

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

***JUNCUS ACUTUS*'UN *İN-VİTRO* GAZ ÜRETİM METODU
İLE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİNİN VE REAL-TİME PCR İLE
SELÜLÖLİTİK RUMEN BAKTERİLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Funda ERDEM

**Samsun
Mayıs-2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

***JUNCUS ACUTUS*'UN *İN-VİTRO* GAZ ÜRETİM METODU
İLE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİNİN VE REAL-TİME PCR İLE
SELÜLÖLİTİK RUMEN BAKTERİLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Funda ERDEM

Danışman: Prof. Dr. Nurcan ÇETİNKAYA

**Samsun
Mayıs-2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Funda ERDEM tarafından Prof. Dr. Nurcan ÇETİNKAYA danışmanlığında hazırlanan "Jungus acutus'un *In-Vitro* Gaz Üretim Metodu ile Sindirilebilirliğinin ve Real-Time PCR ile Seltüolitik Rumen Bakterileri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 16 /05 /2014 tarihinde yapılan sınav ile Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Seher KÜÇÜKERSAN, Ankara Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nurcan ÇETİNKAYA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. İsmail KAYA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Oktay GENÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Zehra SELÇUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÖR

Bu arařtırmanın planlanması ve yűrűtűlmesi sırasında ilgi ve yardımlarını gűrdűğűm, çalıřmalarımın her ařamasında bana destek olan danıřmanım Sayın Prof. Dr. Nurcan ÇETİNKAYA'ya, tez izleme komitemde yer alan deęerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İsmail KAYA'ya ve Sayın Doç. Dr. Oktay GENÇ'e Őűkranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve rumen sıvısı űrneklerini alan, Sayın Yrd. Doç Dr. Mustafa SALMAN'a, çalışmalarımın istatistik analizlerini yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Serhat ARSLAN'a teŐekkűr ederim.

Tűm yařamım boyunca olduęu gibi tez çalıřmam sűresince de manevi desteklerini benden hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili anne ve babam Nevin ve Necati ERDEM'e sonsuz Őűkranlarımı sunarım.

Bu arařtırmayı PYO.VET.1904.14.003 Nolu proje ile destekleyen Ondokuz Mayıs Ŭniversitesi'ne teŐekkűr ederim.

ÖZET

JUNCUS ACUTUS'UN İN-VITRO GAZ ÜRETİM METODU İLE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİNİN VE REAL-TİME PCR İLE SELÜLÖLİTİK RUMEN BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Amaç : *Juncus acutus*'un ruminant beslemede alternatif bir kaba yem kaynağı olarak önerilmesi için *in-vitro* gaz üretim metodu ile sindirilebilirliğinin ve real-time PCR ile rumendeki selüloolitik bakteriler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: 2014 Yılı Şubat ayında Kızılırmak Deltasından üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un ham besin maddeleri analizleri AOAC' de belirtilen yöntemlere göre yapıldı (AOAC, 2006). % SOMD ve ME MJ/kg KM *in-vitro* gaz üretim metodu ile bulunan gaz üretiminden hesaplandı. *Juncus acutus*'un selüloolitik rumen bakterileri *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA) üzerine etkileri real-time PCR metodu (Koike ve Kobayashi, 2001) ile belirlendi.

Bulgular: *Juncus acutus*'un üç istasyona göre ham besin madde miktarları OM (% 93,57- 93,89), HP (% 9,77- 10,03), NDF (% 73,76-73,70), ADF (% 46,08-46,58) ve ADL (% 12,01-12,27) arasında bulundu. *Juncus acutus*'un üç istasyona ait 24 saatlik inkübasyonlarından hesaplanan SOMD değerleri % 42,64-42,48; ME_{SOMD} ve ME_{GÜ} değerleri sırasıyla 6,78-6,82 ve 5,05-5,26 MJ/kg KM arasında değişti. Üç istasyona ait *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonlarından alınan rumen sıvılarındaki FS, RF ve RA'nın threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama değerleri zamanla artış gösterdi ve artışlar FS>RF>RA şeklinde tespit edildi.

Sonuç: *Juncus acutus*'un % HP değeri tahıl samanlarından yüksek, düşük kaliteli kuru yonca ve kuru çayır otuna yakın bulundu. Rumen selüloolitik bakterileri FS, RF ve RA'nın miktarlarında artışa neden olan *Juncus acutus*'un % SOMD, ME_{GÜ} ve ME_{SOMD} değerleri açısından tahıl samanlarına, % HP yönünden ise orta kaliteli kaba yemlere alternatif bir kaba yem kaynağı olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Fibrobacter succinogenes*; *in-vitro* gaz üretim metodu; *Juncus acutus*; real- time PCR; *Ruminococcus flavefaciens*; *Ruminococcus albus*

Funda ERDEM, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2014

ABSTRACT

DETERMINATION THE DIGESTIBILITY OF *JUNCUS ACUTUS* BY *IN-VITRO* GAS PRODUCTION AND ITS EFFECT ON RUMINAL CELLULOLYTIC BACTERIA BY REAL-TIME PCR METHODS

Aim: The aim of this study is to estimate the digestibility of *Juncus acutus* by *in-vitro* gas production method and to investigate its effects on rumen cellulolytic bacteria by real-time PCR to recommend *Juncus acutus* as an alternative feed source of roughage in ruminant nutrition.

Material and Method: In February 2014, *Juncus acutus* samples were collected from three different stations in Kızılırmak Delta and their proximate analysis was carried out by AOAC (AOAC, 2006). DOMD and ME values of *Juncus acutus* estimated from gas measured by *in-vitro* method (Menke and Steingass, 1988). The effects of *Juncus acutus* on rumen cellulolytic rumen bacteria *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) and *R. albus* (RA) were determined by real-time PCR (Koike and Kobayashi, 2001).

Results: Crude nutrient values of *Juncus acutus* from three stations were between OM (93.57- 93.89 %), CP (9.77-10.03 %), NDF (73.76-73.70 %), ADF (46.08-46.58 %) and ADL (12.01-12.27 %). DOMD from 24 h incubation time were 42.64-42.48 %, ME_{DOMD} and ME_{GP} values were 6.78-6.82 and 5.05-5.26 MJ/kg DM respectively. FS, RF and RA values calculated from threshold (C_T) values in rumen fluids obtained from 0-96 h incubations showed an increases as FS > RF > RA.

Conclusion: The CP % of *Juncus acutus* was found higher from cereal straw and close to low quality alfalfa hay and dry meadow grass. It caused an increase on rumen cellulolytic bacteria, FS, RF and RA. *Juncus acutus* may be considered as an alternative roughage to cereal straw and also in term of CP % to medium-quality roughage.

Key Words: *Fibrobacter succinogenes*; *in-vitro* gas production; *Juncus acutus*; method, real-time PCR; *Ruminococcus albus*; *Ruminococcus flavefaciens*

Funda ERDEM, PhD. Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2014

SİMGE VE KISALTMALAR

- ADF: Asit Deterjan Fiber
ADL: Asit Deterjan Lignin
DNA: Deoksiribonükleik asit
GÜ: Gaz Üretimi
HP: Ham Protein
HS: Ham Selüloz
HK: Ham Kül
HY: Ham Yağ
KM: Kuru Madde
KMT: Kuru Madde Tüketimi
SKMT: Sindirilebilir Kuru Madde Tüketimi
ME: Metabolik Enerji
NDF: Nötral Deterjan Fiber
OM: Organik Madde
OMS: Organik Madde Sindirilebilirliği
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik Asit
SHP: Sindirilebilir Ham Protein
SHY: Sindirilebilir Ham Yağ
SHS: Sindirilebilir Ham Selüloz
SNÖM: Sindirilebilir Azotsuz Öz Madde
SOMD: Sindirilebilir Organik Madde Derecesi
UYA: Uçucu Yağ Asitleri

F. succinogenes: Fibrobacter succinogenes

R. flavefaciens: ; Ruminococcus flavefaciens

R. albus: Ruminococcus albus

FS: *F. succinogenes*

RF: *R. flavefaciens*

RA: *R. albus*

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kaba Yemler ve Ruminant Beslemede Önemi	3
2.2. Alternatif Kaba Yem Kaynakları.....	3
2.3. <i>Juncus acutus</i>	5
2.4. Kaba Yemlerin Değerlendirilmesi.....	6
2.5. Kaba Yemlerin Kimyasal Kompozisyonlarının Belirlenmesi.....	6
2.6. Kaba Yemlerin Sindirilebilirliklerinin <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Belirlenmesi.....	7
2.6.1. <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....	9
2.6.2. <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Kaba Yemlerin Organik Madde Sindirilebilirliği (OMS) ve Metabolik Enerji (ME) Değerlerinin Hesaplanması.....	15
2.6.3. Kimyasal Kompozisyon Kullanılarak Metabolik Enerjinin Hesaplanması.....	16
2.6.4. <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Yapılan Çalışmalar.....	17
2.7. Ruminantlarda Kaba Yem Sindiriminde Mikroorganizmaların Rolü.....	24
2.8. Yem Değerlendirmede Moleküler Genetik Metotlar.....	26
2.8.1. Moleküler Analizlerde Rumen Örneklerinin Toplanması.....	27
2.8.2. DNA Ekstraksiyonu.....	27
2.8.3. Rumen Mikroorganizmalarının Moleküler Metotlarla Tespiti.....	28
2.8.4. Real Time PCR Metodu ile Yapılan Çalışmalar.....	30
3. MATERYAL VE METOT	40
3.1. Materyal.....	40

3.1.1. Hayvan Materyali.....	40
3.1.2. Yem Materyali.....	41
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	42
3.2. Metot.....	43
3.2.1. Yemlerin Kimyasal Kompozisyonunu Belirlemek için Yapılan Analizler.....	43
3.2.2. <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu.....	52
3.2.3. Real Time PCR Metodu.....	57
3.2.4. İstatistiksel Analizler.....	62
4. BULGULAR.....	64
4.1. <i>Juncus acutus</i> 'un Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	64
4.2. <i>Juncus acutus</i> 'un <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Gaz Üretiminin Belirlenmesi.....	68
4.3. Rumenin Predominant Selüloolitik Bakterileri <i>F. succinogenes</i> , <i>R. albus</i> ve <i>R. flavefaciens</i> 'in Real Time PCR ile Miktar Artışının Tespiti.....	74
5. TARTIŞMA.....	79
5.1. <i>Juncus acutus</i> 'un Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	79
5.2. <i>Juncus acutus</i> 'un <i>İn-vitro</i> Gaz Üretim Metodu ile Gaz Üretiminin Belirlenmesi.....	82
5.3. Rumenin Predominant Selüloolitik Bakterileri <i>F. succinogenes</i> , <i>R. albus</i> ve <i>R. flavefaciens</i> 'in Real Time PCR ile Miktar Artışının Tespiti.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
7. KAYNAKLAR.....	.91
8. ÖZGEÇMİŞ.....	102

