyotaları, diğer türlerinkinden daha çok birbirine benzer. Kara memelileri üzerinde yapılan bir araştırmada bağırdaktaki bakteri içeriğinin doğal ya da tutsak bir çevreden olup olmadıklarına bakılmaksızın genel olarak benzer konakçılar arasında daha benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Türlerle özgü bağırsak mikrobiyotası, bağırsak mikrobiyal bileşiminin konakçı filogenisini yansıttığı bilinen vahşi hominidlerde tanımlanmıştır (Ley vd., 2008; Lombardo, 2008). Bağırsak florasının başlangıçta ve sürekli olarak dış kaynaklardan elde edilen bakteriler tarafından oluşmasına karşın, evrimsel zaman çizelgeleri boyunca büyük maymun türleri arasındaki bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin filogenetik olarak korunduğunu ve dikey kalıtımla tutarlı bir şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir (Ochman vd., 2010). Güney fili ile leopar fok bağırsağı mikrobiyotası araştırılmış ve aralarındaki belirgin farklılıklar, fok filogenisinin benzer şekilde bağırsak mikrobiyotası tarafından yansıtılabileceği gösterilmiştir (Nelson vd., 2012).

Bu araştırmada yaban hayatından alınan *Rattus rattus*, *Mus musculus* ve *N. xanthodon* türünün  $2n=60$  ve  $2n=52$  olmak üzere iki kromozomal formu, filogenetiğin mikrobiyal değişimler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla çalışılmıştır. Gruplardaki tür çeşitliliğini anlamlandırarak pCoA Plot tekniği ile oluşturulan benzerlik grafiğinde tespit edilen belirgin farklılıklar türlerin mikrobiyota üzerindeki etkisini doğrular niteliktedir (şekil 21). Bu çalışmada taksonomik olarak problemlili olan *N. xanthodon* türünün verileri dikkat çekicidir. Türkiye'de *Nannospalax* cinsi genel olarak üç türle temsil edilir - *Nannospalax leucodon* (Nordmann, 1840), *Nannospalax xanthodon* (Satunin, 1898) ve *Nannospalax ehrenbergi* (Nehring, 1898). *N. xanthodon*'un diploid kromozomlarının ( $2n$ ) sayısı 36 ile 60 arasında değişmekte ve temel sayı (NF) 66 ile 92 arasında değişmektedir (Sözen vd., 2013). Sitolojik çalışmalar Anadolu körfareleri için 50'den fazla sitotip (tür içinde farklı kromozomal sayılara sahip bireyler) ortaya koymuştur ve bu olağanüstü karyolojik çeşitlilik önemli bir taksonomik problemdir (Arslan ve Zima, 2015). Araştırmacılar, sitotipleri moleküler teknikler kullanarak taksonomik olarak nasıl değerlendirileceği sorusuna yanıt arıyorlar. Son moleküler çalışmalar, körfarelerin filogenisinin anlaşılmasında dikkate değer veriler sağlamıştır. mtDNA'ya dayalı çalışmalar Anadolu sitotiplerinde tür düzeyinde farklılıklar göstermemekle birlikte, çeşitli sitotipler arasında önemli ayrılıklar bildirilmiştir (Yağcı ve ark., 2018). Bu projede araştırılan *N. xanthodon* türünün  $2n=60$  ve  $2n=52$  kromozomal formları arasında görölen

bağırsak mikrobiyatasındaki değişkenlik sitotiplerin ayrı birer tür ya da clad/ırk tanımlanmaları için yapılacak araştırmalara taksonomik karakter olarak katkıda bulunabilmektedir. Nitekim bizim çalışmamız az sayıda örnek ve sitotiple çalışılmış olup bu konuda kesin bir kural konulmasında yetersiz olmasına rağmen taksonomik olarak problemlili *N. xanthodon* türü için ön çalışma ve yeni veri niteliğindedir.