1. GİRİŞ

Ruminant hayvanların beslenmesinde kullanılan kaba yemlerin temini küresel ısınmanın etkisiyle her geçen gün daha da zorlaşmakta ve yem fiyatları artmaktadır. Hayvancılık işletmelerinde yem giderleri % 50-80 arasında değişmektedir. Çayır ve meraların verimlerinin de düşüklüğü göz önüne alınırsa kuru ot ve silaj ihtiyacının yem bitkileri yetiştiriciliği ile ancak % 30-35'i karşılanmaktadır. Türkiye'nin kaba yem açığı % 60'ın üzerindedir (Anon, 2011). Türkiye saman fiyatlarının % 400 artması nedeniyle 2012 yılında saman ithal etmiştir. 2014 yılında yağış miktarındaki azalma ve kuraklıktan dolayı kaba yem üretiminin düşeceği beklenmektedir (Anon, 2012a; 2012b). Bu durum ruminant beslemecileri yeni alternatif ve ucuz kaba yem kaynaklarının araştırılmasına yönlendirmektedir. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından 1999-2012 yılları arasında yönetim planını hazırladığı 23 sulak alan bulunmaktadır (Anon, 2013a). Halk dilinde yöresel adı Goga olan *Juncus acutus* sulak alanların en fazla bulunan bitkilerinden birisidir. Kızılırmak Deltası'nda yaklaşık 8.650 ton *Juncus acutus* bulunmaktadır. Sulak alanların doğal yaşamının bir parçası olan mandalar *Juncus acutus*'u tüketmektedir. Bu doktora tezi çalışmasında *Juncus acutus*'un ruminantlar için alternatif kaba yem kaynağı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yemlerin içerdikleri ham besin maddelerinin tayini AOAC ile (AOAC, 2006)'ya göre yapılmaktadır. Ruminantlarda yemlerin sindirim derecesi ve tüketim miktarının tespitini gösteren en sağlıklı yöntem *in-vivo* metotlar olmakla birlikte, bu metodun oldukça pahalı ve zahmetli olması alternatif olarak *in-vitro* ve *in-situ* metotların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu metotlar arasında en çok kullanılanları sellüloz enzim metodu (Mcleod ve Minson, 1978), naylon kese metodu (Mehrez ve Orskov, 1977; Orskov ve McDonald, 1979), iki aşamalı sindirim metodu (Tilley ve Terry, 1963) ve *in-vitro* gaz üretim metodudur (Menke ve ark., 1979; Menke ve Steingass, 1988). Her metodun kendine göre avantaj ve dezavantajları olmasının yanı sıra, *in-vitro* metotlar *in-vivo* metotlara göre zamandan, yem materyalinden ve iş gücünden tasarruf sağlayan etkiye sahip olduğundan tercih edilmektedir.

Rumenin mikrobiyal ekosistemi; bakteri, arkea, protozoa, mantarlar ve bakteriofajlardan oluşmaktadır (Kamra, 2005; Klieve ve ark., 2005). Bu mikrobiyal ortam bitkisel yem maddelerinde bulunan sindirimi zor lignoselülozik yapıların hayvan

tarafından kullanılabilir bileşiklere dönüşümünde etkin olmaktadır. Bu işlevin gerçekleşmesinde başlıca 3 predominant selülitik bakteri olan *Fibrobacter succinogenes* (*F. succinogenes*), *Ruminococcus albus* (*R. albus*) ve *Ruminococcus flavefaciens* (*R. flavefaciens*) aktif rol almaktadır. Kaba yemlerin değerlendirilmesinde bu 3 predominant selülitik bakteri üzerine etkileri incelenmektedir. Real-time PCR rumen mikroorganizmaların bulunabilirliğinin ve başlangıç miktarındaki artışının tespit edilmesinde kullanılan bir tekniktir. Reaksiyonun her döngüsünün sonunda meydana gelen amplikonların tespitine dayalı geleneksel PCR'ın aksine, real-time PCR da ekspanensiyal gelişim fazı boyunca meydana gelen ürünlerin zamana bağlı miktarlarındaki artışın tespiti yapılmaktadır (Zhang ve Fang, 2006; MacKay, 2007).

Bu çalışmada *Juncus acutus*'un ruminantlarda alternatif kaba yem kaynağı olarak önermek için *in-vitro* gaz üretim metodu ile sindirilebilirliği ve real-time PCR tekniği ile selülitik rumen bakterileri olan *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens* üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kaba Yemler ve Ruminant Beslemede Önemi

Türkiye’de, kaliteli kaba yem kaynağı olarak, çayır ve meralar yanında yem bitkileri tarım ürünlerinden de yararlanılmaktadır. Doğal kaynaklar arasında sayılan çayır ve meralar, uzun yıllardır devam eden erken ve aşırı otlatmalar nedeni ile verimliliklerini kaybetmişlerdir. Bunun yanında kaliteli kaba yemin üretiminin sağlanması adına tarlalarda gerçekleştirilen yem bitkileri tarımı ise yetersiz kalmaktadır. Türkiye’nin kaliteli kaba yem açığı 57 milyon tonu bulmaktadır (Açıkgöz ve ark., 2005). Yem bitkileri üretimi yeşil ot olarak değerlendirildiğinde, 2013 yılında toplam 37. 639,202 ton’ dur (Anon, 2013b). Çayır ve meraların verimlerinin de düşüklüğü göz önüne alınırsa kuru ot ve silaj ihtiyacının yem bitkileri yetiştiriciliği ile ancak %30-35’i karşılanmaktadır. Bu bağlamda kaba yem açığı % 60’ın üzerindedir (Anon, 2011). Türkiye’de yem bitkilerinin 2013 yılına ait ekim ve üretim miktarları Tablo 1’de verilmiştir (Anon, 2013b).

2.2. Alternatif Kaba Yem Kaynakları

Dünya genelinde büyük sorunlardan biri olan kaliteli kaba yem kaynaklarının bulunabilirliğindeki sıkıntı ve bunun bir sonucu olarak da hayvanların yaşam ve verim payının karşılanmamasına bağlı verimdeki düşüş, ruminant beslemecileri alternatif kaba yem kaynaklarını araştırmaya zorlamaktadır. Kaba yem denildiğinde akla ilk gelen yemler yonca kuru otu, korunga kuru otu, fiğ kuru otu, üçgül kuru otu, saman ve silajlardır. Ancak bunların yanında buğdaygil yeşil otları (buğday, arpa, yulaf, tritikale yeşil otları), sorgum, hayvan pancarı, sudan otu, yemlik kolza, yemlik lahana, mısır hasılı, ayçiçeği hasılı da alternatif kaba yem kaynağı olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 1.Türkiye Yem Bitkileri Ekim ve Üretimi (Anon, 2013)

ÜRÜNLER	ÜRETİM (Ton)	EKİLEN ALAN (Dekar)
Yem Şalgamı	345125	67724
Buğday (yeşil ot)	136681	219157
Arpa (yeşil ot)	31596	23548
Çavdar (yeşil ot)	2828	6792
Yulaf (yeşil ot)	1088168	803644
Sorgum (yeşil ot)	59358	18396
Tritikale (yeşil ot)	67801	55590
Mürdümük (yeşil ot)	158671	235491
Fiğ (yeşil ot)	4492466	4990430
Üçgül (yeşil ot)	2528	4150
Yonca (yeşil ot)	12616178	6286419
Hayvan Pancarı	131289	28411
Korunga (yeşil ot)	1630572	1914391
Korunga (kuru ot)	785283	
Burçak (yeşil ot)	54566	71411
Burçak (kuru ot)	37956	
Mısır (yeşil ot)	259335	4027160
Mısır (silajlık)	17835115	

2.3. *Juncus acutus*

Juncus acutus, *Juncus* cinsinin tek ve çok yıllık olmak üzere toplam 160 türünden biridir. Sulak alan bitkisi olan *Juncus acutus* kıyılarda ıslak alanlara yakın ya da bir kısmı toprakta bir kısmı suda bulunabilir. Birçok türünde rizom şeklinde gelişen toprak altı kısımları mevcuttur. Yoğun kümeler biçiminde gelişir, toprak altı gövdeleri zayıftır. Kından çıkan sürgünleri bulunur. Gövdeler 100-150 cm uzunlukta olup konik goga şeklindedir (Durak, 2005).

Kızılırmak Deltası'nda yoğun olarak bulunan *Juncus acutus* özellikle Yörükler, Doğanca ve Sarıköy mevkindeki köylüler tarafından sökülüp kurutulduktan sonra bölgedeki araçlar vasıtasıyla Türkiye'nin çeşitli yerlerine (Ankara, Adana, Sivas v.b) gönderilmektedir. *Juncus acutus* çiçekçilerde buket yapımında kullanılmaktadır. Yaz sonuna doğru elle sökülen *Juncus acutus* deltada bulunan aileler için önemli bir gelir kaynağını oluşturmaktadır. Ancak herhangi bir resmiyeti ve söküm izni bulunmayan *Juncus acutus* kuşların yuva alanı olarak kullandıklarından dolayı bu şekilde izinsiz, plansız sökümü delta ekosistemi üzerinde olumsuz etki yaratabilmektedir. Bu sebeple bu sökümlerin resmiyete kavuşturulması ve vergilendirilmesi gerekmektedir. Kızılırmak Deltası'nda yaklaşık 2.549, 22 ha mera alanı bulunmaktadır (Ayan, 2007). Yörükler, Doğanca ve Sarıköyde toplam 519.843 ha'da 8.650 ton *Juncus acutus* üretim kapasitesi bulunmakta, bu da havada kuru 3.719 tona karşılık gelmektedir.

Juncus acutus özellikle Avrupa ülkelerinden İngiltere, İtalya ve Fransa'da kıyı şeridinde yer alırken; Türkiye'de Ordu, Samsun, Giresun, İstanbul, Kocaeli, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Adana ve Hatay'da yayılış göstermektedir (Altınayar, 1988; Durak, 2005).

2.4. Kaba Yemlerin Değerlendirilmesi

Ham selüloz içeriği kuru maddede % 18' den daha fazla olan yeme kaba yem denir. Ruminant beslemede büyük öneme sahip kaba yemler oldukça zengin bir çeşitlilik gösterir. Bu çeşitlilikten dolayı kaba yemler farklı besin maddeleri içeriğine sahiptir. Bu nedenle konsantre yemlerin aksine; kaba yemlerin besin madde içerikleri oldukça geniş bir değişim göstermektedir.

2.5. Kaba Yemlerin Kimyasal Kompozisyonlarının Belirlenmesi

Ruminant beslemede nem oranı yüksek yemlerle havada kurutulmuş kaba yemler birlikte kullanıldığı için yem tüketimi kuru madde bazında tanımlanmakta ve çoğu zaman rasyondaki miktarı kuru madde bazında ifade edilmektedir. Bitki hücre duvarının temel bileşenleri ruminantlar tarafından sindirilen selüloz, hemiselüloz, pektin ve ligninden oluşmaktadır.

Kimyasal analizler yemin ham besin maddeleri hakkında bilgi verir. Yem değerlendirmede kullanılan kimyasal analizler ham protein (HP), ham yağ (HY), ham selüloz (HS), ham kül (HK) ve azotsuz öz madde AOAC (2006)' da bildirilen yöntemle göre belirlenir. Diğer taraftan kaba yemlerdeki selülozun sindirilebilirliğini belirleyen kriterler, Nötral Deterjan Fiber (NDF), Asit Deterjan Fiber (ADF), Asit Deterjan Lignin (ADL) oranlarıdır. ADF, NDF ve ADL analizleri Van Soest metoduna (Van Soest ve ark.,1991) göre yapılmaktadır. NDF içindeki çözünebilir maddeler çoğunlukla nişasta, şeker, HP ve yağdan meydana gelir ve % 98 oranında sindirilebilir haldedir. Bu nedenle NDF miktarı arttıkça, NDF içinde yer alan çözünebilir maddeler düşer. Bir kaba yemin toplam NDF içeriği, kaba yemin genel kalitesini ve sindirilebilirliğini ortaya koyan değerdir. ADF ise NDF içerisinde hemiselüloz çıkartılarak elde edilir ve yemin sindirilebilirliğinin yanında hayvanın enerji alımı hakkında fikir sahibi olmayı sağlar. ADF selüloz ve lignini içerir. Yem içerisindeki nişasta ve şeker gibi kolay çözünebilir karbonhidratlardan oluşan kısım azotsuz öz madde adını alır ve HP, HY, HS toplamının organik maddeden çıkarılması ile elde edilir.