#### 5.4. Kolorektal ilişkili Genler

Kolorektal kanser (CRC) dünyadaki en yaygın kanserdir ve son yıllarda görülme sıklığı artmaktadır. CRC oluşumunun çeşitli faktörlerle ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Epidemiyolojik veriler, CRC'nin esas olarak çevresel faktörlerden, yeme alışkanlıklarından, fiziksel aktiviteden ve genetik faktörlerden etkilendiğini göstermektedir (Chatenoud vd., 2016). Bağırsak mikrobiyotası, CRC oluşumunun önlenmesinde ve bağırsak bağışıklığının korunmasında önemli roller oynar. Kolorektal kanserle ilişkili PTEN geninin ratlarda ekspresyon seviyesi araştırılmış ve PTEN gen ekspresyonunun kolorektal kanser oluşumu ve gelişimini engellediğı tespit edilmiştir. (Zhang vd., 2019). PTEN geni, klasik bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilen çeşitli fonksiyonlara sahip çoklu anti-tümör özelliklerine sahip bir gendir (Laguë vd., 2008). Pten / Akt / mTOR sinyal yolları, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalmasını dengelemede kritik bir rol oynar. Son çalışmalarda pTEN / AKT / mTOR yolağındaki polimorfizmlerin kansere yakınlık ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. pTEN, bir tümör baskılayıcı ve plazma membran lipid fosfatazdır ve AKT'nin aktivasyonunu inhibe eder, pTEN / AKT / mTOR yolunu negatif olarak düzenler (Zhang ve ark., 2017). Bu çalışmada Pten geni yukarı regüle edilen kırsal ratlarda Mtor ve Akt geninin aşağı regülesyonu Pten/Mtor/Akt sinyal yolağı ile ilgili çalışmaları doğrulamaktadır (Şekil 26). Ancak araştırmamızda çevresel faktörlerin neden olabileceğı kansere yakınlığın kentsel ve kırsal yaşam alanına sahip ratlarda karşılaştırması ve kansere yakınlığın belirlenmesi hedeflenmiştir. Kentsel ratlarda Pten ekspresyon seviyesinde görülen azalma Mtor ve Akt gen aktivasyonunda artışa neden olurken kanser açısından risk oluşturmaktadır. Ön araştırma niteliğinde olan projemizin bu kısmı öneriler bölümünde belirtildiğı üzere ileriki çalışmalarda genişletilerek kapsamlı bir şekilde incelenecektir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikrobiyota içerisindeki türler araştırılan gruplar arasında; yaşadıkları ekolojik çevre, beslenme şekilleri, çevresel kirleticiler ve yaşam alanlarını paylaştıkları diğer popülasyonlar gibi birçok etkene bağlı olarak farklılık göstermektedir. Özellikle besinlerden kaynaklandığını tespit ettiğimiz bakteri türleri gruplar arasında çeşitlilik göstermektedir. Laboratuvar hayvanlarının bitkisel besinlerle beslendiği göz önüne alındığında birçok bitkisel besin sindirimi yapan türlerdeki artış beslenmeyle mikrobiyotanın ilişkisini desteklemektedir. Kentsel yaşam alanından yakalanan grupta mikrobiyotadaki bakteri türleri daha çok un, şeker, işlenmiş et ve süt ürünlerinde yüksek miktarda bulunan bakteri türleri olması beslenmenin doğrudan mikrobiyota üzerinde etkisi olduğunu ve alınan besinlere göre mikrobiyotanın düzenlenmesini göstermiştir. Benzer şekilde farklı yaşam alanlarından yakalanan rat popülasyonlarının ekolojik çevre ile etkileşim halinde olması, çevresindeki bir çok canlı ve gelişmiş organizmada bulunan bakteri türlerinin rat mikrobiyotasında farklı düzeylerde bulunduğu kaydedilmiştir. Kırsal yaşam alanlarından alınan ratlarda daha çok çiftlik hayvanlarında bulunan türlerin belirlenmesi aynı şekilde kentsel yaşam alanlarından alınan ratlarda evcil memeli (kedi, köpek vb.) hayvanlarda bulunan bakteri türleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar rat mikrobiyotasının ekolojik çevresinde bulunan diğer memeli türlerine bağlı olarak mikrobiyotası içeriğinin düzenlendiği ve bu bakteri türleri ile birlikte yaşadığı görülmüştür. Ayrıca çevresel kirleticilere maruz kalmanın mikrobiyotayı fonksiyonel olarak bu kirleticilere karşı savunma oluşturacak şekilde düzenlendiğini görülmektedir. Kentsel yaşam alanından alınan ratlarda birçok çevresel kirleticinin besin, solunum veya temas yoluyla sindirim yoluna alınması mikrobiyotayı işlevsel bir fonksiyon kazandırmaktadır. Birçok bakteri türünün bağırsak bariyerini desteklediği, oluşturulan mukoza ve bakterilerin bağırsak hücrelerine bağlanma proteinleri ile tutunmaları simbiyotik bir yaşam alanı oluşturarak hem mikroorganizmalar için hem de konakçı için avantaj sağlamaktadır. Böylece çevresel kirleticilerin etkisi bağırsak ve mikrobiyotanın oluşturduğu bir savunma sistemi ile azaltılabileceği öngörülebilir. Projemizde çalışılan farklı türler arasındaki mikrobiyotadaki değişiklik beslenme faktörlerinin yanı sıra filogeni ve bağırsak florası arasında güçlü bir ilişki olduğunu, tür farklılıklarının mikrobiyota üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Kromozomal olarak değişiklik gösteren *N.xanthodon* türünde mikrobiyotadaki farklılıklara dikkat çekilerek