2.6. Kaba Yemlerin Sindirilebilirliklerinin *İn-vitro* Gaz Üretim Metodu ile Belirlenmesi

Yemlerin kimyasal kompozisyonlarının belirlenmesinde Weende analiz yöntemi yeterli olurken yemlerin ihtiva ettiği besin maddelerinin hayvan tarafından kullanım etkinliği ve yararlanılabilirliğinin tespiti ancak sindirilebilirliklerinin tespitiyle mümkün olmaktadır.

Kaba yemlerin besleme değerlerinin tahmin edilmesinde birçok yem değerlendirme metotları bulunmaktadır. Yem değerlendirmede uygulanabilir olan yem kullanımının optimizasyonu, hayvan verimi, ve üreticiye sağladığı karlılıktır. Günümüzde yemlerin besleme değerlerinin belirlenmesinde *in-vitro* metotların kullanıldığı çalışmalar çok fazla kabul görmüştür. Bunun nedeni uygulamanın kolaylığı, tekrarlanabilirlik, hayvan kullanımının minimuma indirilmesi ve *in-vivo* yem değerlendirme metotlarının maliyetinden daha ucuz olmasıdır. Stratejik olarak yem değerlendirmede yemin özelliklerini belirlemek için hayvan performansı tespit edilmelidir (Singh ve ark., 2010).

Yemlerin sindirilebilirliklerinin değerlendirilmesinde klasik *in-vivo* sindirim denemelerinin yanında *in-vivo* (çift kanüllü hayvan) *in-situ* ve *in-vitro* yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Bu üç yöntemle de besin maddesinin herhangi birinin sindirilebilirliği hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Yemlerin sindirilebilirliklerinin doğrudan deney hayvanının üzerinde gerçekleştirildiği çalışmalar *in-vivo* adını alır. Prensipinde bu yöntemde sindirim sisteminde sindirime maruz kalmayan bir indikatör kullanılarak yemlerin sindirilebilir kısmı yem ve dışkı arasındaki farktan hesaplanır. Diğer kullanılan *in-vivo* metotlar da sindirim sisteminin istenilen bölümüne (rumen, abomasum veya ince bağırsak) analiz için örnek alınmasını sağlayan kanül takılması gerekmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda ya basit bir kanül ya da re-entant kanül kullanılmıştır (Çetinkaya ve ark., 1997).

İn-situ metot (Mehrez ve Orskov, 1977; Orskov ve McDonald, 1979) ise belli miktar yemin, özel bir naylon kese içinde rumen ortamında belli süre inkübe edilmesine dayanmaktadır. Bu metot, yemin çalışılan besin maddesinin rumende parçalanabilirliğinin yerinde belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Naylon kese

teknikinde besin maddelerinin parçalanabilirliklerinin doğru tahmin edilmesi, kesenin gözenek büyüklüğü, örnek miktarının kese yüzey alanına oranı (mg/cm^2), yem örneklerinin partikül büyüklüğü, keselerin rumene yerleştirilme şekli, denemede kullanılan hayvana verilen rasyon, kullanılan hayvan türü ve sağlığı kesenin yıkanma şekli, yemleme sıklığı ve kese içerisinde inkübasyon sonrası geriye kalan kalıntılara bakterilerin tutunma düzeyi gibi faktörlere bağlıdır (Çetinkaya, 1996).

Enzimatik metotların prensibi ise protein veya karbonhidratların sindirilebilirliklerinin tespiti için çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar veya diğer enzimlerin kullanımına dayanmaktadır (McLeod ve Minson, 1978).

In-vitro yöntemde prensip suni rumen ortamının oluşturularak yemlerin sindirilebilirliğinin tespitine dayanmaktadır. *In-vitro* yöntemlerden bir tanesi Tilley-Terry metodudur (Tilley ve Terry, 1963). Bu metotta $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de rumen sıvısı, tampon çözeltisi ve yem maddesi anaerobik şartlarda 48 saat süre ile fermentasyona bırakılır. Fermentasyon sonunda örnekler santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra geriye kalan kısmın asit-pepsin ile 48 saat sindirime tabi tutulması sonrasında yemin sindirilebilirliği saptanır. Diğer bir *in-vitro* yöntem ise gaz üretim metodudur. Bu metot diğer *in-vitro* yöntemler ile kıyaslandığında kaba yemlerin enerji değeri ve *in-vivo* sindirilebilirliğine yakın değerlerin tahminini sağlaması bakımından daha avantajlıdır.

In-vitro gaz üretim metodunda yemler tamponlanmış rumen sıvısıyla inkübe edilir. Önce parçalanır ve parçalanan fraksiyon ya gaz (CO_2 ve CH_4), uçucu yağ asitlerini (asetik asit, propiyonik asit, butirik asit) oluşturur ya da mikrobiyal protein sentezine katılır (Singh ve ark., 2010).

2.6.1. *İn-Vitro* Gaz Üretim Metodu ile Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Gaz üretim profilinin yorumu ve tanımlanmasını yapmak için yeni gaz üretim metotları geliştirme ve mevcutların otomasyonunda uygun matematik modellere acil ihtiyaç duyulmaktadır. Gaz üretim profillerinin farklı şekillerde ve çoğunlukla sigmoidal bir eğri olması uygun bir model seçimini zorlaştırmaktadır. Profilin eğimi fermentasyonun ilk safhasında sıfır olma yönündedir, çok az veya hiç gaz üretimi yoktur, bu durumda lag faz oluşur. Daha sonra substrat bitinceye ve asimtota ulaşıncaya kadar kararlı bir artış gözlenir. İdeal olan, eğride kıvrılma olan ve olmayan sigmoidal şekilleri kapsayan bir modelleme yapabilmektir (France ve ark., 2000a; 2000b).

Gaz üretim profillerinin matematiksel tanımlamaları; sonuçların analizini, ortamla ilgili farklılıklar ve substratın değerlendirilmesini ve yemin çözünen ve yavaş çözünen bileşenlerinin fermente olabilirliğinin analizlerine olanak sağlar. Gaz üretim profillerini tanımlamak için farklı modeller bulunmaktadır.

Sindirim ve mikrobiyal büyüme ile ilişkilendirilen gaz üretim modelinde; hücre kütlelerinin sindirilen substratla ve ikinci olarak da üretilen gazın sindirilen substratın miktarıyla orantılı olduğu varsayılır. Bu kabullerin birleştirilmesinin sonucu mikrobiyal kütle ve gaz üretiminin birbirleriyle orantılı olduğudur.

Gaz üretiminin genel diferansiyel eşitliği;

$$dV/dt = f(M,S)$$

M: Mikrobiyal kütle

S: Sindirilebilir substratın kütlesi

V: t zamanına kadar üretilen gaz hacmi

Tamponlanmış rumen sıvısında yem örneğinin *in-vitro* inkübasyonu sırasında gözlenen kümülatif gaz üretiminin zamanla değişimi birinci derece substratla sınırlı model Ørskov ve McDonald (1979)'ın modifiye ettiği Mitscherlich eşitliği, genelleştirilmiş Mitscherlich (France ve ark., 1993) modeli ve bakteriyal büyüme modelleri, Gampertz modeli (Bidlack ve Buxton, 1992; Groot modeli (Groot ve ark.,

1996) ve lojistik modeldir (Schofield ve ark., 1994). Lojistik ve Gampertz eşitliklerinin her ikisinde de sigmoidal eğri oluşur fakat büyüme hızı üzerine substrat sınırlamasının matematiksel etkisinde farklılık vardır. Gaz üretim hızı ve potansiyeli ölçümlerin uygun modellere uygulanmasıyla bulunur. En yaygın kullanılan modifiye Ørskov ve McDonald, Lojistik, Gampertz ve France modelleridir.

I. Modifiye Ørskov ve McDonald Modeli

Gaz hacmi değişim hızı mikrobiyal kütle ile orantılı kabul edilir, fakat substrat seviyesi son t zamanında sıfır oluncaya kadar substratın miktarından bağımsız olarak dikkate alınır. Birinci derece substratla sınırlı Ørskov ve McDonald (1979) modeli (modifiye Mitscherlich eşitliği) aşağıda verilen eşitlikle tanımlanır.

$$\text{Lag fazsız} \longrightarrow y=b (1-e^{-ct})$$

$$\text{Lag fazlı} \longrightarrow y=b (1-e^{-c(t-L)})$$

y: t zamanında gaz üretimi (mL)

b: Potansiyel gaz üretimi (mL)

c: Hız sabiti

L: Lag zaman

İki bölmeli model;

$$y=b_1 (1-e^{-c_1(t-L_1)})+y=b_2 (1-e^{-c_2(t-L_2)})$$

y: t zamanında gaz üretimi

b₁ ve b₂: t= ∞ da maksimum gaz üretimi

c₁ ve c₂: Spesifik hızların hız sabiti

L₁ ve L₂: Lag faz değerleri

Toplam gaz hacminin yarısını üretmek için geçen zaman (T_{1/2}) aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$T_{1/2}=\ln 2/c=0.693/c$$

II. Lojistik modeli

Tek bölmeli lojistik model; gaz üretim hızının biriken mikrobiyal kütle ve kalan sindirilebilir substrat miktarı ile orantılı olduğu kabulünden türetilmiştir (France ve Thornley, 1984; Schofield ve ark., 1994). Lojistik model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$Y = \frac{b}{\{1 + e[2 + 4c(L - t)]\}}$$

Y: Gaz üretimi (mL) t zaman sonra

b: Potansiyel gaz üretimi (mL)

c: Hız sabiti

L: lag zaman

Kıvrılma noktasında, $y = b/2\mu$).

İki bölmeli model;

$$Y = \frac{b_1}{\{1 + e[2 + 4c_1(L_1 - t)]\}} + \frac{b_2}{\{1 + e[2 + 4c_2(L_2 - t)]\}}$$

Y: t zamanında gaz hacmi

b_1 ve b_2 : $t = \infty$ da maksimum hacim

c_1 ve c_2 : Spesifik hız olarak adlandırılan hız sabitleri

L_1 ve L_2 : Lag değerine eşit sabitler

İki bölmeli lojistik model ile fermentasyon eğrisinin tanımlanması gazın iki ayrı hızda üretildiğini gösterir. Oysa tek bölmeli modelde tek bir fermentasyon hızı vardır. İki bölme iki farklı substrat fermentasyonundan, farklı iki mikrobiyal popülasyondan veya her iki faktörün kombinasyonundan dolayı meydana gelir. Stefanon ve ark. (1996) farklı olgunlaşma basamağında brom otu ve yoncanın suda çözünebilir fraksiyonlarının fermentasyonundan iki bölmeli lojistik model parametreleri hesaplamışlardır. Schofield ve Pell (1995) yonca'da nötral deterjan çözeltisinde çözünen

karbonhidratlar için iki bölmeli lojistik modelden parametreler hesaplamış ve yayınlamışlardır.

III. Gompertz Modeli

Gompertz modeli gaz üretiminin mikrobiyal aktivite ile orantılı olduğunu kabul eder fakat orantı parametreleri zamanla azalır, fermentasyonda verim kaybından dolayı birinci dereceden kinetiğe göre işlem olur veya substrat sınırlanmasının büyüme üzerine etkisi yoktur (Bidlack ve Buxton, 1992). Büyüme hızı hücre kütlesi ile ilişkilidir ve büyüme hızı eksponensiyel olarak bakteri inaktivasyonundan dolayı zamanla azalır.

Sigmoidal Gompertz modeli parçalanma eğrilerine üç fazda uygulanabilir.

İlk Faz: Hidrasyonda yavaş veya hiç parçalanma yoktur, yemde mikrobiyal tutunma ve kolonizasyon olur.

Eksponensiyel Faz: Hızlı parçalanma olur ve substrat mikroorganizmalar ve enzimlerle sature edilir.

Asimptotik Faz: Parçalanma, asimptota yaklaştıkça yavaşlar. Fermentasyona uğrayacak materyalin tükendiği fazdır.

Beuvink ve Kogut, (1993) kıvrılma noktasındaki maksimum parçalanma hızını, fermentasyon hızını, maksimum fermentasyon zamanını ve substratın % 95'inin fermente olduğu zamanın kullanılmasını önermişlerdir.

$$y = B e^{-C e^{-At}}$$

y: Gaz Üretimi (mL) t zaman sonra

B: Asimtot değer (toplam potansiyel gaz üretimi)

C: Nispi gaz üretim hızı

A: Mikrobiyal verim sabit faktörü

Fraksiyonel parçalanma hızı (μh^{-1}), $t_{1/2}$ de aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$\mu = C + \frac{A}{2\sqrt{t}}$$

İki bölmeli Gompertz fonksiyonu gaz üretimine aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$V_t = V_1 \exp\{-\exp[1-k_1(t-L_1)]\} + V_2 \exp\{-\exp[1-k_2(t-L_2)]\}$$

V_t: t zamanda ölçülen hacim

V₁, k₁ ve L₁: Birinci bölmede birikimli gaz üretim hacmi, hız sabiti ve lag parametreleri

V₂, k₂ ve L₂: İkinci bölmede birikimli gaz üretim hacmi, hız sabiti ve lag parametreleri

t: Her iki bölmede de saat olarak geçen zaman

Birinci ve ikinci bölmelerdeki kinetik parametrelerin hesaplanmasıyla rumende açığa çıkan enerji ve azot miktarları hesaplanır. Hesaplanan değerlerden senkroni indeksi hazırlanabilir.

IV. France Modeli

France modeli France ve ark. (1993) tarafından tasarlanmış geliştirilmiş Mitscherlich'dir. Hız sabiti c=0 olduğunda Ørskov ve McDonald modeli ile aynıdır. Bileşenlere bağlı olarak zamanın karekökü modele eklenmiştir (Dhanao ve ark., 1995).

$$y = A \{ 1 - e^{-[b(t-T) + c(\sqrt{t}-\sqrt{T})]} \}$$

y: t zaman sonra gaz üretimi (mL)

A: Asimptotik değer (Toplam potansiyel gaz üretimi)

T: Lag zamanı

b ve c: Hız sabitleri

Fraksiyonel hızın (μ , h⁻¹) zamanla değişimi dikkate alınır.

$$\mu = \frac{b+c}{2\sqrt{t}} \geq T$$

b (h⁻¹) ve c (h^{-1/2}) sabitler

$b \geq 0$, $c \geq -2b\sqrt{T}$ koşullarında μ değeri negatif olamaz.

V. Groot Modeli

Groot ve ark. (1996) tarafından tanımlanan tek fazlı sigmoidal modeldir.

$$G = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{1 + \frac{B_i t^{C_i}}{t^{C_i}}}$$

Bu eşitlikte, G (mL/g OM) inkübasyona konan t sürede gram OM başına üretilen gaz miktarını, A_i (mL/g OM) asimtotik gaz üretimini, B_i (h) asimtot gaz üretim değerlerinin yarısına ulaşılması için geçen zamanı ve C_i profilin değişen karakteristiklerinin kesinliğini belirten sabittir. Değer (i) profilde faz sayılarını göstermektedir ($i=1, n$). $C \leq 1$ ise ($t \geq 0$)' da profilde kırılma yoktur. C değeri arttıkça profil sigmoidal şekil alır, eğim artar. C, ∞ olunca basamaklı fonksiyon oluşur başlangıç eğim de sıfırdır.

Gaz üretimini tanımlamaya çalışan bu eğrilerle her zaman biyolojik olarak anlamlı parametreler üretilmez. Gaz üretim denemelerinin sonuçları sıklıkla yanlış yorumlanır ve uygun olmayan eğriler çizilir.

Gaz üretiminin substrat sindirimi ve besin değeriyle doğrudan ilişkili olduğu varsayılır. Bu durum tam doğru değildir, çünkü gaz üretimi substrat kompozisyonuna, mikrobiyal popülasyona ve mikrobiyal verim için heksoz kullanımına bağlıdır.

Bazı araştırmacılar (Beuvink ve Spolstra, 1992; William, 2000) yemden daha az gaz üretildiğinde propiyonat öncül maddelerinin asetat ve bütirat öncül maddelerine göre daha fazla bulunduğunu bildirmişlerdir. Schofield (2000) tarafından yüksek protein içeren yemlerde amonyağın uçucu yağ asiti (UYA) ile birlikte kullanılmasından dolayı gaz üretiminin azaldığı ortaya konmuştur. Bütün bu faktörler substrat fermentasyonu süresince üretilen gaz miktarını belirler. *In-vitro* gaz üretim değerleri tek başına direkt olarak yemle ilgili az bilgi sağlar. Bu nedenle gaz üretim ölçümleri substratın azalması UYA profilleri ve mikrobiyal verimle birlikte incelenen yemin besin değerini ortaya koymak için birleştirilmelidir (Schofield, 2000; Blummel ve ark., 2003).

2.6.2. *İn-vitro* Gaz Üretim Metodu ile Kaba Yemlerin Organik Madde Sindirilebilirliği (OMS) ve Metabolik Enerji (ME) Değerlerinin Hesaplanması

İn-vitro gaz üretim metodunda toplam gaz üretimi ölçülerek substratın parçalanma hızı ve potansiyel parçalanma değerlerinden kuru madde tüketimi (KMT) ve sindirilebilir kuru madde tüketimini (SKMT) hesaplamak için aşağıdaki eşitlikler önerilmektedir (Blummel ve Ørskov, 1993).

$$\text{KMT (kg/gün)} = 1.529 + 0.455a + 0.0324b$$

$$\text{SKMT (kg/gün)} = -0.933 + 0.301a + 0.0496b$$

a: Çözünen fraksiyon

b: Çözünmeyen ve fermente olan fraksiyon

Menke ve Steingass (1988) tarafından kaba yemler için 24 saatlik inkübasyon sonrası gaz üretiminden (GÜ) organik madde sindirilebilirliği (OMS), metabolik enerji (ME) değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda verilmiştir (Singh ve ark., 2010).

$$\text{OMS (\%)} = 14.88 + 0.889 \text{ GÜ} + 0.45 \text{ HP} + 0.0651 \text{ HK}$$

$$\text{ME (MJ/kg KM)} = 2.2 + 0.136 \text{ GÜ} + 0.057 \text{ HP} + 0.0029 \text{ HY}$$

Metabolik enerji değeri sindirilebilir organik madde kullanılarak aşağıdaki formülden hesaplanabilir.

$$\text{SOMD (\%)} = 57.2 + 0.365 \text{ GÜ} + 0.304 \text{ HP} - 1.98 \text{ ADL}$$

$$\text{GÜ (mL/200 mg KM)}$$

$$\text{ME (MJ/kg KM)} = 0.16 \text{ SOMD}$$

Yukarıdaki eşitlikteki SOMD: Sindirilebilir Organik Madde Derecesi

Bunun yanında maliyetinin düşük olması, kolay tekrarlanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle *in-vitro* yöntemler arasında en geniş kullanım alanına sahip olan metottur. Gaz üretim metodunda (Menke ve ark., 1979; Menke ve Steingass, 1988;

Getachew ve ark., 2004) prensip; fermentasyonla üretilen gazın net mikrobiyal metabolizma ile ilişkisinden yola çıkılarak sindirilebilirliğin hesaplanmasına dayanmaktadır. Üretilen gaz miktarlarının ölçülmesi ile yem maddelerinin sindirim hızı ve düzeyinin tespiti de mümkün olabilmektedir.

2.6.3. Kimyasal Kompozisyon Kullanılarak Metabolik Enerjinin Hesaplanması

Metabolik enerji sindirilebilir enerjiden metan ve idrar olarak kaybedilen kısmının çıkartılması ile hesaplanmaktadır. Metabolik enerjinin kullanım etkinliği kullanım yönüne, rasyonun dengesine, yemlerin birbiriyle etkileşimine, çevre faktörlerine bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir. Metabolik enerjinin kullanım etkinliğinin hesaplanmasında rasyonun metabolize edilebilirliği dikkate alınmaktadır. Yemlerin ME içeriklerinin saptanmasında, yemlere ait ham besin madde analiz sonuçları veya sindirilebilir besin madde analiz sonuçlarından yararlanılmakta ve farklı regresyon eşitlikleri ile yemlerin ME içeriklerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Kaba yemler için HS, ADL, ADF, ADF-HS değerinden ME hesaplanırken aşağıdaki formüllerden yararlanılır (Kirchgesner ve ark., 1977).

HS'a göre ME hesaplama:

$$\text{MEHS, kcal/kg KM} = 3309.5 - 35.64 \times \text{HS}$$

ADL'ye göre ME hesaplama:

$$\text{MEADL, kcal/kg KM} = 2764 - 102.73 \times \text{ADL}$$

ADF ve HS'a göre ME hesaplama:

$$\text{MEADF+HS, kcal/kg KM} = 3464.7 - 58.10 \times \text{ADF} + 27.99 \times \text{HS}$$

ADF'ye göre ME hesaplama:

$$\text{MEADF, MJ/kg KM} = 14.60 - 0.13 \times \text{ADF}$$

2.6.4. *In-vitro* Gaz Üretim Metodu ile Yapılan Çalışmalar

Ruminantların beslenmesinde kullanılan dört farklı kaba yeme (buğday samanı, arpa samanı, yonca kuru otu, yonca silajı) ait gaz üretim parametreleri, ME değerleri ve OMS *in-vitro* gaz üretim metodu kullanılarak gösterilmiştir. Fermentasyon sonucu açığa çıkan gazın miktarı 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülmüştür. NDF (% 56.72 , % 72.73) ve ADF (% 54.33,% 53.23) bakımdan zengin ancak HP bakımından fakir (% 3.14, % 4.22) olan buğday ve arpa samanının *in-vitro* fermentasyonu sonucu elde edilen gaz değerleri 0. ve 96. saat aralığında sırasıyla 13.50-45.33 mL,13.33-47.00 mL olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu değerler, NDF (% 42.40, % 43.72) ve ADF (% 27.36, % 33.44) bakımından fakir fakat protein bakımından zengin (% 18.37, % 16.41) olan yonca kuru otu ve silajının fermentasyonu sonucu elde edilen gaz değerlerinden (16.67-63.67 mL, 20.97-68.17 mL) önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Gaz üretim değerleri kullanılarak hesaplanan ME değerleri sırasıyla $ME_{\text{buğday samanı}} (7.04) < ME_{\text{arpa samanı}} (7.15) < ME_{\text{yonca kuru otu}} (10.41) < ME_{\text{yonca silajı}} (10,79)$ MJ/kg KM bulunmuştur. OMS bakımından sıralaması yapıldığında, yonca kuru otu (%64.90) = yonca silajı (% 67.90)> buğday samanı (% 46.76) = arpa samanı (% 46.21) şeklinde bulunmuştur (Kamalak, 2005).