türün taksonomik problemi ile ilgili araştırmalara yeni bir yaklaşım sunulmuştur. Son olarak Pten/Akt/Mtor sinyal yolağında kentsel ratlarda görölen Pten ekspresyonunda düşüş, kansere yatkınlık ile mikrobiyota arasındaki ilişkinin önemi vurgulanmaktadır. İleriki araştırmalarımızda hem filogenetik hem de kanser mikrobiyota ilişkisi genişletilerek araştırılacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Carleton, M.D. & Musser, G.G. 2005. Order Rodentia. In Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.) Mammal Species of the World, Third Edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.: 745-752.
2. Altındış M ve Yılmaz K. Sindirim Sistemi Mikrobiyotası ve Fekal Transplantasyon . - Sakarya : Nobel Medicus 37, 2017. - 1 : Cilt 13.
3. Arslan A, Zima J. 2015. Chromosome banding pattern retrieves an independent origin of  $2n = 50$  chromosome populations of *Nannospalax xanthodon* from Turkey. Mamm Biol. 80:440–445.
4. Atta M.A Antimycin-A Antibiotic Biosynthesis Produced by Streptomyces Sp. AZ-AR-262: Taxonomy, Fermentation, Purification and Biological Activities . -: Austral. J. Basic and Appl. Sci. , 2009. - 126–135 : Cilt 3.
5. Bäckhed F. ve al. et Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life : Cell Host Microbe, 2015. - 690-703 : Cilt 17.
6. Bansal T ve Alaniz RC Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. : Proc Natl Acad Sci USA, 2010. - 228–33 : Cilt 107.
7. Belkaid Y. ve T.W. Hand Role of the microbiota in immunity and inflammation : Cell, 2014. - 121-141 : Cilt 157 .
8. Bennet ve M. Stuart "The Black Rat (*Rattus Rattus*)" : The Pied Piper, 2011.
9. Bennett John Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. : Elsevier/Saunders, 2015. - Cilt ISBN 9781455748013.
10. Bennett K. W. ve Eley A. Fusobacteria: New taxonomy and related diseases : Journal of Medical Microbiology, 1993. - 246–254 : Cilt 39 (4).
11. Björkroth K Schilinger U, Geisen R ve Weiss N Hoste B, HolzapfelW, Korkeala HJ, Vandamme P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. : Int J Syst Evol Microbiol, 2002. - 141-8 : Cilt 52.
12. Björkstén B ve Sepp E Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. : J Allergy Clin Immunol , 2001. - 516-520 : Cilt 108.
13. Bressan W Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes : Biocontrol. , 2003. - 233–240 : Cilt 48 (2).

14. Breton J ve Catherine Daniel Joëlle Dewulf , Stéphanie Pothion, Nathalie Froux , Mathieu Sauty, Patrick Thomas , Bruno Pot , Benoît Foligné, Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure : *Toxicology Letters* , 2013. - 132–138 : Cilt 222.
15. Breton J. Ecotoxicology inside the gut: Impact of heavy metals on the mouse microbiome. : *BMC Pharmacol. Toxicol.*, 2013. - 62 : Cilt 14.
16. Breton J. ve S. Massart P. Vandamme, E. D. Brandt, B. Pot, B. Foligné Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome : *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2013,. - 62 : Cilt 14.
17. Brinkman B.M. ve Hildebrand F Kubica M, Goosens D, Del Favero J, Declercq W, Raes J, Vandenabeele P Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. : *Cell Death Dis*, 2011,. - e220. : Cilt 2.
18. Bui TP, de Vos WM ve Plugge CM *Anaerostipes rhamnosivorans* sp. nov., a human intestinal, butyrate-forming bacterium. : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. , 2014. - 787–93. : Cilt 64 (Pt 3)
19. Bui ve Plugge Thi Phuong Nam Willem M. de Vos and Caroline M. *Anaerostipes rhamnosivorans* sp. nov., a human intestinal, butyrate-forming bacterium : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014. - 787–793 : Cilt 64.
20. Bull MJ ve Plummer NT *The Human Gut Microbiome in Health and Disease*. : *Integr. Med. (Encinitas)*, 2014. - 17–22 : Cilt 13.
21. Caesar Robert Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling : *Cell Metabolism*. , 2015. - 658–668. : Cilt 22 (4)
22. Calusinska M., T. Happe B. Joris ve A. Wilmotte The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective : *Microbiology*, 2010. - 1575–1588 : Cilt 156.
23. Carrier J.C. ve E. Aghdassi K. Jeejeebhoy, J.P. Allard Exacerbation of dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: role of NF- $\kappa$ B, : *Int. J. Colorectal Dis.*, 2006. - 381–387 : Cilt 21.
24. Cénit MC. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. : *Biochim Biophys Acta*, 2014. - 1981-1992. : Cilt 1842
25. Chakraborti Chandra Kanti New-found link between microbiota and obesity : *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2015. - 110–119 : Cilt 6 (4).
26. Chatenoud, L., Garavello, W., Pagan, E., 2016. Laryngeal cancer mortality trends in European countries. *Int. J. Cancer* 138 (4), 833–842.
27. Cho J ve Vergin K Morris R, Giovannoni S *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov, a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, *Lentisphaerae* : *Environ Microbiol.*, 2004. - 611–21 : Cilt 6 (6).