Ruminant yemi olarak elma ağacı yapraklarının kimyasal kompozisyonu ve polietilen glikol (PEG) ilavesiyle ME ve OMS'nin *in-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Kimyasal kompozisyonu sırasıyla KM % 92.53, HP % 10.80, HY % 9.0, HK % 8.60, NDF % 23.0, ADF % 15.4 olarak tespit edilmiştir. Gaz üretim değerleri 24 ve 96 saatlik sırasıyla 52.44 mL ve 62.60 mL, gaz üretiminden hesaplanan OMS'i % 74.96 ME değeri ise 11.48 MJ/kg KM olarak bulunmuştur (Nahand ve ark., 2010).

Nijerya'ya özgü 5 tarımsal atığın (kasava kabuğu, mısır koçanı, portakal posası, darı ve yer elması kabuğu) hayvan yemi olarak kullanımının araştırıldığı çalışmada *In-vitro* gaz üretim tekniğinden yararlanılmıştır. Yemler (kasava kabuğu, mısır koçanı, portakal posası, darı ve yer elması kabuğu) kimyasal kompozisyon bakımından incelendiğinde sırasıyla HP ;% 5.25, % 3.89, % 7.53, % 7.26 ve % 11.14, NDF ;% 68.48, % 70.63, % 69.17,% 70.28 ve % 70.17, ADF; %47.41, % 51.58, % 46.79, % 48.62 ve % 56.63, ADL ; % 14.22, % 16.83, % 13.88, % 14.94 ve % 15.89

bulunmuştur. Yirmidört saatlik gaz üretimi bakımından değerlendirildiklerinde gaz üretimleri sırayla 43.67, 30.33, 49.33, 35.67, ve 54.33 mL bulunmuştur. *In-vitro* gaz üretim tekniğinden elde edilen verilerle aynı sırayla yemlerin ME (8.51, 6.63, 9.41, 7.56 ve 10.31 MJ/kg KM) ve OMS değerleri (% 60.73, % 48.32, % 66.08, % 50.20 ve % 72.10) hesaplanmıştır. Çalışma sonunda araştırılan parametreler bakımından yer elması kabuğunun diğer tarımsal atıklardan daha değerli olduğu ve bu 5 yöresel tarımsal atığın ruminant beslenmesinde alternatif yem kaynağı olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Akinfemi ve ark., 2009).

Aghajanzadeh-Golshani ve ark. (2010) ruminant yemi olarak domates posası ve bira üretiminde kullanılan arpanın besin değerlerinin karşılaştırılmasında *in-vitro* gaz üretim tekniğini kullanmışlardır. Yapılan kimyasal kompozisyon analizlerinde domates posası ve bira üretiminde kullanılan arpanın sırasıyla KM (% 92.00, % 92.50), HP (% 22.17, % 19.80), NDF (% 49.20, % 55.10) ve ADF (% 32.60, % 25.20) olarak bulunmuştur. 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48 saatlerde gaz üretimleri belirlenmiştir. Domates posası ve bira üretiminde kullanılan arpanın sırasıyla 24 saatlik gaz üretim değerlerinden (38.49 mL, 31.14 mL) ME (11.77, 9.05MJ/kg KM) ve OMS (% 62.41, % 52.72) hesaplanmıştır. Yirmidört saatlik inkübasyon sonunda yapılan değerlendirmede ruminant beslenmesinde domates posasının besin değerinin bira üretiminde kullanılan arpanın besin değerinden daha iyi düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada *Phlebia floridensis*'in buğday samanı ile fermentasyonu süresince *in-vitro* sindirilebilirlikteki artış ve lignoselüloolitik enzim üretimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma sonunda *Phlebia floridensis*'in lignoselüloolitik enzim üretiminde etkin olduğu ve buğday samanının lignin içeriğini % 27.6' dan % 14.6' ya % 50 oranında azaltarak buğday samanının *in-vitro* sindirilebilirliğini artırdığı bildirilmiştir (Sharma ve Arora., 2010).

Kuru domates posasının *in-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak ruminant beslemede kullanılabilirliğinin gösterilmesi için besin değerinin tespit edilmesi araştırılmıştır. Kuru domates posasının'nın 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik gaz üretimleri ölçülmüştür. Besin madde analizi yapıldığında HP % 26.4, NDF ve ADF % 50.6 olarak bulunmuştur. Yirmidört saatlik gaz hacmi 39.38 mL, çözünebilir fraksiyon (a), -1.05; çözülemeyen fakat fermente olan kısım (b), 52.96 mL; potansiyel gaz üretimi

(a+b), 51.90 mL; gaz üretim hız sabiti (c), 0.081 olarak bulunmuştur. Organik madde sindirilebilirliği % 62, Metabolik enerji değeri 9.06 MJ/kg KM, NE_L ise 4.51 MJ/kg KM olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda sanayi yan ürünü olan kuru domates posasının ruminant beslemede değerli bir yem kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Mirzaei-Aghsaghali ve ark., 2011).

Onbir farklı mantar türünün buğday samanında rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada; buğday samanına 11 farklı mantarın ilavesi sonrasında kimyasal kompozisyonları değerlendirilmiş ve HP'nin % 19.1-37.9, NDF'nin % 68.9-80.1, ADF'nin % 46.0-55.6 ve ADL'nin % 37.0-94.0 arasında değiştiği bulunmuştur. Buğday samanının özellikle *Ceriporiopsis subvermispora* mantar türü ile 49 günlük inkübasyonu sonrasında organik madde sindirilebilirliğinin 200 mL/g' dan 309 mL/g'a yükseldiği gösterilmiştir. Sonuç olarak hayvan yemi olarak kullanılacak olan buğday samanının besin değerinin artırılmasında özellikle ligninin parçalanması üzerine olumlu etkileri bulunan bazı mantar türleri ile inkübe edilerek kullanımının uygun olacağı bildirilmiştir (Tuyen ve ark., 2012).

Farklı bir çalışmada *in-vitro* gaz üretim metodu ile esansiyel yağların korunga bitkisinin (% 15 HP, % 3 HY, % 5.7 HK, % 50 NDF, % 34.8 ADF ve % 7.9 ADL) organik madde sindirilebilirliği, rumen fermentasyonu ve metan gazı üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Esansiyel yağ olarak korunga otuna ilave edilen kekik, nane, tarçın, portakal, karanfil yağlarının korunga kuru otunun OMS'ne etkisi değerlendirildiğinde kontrol grubunda % 69.7 olan OMS'nin esansiyel yağ ilavesi ile % 46.3 ile % 58.9 arasında değiştiği, metabolik enerji değerlerinin ise kontrol grubunda 10.8 MJ/kg KM iken esansiyel yağ ilavesi ile 7.0-9.1 MJ/kg KM arasında değiştiği bildirilmiştir. *In-vitro* gaz üretimi üzerine etkileri değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda karbondioksit üretim miktarı (59.6 mmol/L) esansiyel yağ çeşidine bağlı olarak 30.3 ile 42.0 mmol/L arasında değişirken, metan gazı üretimi ise kontrol grubunda 28.7 mmol/L iken esansiyel yağ çeşidine bağlı olarak 17.1 ile 21,1 mmol/L arasında değiştiği bildirilmiştir. Sonuç olarak esansiyel yağların GÜ, OMS ve ME değerleri üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında esansiyel yağların, ruminantlarda NH₃ şeklinde azot kaybını önleyerek yemlerdeki azot ve enerjiden maksimum yararlanabilirliği sağlayarak verim düşüklüğünün engellenmesini

ve atmosfere CH₄ ve NH₃ gazı salınımını azaltarak çevre kirliliğini önleyeceği bildirilmiştir (Canbolat, 2012a).

Üç farklı dönemde hasat edilen tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis L*) otunun potansiyel besleme değerinin araştırıldığı çalışmada *in-vitro* gaz üretim tekniğinden yararlanılmıştır. Gaz üretimi 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlarla belirlenmiş ve $y=a+b(1-\exp^{-ct})$ formülü ile hesaplanmıştır. Tarla sarmaşığı bitkisi olgunlaştıkça KM (% 21.34-30.40), NDF (% 34.0-54.04), ADF (% 28.76-40.34) ve ADL (% 5.26-12.18) içeriklerinde artış, HP (% 23.83-16.63), HY (% 4.92-2.41) ve HK (% 7.97-3.47) içeriklerinde ise azalma tespit edilmiştir. Potansiyel gaz üretiminin bitki olgunlaştıkça düştüğü (71.77-61.59 mL) gözlenmiştir. ME değeri (11.71-9.31 MJ/kg KM) ve OMS'i (% 79.17-63.19) de benzer şekilde bitki olgunlaştıkça azaldığı bildirilmiştir (Canbolat, 2012b).

Türkiye'deki bazı egzotik ağaç yapraklarının [Top akasya (*Robinia pseudoacacia umbraculifera*), gülibrişim (*Albizia julibrissin*), gladiçya (*Gladitsia triacanthos*, yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*)] potansiyel besleme değeri *in-vitro* gaz üretim tekniği ile belirlenmiştir. 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlara bırakılan bitkilerin gaz üretimi, $y=a+b(1-\exp^{-ct})$ formülü ile hesaplanmıştır. Bitkilerin KM (% 42.94-40.29), NDF (% 30.42-41.55), ADF (% 27.81-31.28), HP (% 14.16-21.92), HK (% 10.53-13.0), potansiyel gaz üretimi (71.77-61.59 mL), ME değeri (9.49-10.36 MJ/kg KM) ve OMS'i (% 79.17-63.19) tespit edilmiştir (Canbolat, 2012c).

Yapılan bir başka çalışmada ise, mısır, sorgum, buğday, arpa, yulaf, çavdar ve tritikale gibi bazı buğdaygil hasılları kimyasal kompozisyonları, *in-vitro* gaz üretimleri, ME, OMS bakımından karşılaştırılmıştır. Bitkilerin kimyasal kompozisyonları karşılaştırıldığında oldukça önemli varyasyonlar tespit edilmiştir. HP % 7.2-8.8; HK % 5.4-6.9; HY % 2.6-3.1; NDF % 46.6-55.9; ADF % 24.9-32.6 ve ADL için % 6.3-8.1 arasında bulunmuştur. Gaz üretimi ise 66.6-76.8 mL/200 mg KM, gaz üretiminden hesaplanan OMS % 63.9-75.5 ve ME düzeyi ise 1-10.9 MJ/kg KM olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda yem bitkileri karşılaştırılmış; buğday, yulaf ve mısırın ME, OMS ve GÜ bakımından çalışmada kullanılan diğer buğdaygil hasıllarından daha yüksek değerlere sahip olduğu bildirilmiştir (Canbolat ve ark., 2012d).

Dut yapraklarının besleme değerinin araştırıldığı çalışmada *in-vitro* gaz üretim metodundan yararlanılmıştır. Dört farklı dut türü kullanılan çalışmada dut yaprakları 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonları sonrasında gaz üretimleri tespit edilmiş ve $y=a+b(1-\exp^{-ct})$ formülü ile hesaplanmıştır. Dut yapraklarının KM % 25.97-46.27, NDF % 19.38-33.33, ADF % 17.33-26.06, HP % 11.75-23.72 ve HK % 15.40-22.36 olarak bulunmuştur. *In-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak ölçülen gaz değerleri ise 67.22-70.16 mL olup bu gaz değerleri kullanılarak hesaplanan ME'nin 9.41-10.74 MJ/kg KM ve OMS'nin % 64.38-73.70 arasında değiştiiği bildirilmiştir (Güven, 2012).