28. Chow J ve Lee SM Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host bacterial symbiosis in health and disease. : *Adv Immunol* , 2010. - 243–274 : Cilt 107.
29. Clark D. A. "Foraging behavior of vertebrate omnivore (*Rattus rattus*): Meal structure, sampling, and diet breadth : *Ecology.*, 1981. - 763–772. : Cilt 63 (3):. - doi:10.2307/1936797.
30. Clark ve A. DEBORAH Foraging Behavior Of A Vertebrate Omnivore (*Rattus Rattus*): Meal Structure, Sampling, And Diet Breadth : *Ecology*, 1982. - 763-772 : Cilt 63(3).
31. Claus S.P. ve Ellero S.L., Berger, B., Krause, L., Bruttin, A., Molina, J., Paris, A., Want, E.J., de Waziers, I., Cloarec, O., Richards, S.E., Wang, Y., Dumas, M.E., Ross, A., Rezzi, S., Kochhar, S., Van Bladeren, P., Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. : *mBio*, 2011. - 00271–310 : Cilt 2.
32. Cox L.M. ve S. Yamanishi J. Sohn, A.V. Alekseyenko, J.M. Leung, I. Cho, et al., Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences : *Cell*, 2014. - 705–721. : Cilt 158.
33. Cox MPG, Dickman CR ve Cox WG Use of habitat by the black rat (*Rattus rattus*) at North Head, New South Wales: an observational and experimental study : *Austral Ecology.*, 2000. - 375–85 : Cilt 5 (4): . - doi:10.1046/j.1442-9993.2000.01050.x.
34. Dada N ve M. Sheth K. Liebman, J. Pinto, A. Lenhart Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors : *Sci. Rep.*, 2018. - 2084 : Cilt 8 (1) .
35. Dao Maria Carlota Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology : *Gut*, 2015. - 426–436 : Cilt 65 (3).
36. Derrien Muriel, Belzer Clara ve de Vos Willem M. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions : *Microbial Pathogenesis.*, 2016. - 171–181 : Cilt 106.
37. Derrien ve M. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 2004. - 1469–1476. : Cilt 54 (5)
38. Dong Y. ve R. Aguilar Z. Xi, E. Warr, E. Mongin, G. Dimopoulos Anopheles gambiae immune responses to human and rodent Plasmodium parasite species : *PLoS Pathog.*, 2006-2009. - 52 : Cilt 2 (6).
39. Dowding JE ve Murphy EC "Ecology of Ship Rats (*Rattus rattus*) in a Kauri (*Agathis australis*) Forest in Northland, New Zealand : *New Zealand Journal of Ecology.* , 1994. - 19–28. : Cilt 18 (1)
40. Eng RH Infections caused by *Actinomyces viscosus* : *American Journal of Clinical Pathology.* , 1981. - 113–6. : Cilt 75 (1)
41. Engels ve W. Donald Classical Cats: The Rise and Fall of the Sacred Cat, . - 1999. - ISBN 978-0-415-21251-9, p. 16.

42. Everard A. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. - 9066–9071 : Cilt 110 (22).
43. Faith J.J. ve all et The long-term stability of the human gut microbiota : *Science*, , 2013. - Cilt 341.
44. Falony G. ve al. et Population-level analysis of gut microbiome variation : *Science*, 2016. - 560-564 : Cilt 352 .
45. Fang S. ve Zhao Zhuo Xiaonan Yu, Haichao Wang, Jie Feng Oral administration of liquid iron preparation containing excess iron induces intestine and liver injury, impairs intestinal barrier function and alters the gut microbiota in rats : *Journal of Trace Elemen. in Medi. and Bio.*, 2018. - 12–20 : Cilt 47.
46. Fanga ve Jin WangLia MingZhang, Fa ZhengRenaci, Guo FangPang Chronic chlorpyrifos exposure elicits diet-specific effects on metabolism and the gut microbiome in rats : *Food and Chemical Toxicology*, 2018. - 144-152 : Cilt 111.
47. Fazeli M., Hassanzadeh P. ve Alaei S. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. : *Hum. Exp. Toxicol*, 2010. - 152–159. : Cilt 30.
48. Feng Z. ve Weijiang Z. Rong G., Wen Y. Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats : *Journal of Microbiology*, 2017. - 694–702 : Cilt Vol.55 , No. 9.
49. Fields M Ferretti RJ, Smith JC, Jr., and Reiser S. Effect of dietary carbohydrates and copper status on blood pressure of rats. : *Life sciences* , 1984.. - 763-769, : Cilt 34.
50. Fields M Ferretti RJ, Smith JC, Jr., and Reiser S. Impairment of glucose tolerance in copper-deficient rats: dependency on the type of dietary carbohydrate. : *The Journal of nutrition*, 1984. - 393-397, : Cilt 114.
51. Flandroy L. ve T. Poutahidis G. Berg, G. Clarke, M.-C. Dao, E. Decaestecker, et al. The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems : *Sci. Total Environ.*, 2018. - 1018-1038 : Cilt 627 .
52. Flint H. J. ve Scott K. P., Duncan, S. H., Louis, P. & Forano, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. : *Gut Microbes*, 2012a. - 289–306. : Cilt 3,.
53. Flint H. J. ve Scott K. P., Louis, P. & Duncan, S. H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. : *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012b. - 577–589 : Cilt 9.
54. Freeland W. J. ve Janzen. and D. H. strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. : *American Naturalist*, 1974. - 269-289. : Cilt 108:.