Farklı seviyelerde (% 0, % 0.5, % 1.0, % 1.5, % 2.0 ve % 2.5) okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*)'un mısır silajı, yonca kuru otu, çayır kuru otu ve buğday samanına ilavesinin metan gazı üretimi üzerine etkisi *in-vitro* gaz üretim metodu kullanılarak araştırılmıştır. Mısır silajı, yonca kuru otu, çayır kuru otu, buğday samanı ve okaliptus yaprağı kimyasal kompozisyonları bakımından incelenmiş ve sırasıyla KM (% 33.19, % 94.46, % 96.53, % 95.06 ve % 94.87), HP (% 6.52, % 18.56, % 6.69, % 4.84 ve % 12.65) ve ADF (% 29.59, % 31.92, 40.97, % 51.01 ve % 30.17) içerikleri tespit edilmiştir. *In-vitro* gaz üretim metodu ile 24 saatte oluşan toplam gaz miktarı ölçülmüş, tüm yem maddeleri için en düşük metan gazı (29.97 mL/g KM) % 2.5 düzeyinde okaliptus yaprağı ilave edilen uygulamada gözlenmiştir. Genel olarak araştırmada kullanılan tüm yem maddelerinde okaliptus yaprağı ilavesinin karbondioksit gazı düzeyinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Buğday samanı hariç tüm yem maddeleri için % 2.0 düzeyinde okaliptus yaprağı ilavesi 24 saat *in-vitro* rumen sıvısı amonyak azotu değerini azaltmıştır (Akçil ve Denek, 2013).

Bir diğer çalışmada farklı vejetasyon dönemlerinde hasat edilen kolza otlarının (*Brassica napus L.*) kimyasal bileşimleri, *in-vitro* gaz üretimi, ME, OMS ve nispi yem değerleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Gaz ölçümleri 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat aralıklarla yapılmış ve gaz değerleri $y=a+b(1-e^{-ct})$ eşitliği kullanılarak belirlenmiştir. Kolza otunun vejetasyon dönemi ilerledikçe kimyasal bileşimleri, *in-vitro* gaz üretimi, ME, OMS ve nispi yem değeri bakımından önemli değişiklikler gözlenmiştir. Gelişme dönemine bağlı olarak kolza otlarının NDF (% 36.08-77.16), ADF (% 23.48-56.75) ve ADL (% 3.74-15.63) içerikleri artarken, HP (% 21.12-6.93), ME (12.02-7.44MJ/kg KM), OMS (% 81.68-50.40), KMS (% 70.61-44.69) ve nispi

yem (181.61-54.04) değerleri ise azalmıştır. Gaz ölçümleri 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde yapılmış ve gaz üretimleri sırayla 18.51-6.34 mL, 32.61-13.42 mL, 43.71-23.35 mL, 57.51-33.52 mL, 67.33-44.62 mL, 74.12-47.41 mL ve 76.43-50.50 mL değerlerinde bulunmuş, ME ve OMS bu gaz üretim miktarları kullanılarak hesaplanmıştır (Canbolat, 2013).

Yonca, adi fiğ, bezelye, gazal boynuzu ve kolza baklagil kuru otlarının kimyasal kompozisyonları, *in-vitro* gaz üretimleri, ME, SOM, mikrobiyal protein üretimleri karşılaştırılmıştır. Kimyasal kompozisyonları bakımından önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Yemlerin kimyasal bileşenlerinden HP % 16.82-20.79, HY % 3.46-5.16, HK % 5.74-8.37, NDF % 36.05-46.00, ADF % 26.60-37.79 ve ADL % 7.41-13.23 aralığında bulunmuştur. Toplam gaz üretiminin 68.37-75.40 mL/200 mg KM, SOM % 71.77-78.29, ME 10.68-11.22 MJ/kg KM ve mikrobiyal protein üretiminin ise 110.89-124.31 g/kg KM arasında bulunduğu bildirilmiştir (Canbolat ve ark., 2013).

In-vitro gaz üretim metodu kullanılarak farklı kaynaklardan farklı konsantrasyona sahip kondanse (akasya ve quebracho) ve hidroliz olabilen (kestane ve valonea) tanenlerin rumen fermentasyonu ve metan üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada artan tanen konsantrasyonunun *in-vitro* gaz üretimini 56.8 mL den 45.8 mL'ye, UYA miktarını ise 131.1 mmol/L den 111.1 mmol/L'ye düşürdüğü bildirilmiştir (Hassanat ve Benchaar, 2013).

Diğer bir çalışmada hindistan cevizi yağı ve balık yağının, rumen fermentasyonu üzerine etkileri *in-vitro* gaz üretim metodunu kullanarak araştırılmıştır. Çalışma sonunda hindistan cevizi yağı ve balık yağının kuru madde parçalanabilirliği % 80 olan kontrol grubuna oranla sırasıyla % 72.6, % 72.8 azaldığı ve yine NDF parçalanabilirliğinin % 54.1 olan kontrol grubuna göre hindistan cevizi yağı ilavesi ile % 49.1'e, balık yağı ilavesi ile % 46.12'ye düştüğü, toplam UYA konsantrasyonunda ise bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (Patra ve Yu, 2013).

Bu çalışmada farklı oranlarda (80:20, 50:50, 20:80) kaba ve konsantre yem içeren rasyonlarda farklı miktarlarda (0, 333, 667, 1000 mg/L) kitosan katkısının rumen fermentasyonu üzerine etkisi *in-vitro* gaz üretim metodu ile araştırılmıştır. Yirmidört saatlik inkübasyondan sonra kitosan katkısının *in-vitro* kuru madde kaybını, toplam gaz

üretimi, metan üretimi ve asetat: propionat oranını önemli derecede azaltırken pH' yı önemli ölçüde artırdığı (6.15-6.21) gözlenmiştir. Rasyon oranı 80:20, 50:50 olan denemelerde kitosanın propiyonat oranını dikkate değer oranda arttırdığı (15.23-16.29 mmol/100 mmol), 20:80 oranındaki besleme denemesinde ise amonyak azot konsantrasyonunu (21.45-23.17 mg/100mL) ve bütirat oranını (16.58-17.65 mmol/100 mmol) artırdığı bunun yanında asetat oranını azalttığı (60.71-59.48 mmol/100 mmol) bildirilmiştir. Çalışma sonunda *in-vitro* gaz üretim metodu kullanılarak kitosanın rumende metan üretimini azalttığı ve ruminal fermentasyonu etkilediği bildirilmiştir (Yun Li ve ark., 2013).

Farklı bir çalışmada değişik varyetelerden elde edilen antep fıstığının dış kabuğunun besleme değerinin araştırılmasında ham besin maddeleri analizi ve *in-vitro* gaz üretim metodundan yararlanılmıştır. Antep fıstığı kabuğunun kimyasal kompozisyonu incelendiğinde KM % 26.45-29.25, HP %7.27-14.99, HK % 8.50-19.86, ADF % 14.32-18.29 ve NDF % 18.25-22.49 arasında bulunmuştur. *İn-vitro* gaz üretim değerleri (65.92-73.46 mL) kullanılarak hesaplanan OMS (% 69.0-74.50) ve ME (9.76-11.05 MJ/kg KM) değerleri arasında önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak antep fıstığı kabuğunun orta derecede HP ihtiva etmesi ve sindirilebilirliğinin yüksek olması sebebiyle ruminantlarda yem kaynağı olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Boğa ve ark., 2013).

Keçilerle yapılan bir çalışmada bitkilerin yapılarında bulunan bazı bileşiklerin rumen fermentasyonu, rumen mikroorganizmaları ve metan üretimi üzerine etkileri *in-vivo* ve *in-vitro* metotlarla araştırılmıştır. Denemelerde karvakrol (CAR), cinnamaldehyde (CIN), eugol (EUG), propyl propane thiosulfinate (PTS), propyl propane thiosulfonate (PTSO), diallyl disulfide (DDS), (40: 60) oranında PTS ve PTSO (PTS+PTSO) ve bromochloromethane (BCM) kullanılmıştır. Farklı bileşiklerin dört farklı dozu 24 saatlik *in-vitro* inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonunda EUG ve (PTS+PTSO) hariç diğer bütün bileşiklerde gaz üretiminde lineer bir artış gözlenmiştir. Toplam UYA bakımından değerlendirildiğinde PTS (59.4-49.3 mM), PTSO (59.9-55.4 mM) ve CAR (63.4-51.8 mM) bileşiklerinin kullanıldığı deneme gruplarında toplam UYA' de azalma olduğu bildirilmiştir. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonunda tüm gruplarda gaz üretim kinetiklerinin etkilendiği ve sadece PTS (111-87 mL)

ve CAR (111-73 mL) kullanıldığı denemelerde lineer bir azalma gözlenmiştir. Bütün deneme gruplarındaki metan üretiminde azalmayla birlikte en büyük düşüş PTS (353-203 µmol), DDS (353-133 µmol) ve BCM (353-15 µmol) bileşiklerinin dahil olduğu gruplarda gözlenmiştir. *İn-vivo* denemelerde ise PTS ve BMC ilavesinin sırasıyla metan üretimindeki azalma oranının (% 33, % 64) *in-vitro* denemelerdeki orandan (% 87, % 96) daha düşük bulunduğu bildirilmiştir (Martinez-Fernandez ve ark., 2013).

Bir diğer çalışmada farklı protein kaynağı olarak maya ile fermente edilmiş kasava çentik proteini ve soya küspesi (SK) kullanımının yanında kaba konsantre yem oranının rumen mikroorganizmaları üzerine etkisi beş farklı oranda (80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100) hazırlanan kaba/konsantre yem materyali ile *in-vitro* gaz üretim metodu kullanılarak araştırılmıştır. Protein kaynağı olarak maya ile fermente edilmiş kasava çentik protein (% 89.2 KM, % 95.6 OM, % 46.7 HP, % 6.7 NDF ve % 4.2 ADF) ve soya küspesi (SK), kaba yem kaynağı olarak pirinç samanı (% 90.2 KM, % 81.30 OM, % 2.9 HP, % 82.7 NDF ve % 57.6 ADF) kullanılmıştır. *İn-vitro* gaz üretim metodu ile tespit edilen gaz üretimi (b) değerlendirildiğinde kasava çentik proteininin çözünmeyen fraksiyonundan elde edilen gaz üretimi (75.9 mL) SK (56.0 mL) ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte y eksenindeki eğrinin kesişim değeri (a) çözünmeyen fraksiyondan elde edilen gaz üretimi (b), çözünmeyen fraksiyon için gaz üretim oran sabitleri (c), gaz üretiminin potansiyel değeri (a+b) ve 96 saatlik kümülatif gaz üretiminin kaba/konsantre oranlarından etkilendiği bildirilmiştir. OMS en yüksek değeri 40:60 (% 86.0) ve 60:40 (% 81.80) oranına sahip deneme gruplarında gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında, kasava çentik proteininin ruminantlarda protein kaynağı olarak kullanımının rumen fermentasyon etkinliğini geliştirdiği sonucuna varılmıştır (Polyorach ve ark., 2014).

2.7. Ruminantlarda Kaba Yem Sindiriminde Mikroorganizmaların Rolü

Ruminantlar tek midelilerden farklı bir mide yapısına sahiptirler. Tek mideliler enzimatik sindirimin gerçekleştiği basit bir mide yapısına sahipken, ruminantlar rumen, retikulum, omasum ve abomasumdan oluşan dört bölmeli mide yapısına sahiptirler. Bu ilk üç midede mikrobiyal aktivite gözlenirken abomasumda ise tek midelilerde olduğu gibi enzimatik aktivite gözlenmektedir. Ruminantlar tek midelilerin sindiremediği

selülozca zengin yem maddelerinin sindirimini retikulumdaki mikrobiyal popülasyonla gerçekleştirmektedir.