55. Gao B. Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions. : *Environ. Health Perspect.* , 2017, . - 198–206. : Cilt 125, .
56. Gay A. *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum 'Synergistetes' isolated from man : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007. - 2743–2748 : Cilt 57.
57. Gensollen T. ve al. et How colonization by microbiota in early life shapes the immune system : *Science*, 2016. - 539-544 : Cilt 352 .
58. Ghai R ve Rodriguez-Valera F McMahon KD,Lopez-Garcia P (ed.). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river : *PLOS ONE.*, 2011. - e23785 : Cilt 6 (8).
59. Gillespie H. "Rattus rattus — house rat" : *Animal Diversity Web.*, 2004.
60. Grochowska M, M Wojnar ve M Radkowski The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. : *Acta Neurobiol. Exp.* , 2018. - 69–81 : Cilt 78 .
61. Gupta R. S. Origin of Diderm (Gram-negative) Bacteria: Antibiotic Selection Pressure Rather than Endosymbiosis Likely led to the Evolution of Bacterial Cells with Two Membranes. : *Antonie Van Leeuwenhoek.* , 2011. - 171–182 : Cilt 100.
62. Haange S.B. ve A. Oberbach N. Schlichting, F. Hugenholtz, H. Smidt, M. Bergen, H. Till, J. Seifert Metaproteome Analysis and Molecular Genetics of Rat Intestinal Microbiota Reveals Section and Localization Resolved Species Distribution and Enzymatic Functionalities : *J. Proteome Res.*, 2012,. - 5406–5417 : Cilt 11,.
63. Hague A. ve Singh B. & Paraskeva, C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. : *Gastroenterology* , 1997. - 1036–1040. : Cilt 112, .
64. Hájek V Ludwig W, Schleifer, KH ve Springer N Zitzelsberger W, Kroppenstedt RM, Kocur M *Staphylococcus muscae*, a new species Isolated from flies. : *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 97-101 : Cilt 42 (1).
65. Halttunen T. ve Collado M.C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., Salminen, S., Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution.: *Letters in Applied Microbiology* , 2008. - 160–165 : Cilt 46.
66. Hathaway S.C. ve Blackmore D.K. Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospire of the Ballum serogroup in the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand // Printed in Great Britain. - 1981. - s. 87, 427.
67. Hempel S. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. : *Jama*, 2012. - 1959–1969. : Cilt 307, .
68. Henke Matthew T. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory

- polysaccharide : Proceedings of the National Academy of Sciences. , 2019. - 12672– 12677. : Cilt 116 (26):.
69. Horz H.P. Synergistes Group Organisms of Human Origin : Journal of Clinical Microbiology. , 2006. - 2914–2920 : Cilt 44 (8).
  70. Hu Yongjin ve Xia Wenshui, and Ge, Changrong. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages : World J Microbiol Biotechnol, 2006. - 1-11.
  71. Hunter B.A. ve MS Johnson Food chain relationships of copper and cadmium in contaminated grassland ecosystems. : Oikos, 1982. - 108-177. : Cilt 38:.
  72. Ilett K.F. ve Tee L.B., Reeves, P.T., Minchin, R.F., Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. : Pharmacology and Therapeutics , 1990. - 67–93 : Cilt 46.
  73. J.P. Zackular M.A. Rogers, M.T. Ruffin 4th, P.D. Schloss The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer : Cancer Prev. Res., 2014. - 1112–1121. : Cilt 7.
  74. Jaeggi T. ve G.A. Kortman D. Moretti, C. Chassard, P. Holding, A. Dostal, et al., Iron fortification adversely affects the gut microbiome: increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants : Gut, 2015. - 731–742. : Cilt 64.
  75. Jefferies O.J. ve M.C. French Lead concentrations in small mammals trapped on roadside verges and field sites : Environ Pollut, 1972-1976. - 147-156. : Cilt 3:.
  76. Jin Y. Oral Exposure of Mice to Carbendazim Induces Hepatic Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis. : Toxicol. Sci., 2015. - 116–126 : Cilt 147.
  77. Johnson MS ve Roberts RD Hutton M, Inskip MJ Distribution of lead, zinc, and cadmium in small mammals from polluted environments. : Oikos, 1978. - 153-159. : Cilt 30.
  78. Jumas-Bilak E., Roudiere L. ve Marchandin H. Description of 'Synergistes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes : Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009. - 1028–1035 : Cilt 59.
  79. Kamaladevi A., Ganguli A. ve Balamurugan K. Lactobacillus casei stimulates phase-II detoxification system and rescues malathion-induced physiological impairments in Caenorhabditis elegans. : Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol., 2016,. - 19–28. : Cilt 179, .
  80. Kan H. Correlations of Gut Microbial Community Shift with Hepatic Damage and Growth Inhibition of Carassius auratus Induced by Pentachlorophenol Exposure. : Environ. Sci. Technol., 2015, . - 11894–11902. : Cilt 49.
  81. Keddie RM The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria : Springer-Verlag Berlin Heidelberg., 1981. - 1888–1893.

82. Krystufek B. "Rattus rattus". : The IUCN Red List of Threatened Species., 2015. - doi:10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T19360A15137085.en.
83. Lambert G.P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. : J Anim Sci, 2009. - 101–108. : Cilt 87, .
84. Lee J. H. Genome Sequence of *Lactobacillus mucosae* LM1, Isolated from Piglet Feces : Journal of Bacteriology., 2012. - 4766 : Cilt 194 (17).
85. Lee JY *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid : International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. , 2005. - 257–62 : Cilt 55 (Pt 1).
86. Lee S.H. ve P. Shinde J. Choi, M. Park, S. Ohh, I.K. Kwon, et al., Effects of dietary iron levels on growth performance hematological status, liver mineral concentration, fecal microflora, and diarrhea incidence in weanling pigs : Biol. Trace Elem. Res., 2008. - 57–68. : Cilt 126.
87. Lepage P. ve Häsler R Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskis L, Doré J, Raedler A, Schreiber S Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. : Gastroenterology, 2011., - 227–236. : Cilt 141(1).
88. Ley R ve Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI ( Obesity alters gut microbial ecology : Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Research Support)., 2005. - 11070–11075 : Cilt 102 (31).
89. Ley R.E. Human gut microbes associated with obesity. : Nature, 2006., - 1022–1023. : Cilt 444,.
90. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 6:776–788.
91. Ley RE, ve Peterson DA Gordon JI Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine : Cell (Review), 2006. - 837–848 : Cilt 124 (4).
92. Liu Q. Organochloride pesticides modulated gut microbiota and influenced bile acid metabolism in mice. : Environ. Pollut. , 2017., - 268–276. : Cilt 226,.
93. Liu Y. Exposing to Cadmium Stress Cause Profound Toxic Effect on Microbiota of the Mice Intestinal Tract. : PLoS ONE, 2014. - e85323 : Cilt 9.
94. Lombardo, M.P. (2008) Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 479–497.
95. Marchandin H. ve Damay A., Roudiere, L., Teyssier, C., Zorogniotti, I., Dechaud, H., Jean-Pierre, H., and Jumas-Bilak, E. Phylogeny, diversity and host specialization in the phylum Synergistetes with emphasis on strains and clones of human origin. : Res. Microbiol., 2010. - 91–100 : Cilt 161.
96. Mardis JS ve Many WJ Jr Endocarditis due to *Actinomyces viscosus* : Southern Medical Journal. , 2001. - 240–3. : Cilt 94 (2): .

97. Margulis L. Composite, large spirochetes from microbial mats: spirochete structure review : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. - 6966–6970 : Cilt 90 (15).
98. Marsh ve E. Rex "Roof Rats" [Kitap Bölümü] // Internet Center for Wildlife Damage Management. Prevention and Control of Wildlife Damage.. - 2011.
99. Maslowski KM ve Vieira AT Ng A, Kranich J, Sierro F, Di Yu, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. : *Nature*, 2009. - 1282–6 : Cilt 461.
100. Mei Y Screening and distributing features of bacteria with hydantoinase and carbamoylase : *Microbiological Research*, 2009. - 322–329 : Cilt 3 (164).
101. Million M. Gut bacterial microbiota and obesity : *Cell Microbiology and Infection*, 2013. - 305–313 : Cilt 19 (4).
102. Monachese M., Burton J.P. ve Reid G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: A Potential Role for Probiotics? : *Appl. Environ. Microbiol.* , 2012, . - 6397–6404. : Cilt 78, .
103. Mondot S Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota : *Inflammatory Bowel Diseases.* , 2011. - 185–92 : Cilt 17 (1).
104. Morozzi G. ve Cenci G., Scardazza, F., Pitzurra, M.,. Cadmium uptake by growing cells of gram-positive and gram-negative bacteria. : *MicroBios* , 1986. - 27–35 : Cilt 48.
105. Nagao-Kitamoto H ve N Kamada Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease : *Immune Network.* , 2017. - 1–12. : Cilt 17 (1): .
106. Nasuti C. Changes on fecal microbiota in rats exposed to permethrin during postnatal development. : *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016,. - 10930–10937. : Cilt 23,.
107. Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Hahn, B.H., and Hugenholtz, P. (2010) Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol* **8**: e1000546.
108. Osmanagaoglu O. ve Beyatli Y., and Gunduz, U. Isolation and Characterization of Pediocin Producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from Vacuum-Packed Sausages : *Turkish Journal of Biology*, 2001. - 133-143 : Cilt 25.
109. Palleja A. ve al. et Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure : *Nature Microbiol.*, 2018. - 1255-1265 : Cilt 3.
110. Palleroni N. J. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. : *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993. - 231–251. : Cilt 64, .
111. Papanikolaou G. ve K. Pantopoulos Iron metabolism and toxicity : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005. - 199–211. : Cilt 202.
112. Paster BJ Phylum XV. Spirochaetes Garrity and Holt. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, [Kitap]. - 2011. - Cilt 471. .