Rumenin mikrobiyal ekosistemi; bakteri (10^{10} - 10^{11} hücre/mL), arkea (10^7 - 10^9 hücre/mL), protozoa (10^4 - 10^6 hücre/mL), mantarlar (10^3 - 10^5 zoospor /mL) ve bakteriofajlardan (10^8 - 10^9 /mL) oluşmaktadır (Kamra, 2005; Klieve ve ark., 2005). Bu mikroorganizmalar sayesinde sindirimi zor lignoselülotik yapıların sindirimi gerçekleşmektedir. Rumendeki mikroorganizmaların sayısı, rasyonun yapısı, hayvanın türü, yemin şekli, rumen pH'sı, UYA gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Margarida ve ark., 2007).

Kaba yemlerin önemli bileşeni olan selülozun rumende sindirimi selülotik rumen bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Anaerobik bakterilerin polisakkaritlere tutunması ile selülozun sindirimi başlamaktadır. Anaerobik bakterilerin çoğunda selülaz ve hemiselulazdan oluşan bir enzim kompleksi olan selülozom olarak adlandırılan yapılar mevcuttur (Chesson ve Forsberg., 1997). Selülozomların genellikle gram pozitif selülotik bakterilerde bulunduğu gösterilmiştir (Rincon ve ark., 2003).

Selülotik bakteriler selülozu sahip oldukları ekzo-1,4- β glukanaaz, endo-1,4 β glukanaaz, sellodekstrinaz 1,4 β glukozidaz enzimleriyle sellobiyoz ve glikoza kadar parçalarlar. Selülotik bakteriler kaba yem ağırlıklı rasyonlarla beslenen hayvanların rumeninde yoğun olarak bulunmaktadır. Selülozun sindiriminde rumendeki 3 predominant selülotik bakterileri olan *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens* aktif rol almaktadır. Rumen ortamı gerek bu mikroorganizmaların birbirleri ile gerekse ruminantla olan dinamik ilişkilerin kombinasyonundan etkilenmektedir (Krause ve Russel, 1996). Rumendeki bu ekosistem; rasyon, yem katkı maddeleri, hayvanın ırkı, yaşı, sağlığı, kondüsyonu, mevsim ya da coğrafik koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Stewart ve ark., 1997; Graeme ve ark., 1998; Wright ve ark., 2007; Szumacher-Strabel ve ark., 2009; Alataş ve Umucalılar., 2011).

Son zamanlarda hayvan beslemeciler gerek rumende meydana gelen sera etkisi olarak isimlendirilen metan ve benzeri gazların üretiminin modifiye edilmesi gerekse yemlerin sindirilebilirliğinin arttırılmasının sağlanmasında rumen

mikroorganizmalarının etkisini araştırmaya yoğunlaşmışlardır (Szuamacher- Strabel ve Cieslak, 2010; Lin ve ark., 2012).

2.8. Yem Değerlendirmede Moleküler Genetik Metotlar

Rasyonun tipi ve kompozisyonunun rumen mikrobiyal popülasyonu üzerine olan etkileri *in-vitro* ve *in-vivo* metotlarla araştırılmaktadır. Rumen mikroorganizmasının ihtiyaç duyduğu anaerob ortam sağlanıp bir kısım mikroorganizma kùltüre edilmektedir. Ancak geleneksel mikrobiyolojik metotlar kullanılarak rumendeki mikroorganizmaların sadece % 10 kadarı tanımlanabilmiştir. Bu yüzden geleneksel mikrobiyolojik metotlarla ileri moleküler genetik metotların kombinasyonu ile rumen fermentasyonun daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir. Kùltürü yapılamayan mikroorganizmaların çalışılabilmesine, rumenden alınan örneklerin doğrudan analizlenebilmesine ve çoklu kùltürlü *in-vitro* kùltürlerin çalışılabilmesine olanak sağlaması moleküler çalışmaların avantajları arasında yer almaktadır (Tajima ve ark., 2001; Mitsumori ve Sun., 2008; Sekhavati ve ark., 2009; Ranilla ve ark., 2009; Guo ve ark., 2010; Bekele ve ark., 2010; Boguhn ve ark., 2010; Lettat ve ark., 2012).

Moleküler alışmalar prokaryotlarda 16S rDNA dizisini (Deng ve ark., 2008), ökaryotlarda ise 18S rDNA dizisini (Shin ve ark., 2004) esas alınarak gerçekleştirilmektedir. Floresan *in-situ* hibridizasyona (FISH) dayalı olarak yapılan çalışmalar ve rumen örneklerinden DNA/RNA ekstraksiyonu haricinde bundan sonraki basamaklarda moleküler analizler kullanılır. Elde edilen nükleik asit materyali polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilir. PCR ile çoğaltılan nükleik asit dizisi yani amplikonlar daha sonra yapılabilecek olan; Denaturing Jel Elektroferez (DGGE), Terminal Gradient Jel Elektroferez (TGGE) (Mao ve ark., 2008), ribosomal intergenic spacer analiz (Fisher ve Triplett, 1999), Terminal restriksiyon analiz (T-RFLP) (Liu ve ark., 1997), dizileme, klonlama ve microarray analizlerinde kullanılabilir (Tajima ve ark., 2001; Bekele ve ark., 2010; Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

2.8.1. Moleküler Analizlerde Rumen Örneklerinin Toplanması

Moleküler analizlere başlamadan önce, araştırmacıların karşılaştığı ilk problem hayvanların yeme zamanı ile örnekleme yapılacağı zamanın seçimidir (Denman ve McSweeney, 2006). Bunun yanında örneklerin rumenden toplandığı kısım da önemlidir. Rumende katı fraksiyonda çoğunlukla selülitik bakterilerin bulunması gibi, mikroorganizmaların farklı cins ve türlerinin rumenin farklı bölgelerinde bulunmaları söz konusu olabilir (Koike ve Kobayashi, 2009). Bu yüzden çoğu bakteri gerek karışık örneklerde gerekse rumenin sıvı fraksiyonunda (Tajima ve ark., 2001) analiz edilirken, protozoonların analizi rumen içeriğinin sıvı fraksiyonunda yapılmaktadır. Bu gibi faktörlerden dolayı analize uygun şekilde rumen örnekleri toplanmadan önce mikroorganizmaların alındığı ekolojik konumlarının bilinmesi gerekmektedir. Bu tarz bilgiler, örneklerin nereden, ne zaman ve nasıl toplanacağına karar vermek açısından araştırmacıya yol gösterici niteliktedir (Makkar ve McSweeney, 2005; Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

Rumen sıvısı örnekleri yüksek DNase ve RNase aktivitesine sahip olduğundan doğrudan DNA izolasyonu yapılmalı ya da dondurularak saklanmalıdır veya rumen örnekleri soğutmalı santrifüjde + 4°C maksimum hızda (en az 1000 rpm'de) 10 dakika santrifüj edildikten sonra dibe çöken bakteriyal çökelti dondurulup daha sonra kullanılabilir. Dondurma işlemi DNA/RNA'nın bozulmadan korunabilmesi için son derece önemlidir.

2.8.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu doğrudan ya da dolaylı metot ile gerçekleştirilebilir. Doğrudan metotta DNA rumenden doğrudan toplanan örneklerden ekstrakte edilir. Bu metot genomik DNA elde edilmesinde hızlı ve etkilidir. Bununla beraber ekstrakte edilmiş DNA örneklerinde inhibitörlerinde bulunabileceği göz önüne alınmalıdır. İnhibitörler klonlama ve amplifikasyon reaksiyonu süresince enzimlerin işlevlerini baskılayabilirler. Bu nedenle doğrudan metotla DNA izolasyonu yapılacaksa ilave bir adımla inhibitörlerin uzaklaştırılması gerekir. Bu adım ticari firmaların ürettiği DNA saflandırma kitleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. İndirekt metotta ise; rumen örneklerinden klasik mikrobiyal metotlar kullanılarak daha önceden izole edilmiş saf

kültürlerden DNA izolasyonu gerçekleştirilir. Bu metot zahmetli, çok zaman alan bir metot olması yanında rumen sıvısından doğrudan çalışılmayıp saf kültürlerle çalışıldığı için genetik çeşitliliği de baskılar. Elde edilen örneklerdeki düşük genetik çeşitlilik, birçok rumen mikroorganizmasının kültürünün yapılabilmesi için optimize edilmiş bir kültür sisteminin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bunun yanında DNA ekstraksiyonu boyunca saflandırma adımlarına ihtiyaç duymamaktadır. Sonuç olarak bu iki metottan doğrudan metotla DNA ekstraksiyonu dolaylı metotla DNA ekstraksiyonuna göre daha yaygın olarak tercih edilmektedir (Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

DNA ekstraksiyonu için hücrelerin lizise uğratılması gerekir. Rumen sıvısında mikroorganizmaların çeşitliliğinin ve yoğunluğunun fazla olması lizis olayını güçleştirir. Bu sebeple farklı DNA ekstraksiyon protokolleri geliştirilmiştir (Tajima ve ark., 2001; Yu ve Morrison, 2004; Chaudhary ve ark., 2011). Bu protokollerin temelinde enzim-kimyasal ya da mekanik-kimyasal metotlar esas alınmaktadır. Enzim-kimyasal etkileşimine dayalı metotta hücre lizisinde genellikle lizozim kullanılmakla birlikte zaman zaman Proteinaz K da kullanılmaktadır. Mekanik-kimyasal metotta ise hücreler, deterjan varlığında aşındırıcı küçük boncuk vb yapılarla lizise uğratılır. Bununla beraber Yu ve Morrison (2004) tarafından Proteinaz K, aşındırıcı boncuk ve deterjanın birlikte kullanıldığı aşındırıcı boncuk ve ilaveten kolon (RBB+C) metodunun daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu metot kullanılarak yapılan DNA izolasyonun etkinliği ticari kitlerle mL başına elde edilen ng DNA miktarından 5-6 kat daha fazla olabilmektedir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA örnekleri porsiyonlanarak -20⁰C de dondurularak saklanmalıdır (Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

2.8.3. Rumen Mikroorganizmalarının Moleküler Metotlarla Tespiti

Rumende bakterilerin varlığı ve miktarının belirlenmesi amacıyla son yıllarda DNA amplifikasyonunu esas alan moleküler metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metotlar, her örnekteki mikrobiyal komünitenin genetik yoğunluğunu belirleyerek o örnekteki DNA profilinin tespitini sağlar. Bunun yanında mikrobiyal komünitenin çevresel varyasyonlara cevabını değerlendirmede ve rumen mikroorganizmalarının kültüre alınmadan incelenmesine de olanak sağlar. Rumen mikroorganizmalarının miktarının tespit edilmesinde PCR metodunu esas alan RFLP, DGGE, TGGE metotlarından yararlanılır. Rumen mikroorganizmaları ile yapılan çalışmalarda yukarıda

sayılan moleküler metotlardan; PCR-DGGE ve kantitatif real-time PCR metodları yaygın olarak kullanılmaktadır (Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

PCR-DGGE tekniği, rumen mikroorganizmalarının genetik çeşitliliği yanında mikrobiyal biyo çeşitliliğin miktarının tespitinde de kullanılmaktadır (McCracken ve ark., 2001). Ayrıca rumende kültürü yapılamayan mikroorganizmaların tespitini sağlayan bir metottur (Simpson ve ark., 2000). Ancak bu metot toplam bakteriyal popülasyonun % 1'inden daha az olan mikroorganizmaların belirlenmesi için uygun bir metod değildir (Zoetendal ve ark., 2004). Bu metot toplam bakteri popülasyonunun % 90-99'unu gösteren profillerin kullanılması için uygun bir metottur (Zoetendal ve ark., 1998).