113. Pasteur L., Observations relatives à la note de M. Duclaux. : Comptes rendus de l'Académie des sciences, 1885. - 68 : Cilt 100.
114. Pengya F. ve Ze Y. Apurva K., Amanpreet K. V. , Xiangkai L., Pu L. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota : Nutrients, 2019,. - 22 : Cilt 11,.
115. Pidoux M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel : MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. , 1989. - 223–238 : Cilt 5 (2).
116. RACKHAM J. *Rattus rattus*: the introduction of the black rat into Britain : ANTIQUITY, 1979. - LIII : Cilt LIII.
117. Rajilić-Stojanović M ve ( de Vos WM The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota : FEMS Microbiology Reviews. , 2014. - 996–1047 : Cilt 38 (5).
118. Rajilić-Stojanović M. ve al. et Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition : Environ. Microbiol., 2013 . - 1146-1159 : Cilt 15 .
119. Rajilić-Stojanović Mirjana ve de Vos Willem M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota : FEMS Microbiology Reviews, 2014. - 996–1047 : Cilt 38 (5).
120. Randazzo C.L., Probiotic supplementation in systemic nickel allergy syndrome patients: Study of its effects on lactic acid bacteria population and on clinical symptoms. : J. Appl. Microbiol., 2014,. - 202–211. : Cilt 118, .
121. Razin S., Yogevev D. ve Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. : Micr. and Molec. Biology Reviews, , 1998. - 1094–1156 : Cilt Vol. 62, No. 4.
122. Riviere D. ve Desvignes V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., and Sghir, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge : ISME. J. , 2009. - 700–714 : Cilt 3.
123. Rook G. Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: an ecosystem service essential to health : Proc. Natl. Acad. Sci., 2013. - 18360-18367 : Cilt 110 .
124. Roos S. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine". : International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. , 2000. - 251–258. : Cilt 50 (1): .
125. Rothschild D. ve al. et Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota : Nature, 2018. - 210-215 : Cilt 555 .
126. Ryan KJ ve (editors) Ray CG Sherris Medical Microbiology (4th ed.). [Kitap]. - : McGraw Hill., 2004. - Cilt ISBN 978-0-8385-8529-0..
127. S.C. Andrews A.K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis, : FEMS Microbiol. Rev. , 2003. - 215–237. : Cilt 27.

128. Sami M. ve Yamashita H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., & Yamasaki, M. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene : *Journal of fermentation and bioengineering*, 1997. - 1-6. : Cilt 84(1).
129. Schmalreck A. F. ve Teuber M., Reininger, W., & Hartl, A. Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. : *Canadian Journal of Microbiology*, 1975. - 205-212 : Cilt 21(2).
130. Schwartz C. ve Walsh E. Reeder *The Wild Mammals of Missouri*, : University of Missouri Press, 2001. - 250. - ISBN 978-0-8262-1359-4.
131. Servin JA ve Herbold CW Skophammer RG, Lake JA Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria : *Mol. Biol. Evol.*, 2008. - 1–4 : Cilt 25 (1).
132. Shintani T. *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. , 2000. - 201–207 : Cilt 50 (1).
133. Shreiner AB, JY Kao ve VB Young The gut microbiome in health and in disease. : *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2015. - 69–75 : Cilt 31 .
134. Siegers C.P. ve D. Bumann H.D. Trepkau, B. Schadwinkel, G. Baretton, Influence of dietary iron overload on cell proliferation and intestinal tumorigenesis in mice, : *Cancer Lett.*, 1992. - 245–249. : Cilt 65.
135. Smith K. ve McCoy K.D., Macpherson, A.J., Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. : *Seminars in Immunology*, 2007. - 59–69 : Cilt 19.
136. Sozen M, Colak F, Sevindik M, Matur F. 2013. Cytotypes of *Nannospalax xanthodon* (Satunin, 1898) (Rodentia, Spalacidae) from western Anatolia. *Turk J Zool.* 37:462–469.
137. Sutcliffe I.C. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture : *Trends Microbiol.* , 2010. - 464–470 : Cilt 18.
138. Tompkins G.R. ve N.L. O'Dell I.T. Bryson, C.B. Pennington, The effects of dietary ferric iron and iron deprivation on the bacterial composition of the mouse intestine, : *Curr. Microbiol.*, 2001. - 38–42. : Cilt 43.
139. Trinder M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. : *Appl. Environ. Microbiol.* , 2016., - 6204–6213. : Cilt 82.
140. Turnbaugh Peter J. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome : *Cell Host & Microbe*, 2008. - 213–223 : Cilt 3 (4).
141. Vercoe ve E. A. Daigneault M., White A., Panaccione R., Duncan S. H. , Flint H. J., O'Neal L, Lawson P.A *Anaerostipes hadrus* comb. nov., a dominant

- species within the human colonic microbiota; reclassification of *Eubacterium hadrum* Moore et al. 1976 : *Anaerobe*, 2012. - 523-529 : Cilt 18.
142. Vos de ve W.M. Microbe Profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa : *Microbiology.*, 2017. - 646–648 : Cilt 1635 (5).
  143. Vrieze A ve Holleman F Zoetendal EG, The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. : *Diabetologia*, 2010. - 606-613 : Cilt 53.
  144. Vuysta L ve Vancanneyt M Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. : *J. Food Microbiol.*, 2007. - 120-127 : Cilt 24.
  145. Walker AW ve TD. Lawley Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. : *Pharmacol Res*, 2013;. - 75-86. : Cilt 69.
  146. Wang J. , H. Tang, C. Zhang, Y. Zhao, M. Derrien, E. Rocher, et al., Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice, : *ISME J.*, 2015. - 1–15. : Cilt 9.
  147. Watanabe M. Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens : *Journal of Applied Microbiology.*, 2010. - 927–935 : Cilt 109 (3).
  148. Wilbring M. *Lactococcus garvieae* causing zoonotic prosthetic valve endocarditis : *Clinical Research in Cardiology*, 2011. - 545–546 : Cilt 100 (6).
  149. Woese C. R. Bacterial evolution : *Microbiological Reviews.* , 1987. - 221–271 : Cilt 51 (2).
  150. Wolf Matthias Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data : *Int J Syst Evol Microbiol.* , 2004. - 871–875 : Cilt 54 (Pt 3).
  151. Wopereis H. ve R. Oozeer K. Knipping, C. Belzer, J. Knol The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis *Pediatr.* : *Allergy Immunol.*, 2014. - 428-438 : Cilt 25.
  152. Wu G., Gut remediation: A potential approach to reducing chromium accumulation using *Lactobacillus plantarum* TW1-1. : *Sci. Rep.*, 2017,. - 15000. : Cilt 7, .
  153. Wu J. Perinatal Lead Exposure Alters Gut Microbiota Composition and Results in Sex-specific Bodyweight Increases in Adult Mice. : *Toxicol. Sci.*, 2016,. - 324–333. : Cilt 151, .
  154. Yagcı T., Sen E., Gurbanov R. (2018). Using ISSR markers in determination of genetic relationship between 2n = 54 and 2n = 60 cytotypes of *Nannospalax xanthodon* (Nordmann, 1840) (Mammalia, Rodentia) from Central Anatolia. *Russian Journal of Theriology*, 17(2), 100- 107., Doi: 10.15298/rusjtheriol.17.2.06.

155. Yılmaz K. ve M. Altındış Sindirim Sistemi Mikrobiyotası Ve Fekal Transplantasyon. Sakarya : Nobel medicus, 2017. - SAYI: 1 : Cilt CILT: 13.
156. Yi P. ve Li L., The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. : Veterinary Microbiology, 2012. - 1–7 : Cilt 157.
157. Yiğit N Ve Çolak E. Çolak R.,Özkurt Ş.,Kandem İ.,Kankılıç T. Türkiye'deki Rattus Fischer, 1803 (Mammalia:Rodentia) Cinsinde Enzim Polimorfizmi ve Genetik Farklılıklar [Rapor]. - Ankara : Ankara Üniversitesi Bilimsel Arastırma Projeleri, 2004.
158. Z. Zhang, Q. Chen, J. Zhang, Y. Wang, X. Hu, S. Yin, M. He, S. Guan, W. Qin, Q. Xiao, et al. Associations of genetic polymorphisms in pTEN/AKT/mTOR signaling pathway genes with cancer risk: a meta-analysis in Asian population Sci. Rep., 7 (2017), p. 17844
159. Z. Zhang, H. Wen, J. Weng, L. Feng, H. Liu, X. Hu, F. Zeng Silencing of EPCAM suppresses hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation in mice with alcoholic hepatitis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway Cell Cycle, 18 (2019), pp. 2239-2254.
160. Zhai Q. Oral administration of probiotics inhibits heavy metal cadmium absorption by protecting intestinal barrier. : Appl. Environ. Microbiol. , 2016, - 4429–4440. : Cilt 82, .
161. Zhai Q. Protective effects of Lactobacillus plantarum CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. : Appl. Environ. Microbiol. , 2013, . - 1508–1515. : Cilt 79, .
162. Zhai Q. Protective Effects of Lactobacillus plantarum CCFM8610 against Chronic Cadmium Toxicity in Mice Indicate Routes of Protection besides Intestinal Sequestration. : Appl. Environ. Microbiol., 2014, . - 4063–4071. : Cilt 80, .
163. Zhang S. Subchronic exposure of mice to cadmium perturbs their hepatic energy metabolism and gut microbiome. : Chem. Res. Toxicol., 2015, . - 2000–2009 : Cilt 28.
164. Zimmermann M.B. ve C. Chassard F. Rohner, E.K. N'Goran, C. Nindjin, A. Dostal, et al., The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote Ivoire : Am. J. Clin. Nutr., 2010. - 1406–1415. : Cilt 92.
165. Zuily S. Lactococcus garvieae endocarditis : Archives of Cardiovascular Diseases, 2011. - 138–139 : Cilt 104 (2).