Kantitatif real-time PCR tekniği, örnekteki mikroorganizmaların çeşitliliğinin kantitatif olarak tespit edilmesinde kullanılan bir metottur. Reaksiyonun her döngüsünün sonunda meydana gelen amplikonların tespitine dayalı geleneksel PCR'ın aksine, kantitatif real-time PCR da ekspanansiyel gelişim fazı boyunca meydana gelen ürünlerin miktar tespiti yapılabilir. Bu safhada çoğaltılan DNA dizileri teorik olarak eşleşir ve amplikonlar florasan ışıkta görünür hale gelirler (MacKay, 2007). En ucuz ve en yaygın kullanılan boya SYBR Green'dir (Zhang ve Fang, 2006; MacKay, 2007). Çift iplikli DNA'ya bağlanır böylece çift iplikli DNA'nın sayısındaki artışa bağlı olarak florasan seviyesinde artış meydana gelir. SYBR Green spesiflik aramadan tüm çift iplikli DNA ya bağlanır. Daha spesifik olunması istenilen durumlarda 5' nükleaz (Taqman) kullanılır. Burada florasan boya kendi etkinliğini bastıran bir boya ile birlikte bulunur. Prob kullanılacak olan çalışmalarda bu metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Prob, primerler tarafından amplifiye edilen spesifik diziyi hedef alır ve bir ucunda başlatıcı (reporter) diğer ucunda ise söndürücü (quencher) bulunur. Şayet prop bu iki kısmı bozulmadan birlikte taşıyorsa florasan ışık gözlenmez. Probe, denature olmuş DNA'nın primerlerin bağlanma bölgeleri olan ileri ve geri (forward ve revers) arasında lokalize olmuş spesifik DNA dizisine bağlanır. Taq polimeraz, kalıplar boyunca hareket ederken probe polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile parçalanır. Böylece quencher-reporter kısmından ayrılır ve ürün miktarı çoğaldıkça floresan ışığın şiddeti artar. Sonuç olarak bu metotta spesifik dizi sinyalleri kullanıldığından, primer dimerler ve spesifik olmayan ürünlerin varlığında bile sonuçların etkilenmediği görülür. SYBR Green, DNA çift

sarmalına fark gözetmeden bağlandığından PCR amplifikasyonunun sonunda amplikonların spesifikliğinin doğrulanması gerekmektedir. Bu, ayrılma eğrisinin görüntülenmesi ile sağlanır. Bu eğri sıcaklığın 60 °C'den 90 °C'ye yavaş yükselişi süresince floresan sinyalin kaybını gösterir. Sıcaklıktaki bu artışla beraber çift sarmal DNA'nın ayrılması SYBR Green'nin serbest kalmasına sebep olur. Spesifik sinyal (tek, keskin pik) diziyeye spesifik erime sıcaklığında ortaya çıkmaktadır. Spesifik olmayan ürünler ve primer dimerleri ayrı kısımlar halinde görülürler (Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

Real time PCR da sonuçların değerlendirilmesi, eşik değer Cycle threshold (C_T) esas alınarak gerçekleştirilir. C_T , gerçek zamanlı PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) verilen addır. Teorik olarak amplifikasyonun eksponansiyel fazında hedef örneğin başlangıç miktarı ve amplifikasyon miktarı kantitatif olarak ilişkilidir (Pers-Kamczyc ve ark., 2011).

2.8.4. Real Time PCR Metodu ile Yapılan Çalışmalar

Real time PCR rumen mikrobiyoloji çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Tajima ve ark. (2001) tarafından 12 farklı bakteri türü için spesifik primerler dizayn edilmiştir. Kalıp DNA dizisi ile benzer ürünlerin üretilmesi açısından primer dizaynı önemlidir. Real-time PCR tekniği bakterilerin yanı sıra mantar ve siliatlarında kantitatif analizi için uygundur. PCR tekniği kullanılarak rumende mantarların miktar tespiti ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır (Denman ve McSweeney, 2006; Sekhavati ve ark., 2009). Lwin ve ark. (2011) real-time PCR ile yaptıkları çalışmada besleme sonrası koyunların rumenindeki mantar popülasyonunda kuru ağırlık bakımından artış olduğunu (7.9 mg-14.4 mg) bildirmişlerdir.

Sung ve ark. (2007), rumen başlangıç pH'sının, yoğun selüloz içeriğine sahip rasyonların sindirilebilirliği ve özellikle 3 predominant selülitik bakteri olan *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*'in miktarı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla *in-vitro* çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Pirinç samanına 3 predominant selülitik bakteri eklenmiş ve ruminal pH ları; 5.7, 6.2 ve 6.7'ye ayarlanmış rumen sıvısında inkübe edilerek miktarları real-time PCR ile tespit edilmiştir. *F. succinogenes* (8.5, 10.5 ve 11.0 log₁₀ kopya sayısı/g KM/saat), *R. albus* (6.5, 8.0 ve 8.5 log₁₀ kopya

sayısı/g KM/saat), *R. flavefaciens*'in (7.5, 10.0 ve 9.5 log₁₀ kopya sayısı/g KM/saat) pirinç samanına yapışma oranı düşük başlangıç pH'sında (5.7), orta (6.2) ve yüksek (6.7) başlangıç pH sına göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Kırksekiz saatlik inkübasyon sonrası gaz üretimi değerlendirilmiş, orta (10 mL) ve yüksek (15 mL) pH daki gaz üretimi düşük pH (5.7) daki gaz üretiminden (5 mL) 2-3 kat daha yüksek bulunmuştur. Pirinç samanının kuru madde sindirilebilirliğinin pH artışıyla 2.8-4.4 kat arttığı gözlenmiştir. Çalışma sonunda rumen sıvısının başlangıç pH değerinin yoğun selüloz içerikli rasyonlarla 3 predominant selüloolitik bakteri arasındaki ilişkiyi etkilediği bildirilmiştir.

Goel ve ark. (2007) tarafından doğal tropikal bitkiden elde edilen ve sentetik anti metanojenik (bromklormetan) ajanların, mikrobiyal kominite üzerine etkileri *in-vitro* gaz üretim parametreleri ve real-time PCR'la incelemişlerdir. Her iki protein düzeyi de kontrol ile karşılaştırıldığında metanojenlerin % 73, *R. flavefaciens*'in % 71 ve ruminal mantar popülasyonunun ise % 42 oranında baskılandığı görülmüştür. Yüksek seviyeli protein kaynağının kullanımının *F. succinogens* popülasyonunda % 21 artışa neden olduğu bildirilmiştir. On µM konsantrasyonda bromklorometan'ın metan üretimini % 94 baskıladığı gözlenmiştir. Çalışma sonunda protein ve bromklormetan'nın rumen fermentasyon etkinliğini artırdığı ve metan üretimini baskıladığı bildirilmiştir.

Lopez ve ark. (2010) ise, rumendeki mikrobiyal proteinin tespitinde *in-vitro* fermentasyon ile pürin analizi ve real time PCR kullanmışlardır. Hayvanlar kontrol grubunda % 50 kuru ot % 50 kırık mısır ile beslenmişlerdir. Farklı düzeylerde maya fabrikası atıklarının kullanıldığı deneme gruplarından düşük orana sahip olan grupta % 33 kuru ot % 33 kırık mısır ve %33 maya fabrikası atıkları , diğer deneme grubunda ise % 100 maya fabrikası atıkları kullanılmıştır. Mikrobiyal protein miktarı bakımından değerlendirildiğinde PCR (221 mg/g KM) ve pürin analiz sonuçları (246 mg/g KM) birbirinden farklı bulunmuştur. Yem materyalinin mikrobiyal proteine katkısı değerlendirildiğinde ise deneme gruplarında (düşük maya fabrikası atıkları ile beslenen grupta 243 mg/g KM; % 100 maya fabrikası atıkları ile beslenen grupta ise 239 mg/g KM) kontrol grubuna göre (263 mg/g KM) azalma tespit edilmiştir. Çalışmada 0 ve 48 saat sonunda yapılan değerlendirmede (229 mg/g KM; 239 mg/g KM) mikrobiyal

protein miktarı bakımından bir fark gözlenmemiştir. Ancak PCR da türe özgü kullanılan markırlar yardımıyla daha özgül sonuçlar elde edilmiştir. DNA markırları kullanarak rumen mikroorganizma kaynaklı olmayan materyallerden dolayı oluşabilecek kontaminasyonu önlemenin mümkün olabileceği bildirilmiştir.

Rasyondaki kaba yem konsantre yem oranının (100:0, 75:25, 50:50, 25:75) rumen fermentasyonu, mikrobiyal protein sentezi ve selülitik bakteri popülasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada PCR metodu kullanılmış ve % 100 kaba yemle beslemenin başlıca 3 selülitik bakterinin [(*F. succinogenes* 3.54×10^9 kopya/mL), (*R. flavefaciens* 7.38×10^7 kopya/mL) ve (*R. albus* 5.80×10^6 kopya/mL)] özellikle de *F. succinogenes* popülasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonunda % 50 oranında kullanılan kaba yem/konsantre yem oranının yem sindirilebilirliği, mikrobiyal protein sentezi ve ruminal ekolojii artırdığı bildirilmiştir (Cherdthong ve ark., 2010).

Guo ve ark.(2010) virginiamycin ilavesi ile beslenen sığırlarda rumen sıvısının anaerobik kültür ortamına transferi roll tüp tekniği ile mikrobiyal popülasyonu ise real-time PCR kullanarak araştırmışlar, çalışmada kullanılan hayvanlar % 35 kaba yem % 65 konsantre yemle beslenmişlerdir. Virginiamycin ilavesinin rumen pH' sını 6.63' den 6.70'e artırdığı, amonyak azotunu 6.19' dan 4.94'e, proteolitik bakteri sayısını 8.83 \log_{10} cfu/mL' den 8.60 \log_{10} cfu/mL'ye ve amilolitik bakteri sayısını 8.72 \log_{10} cfu/mL' den 8.41 \log_{10} cfu/mL'ye azalttığı; selülitik bakteri sayısında (9.59- 9.56 \log_{10} cfu/mL) ise önemli bir değişime sebep olmadığı bildirilmiştir. Bununla beraber virginiamycin laktik asit konsantrasyonunu etkilememiştir. Bu çalışma sonucunda virginiamycin ilavesinin rumen bakterileri üzerine seçici etkisinin bulunduğu ve spesifik ruminal bakteri popülasyonunun bir kısmını değiştirerek rumen fermentasyonunu etkilediği gösterilmiştir.

Bir diğer çalışmada düşük kaliteli kaba yemle [*Astrebella spp.* kuru otu (% 90.7 KM, % 2.97 HP ve % 69.2 NDF)] ile beslenen sığırların ruminal bakteri ve protozoa popülasyonundaki değişkenliği DGGE profillerini inceleyerek göstermişlerdir. Çalışma sonucunda ruminal bakteri ve protozoa bakımından hayvanlar arasında önemli varyasyonlar olduğu gözlemlenmiştir. Rumen içeriğinin sıvı fraksiyonunda ki bakteri sayısı % 31.8, katı fraksiyonunda % 51.4, sıvı fraksiyondaki protozoa sayısı ise % 54.9 olarak bulunmuştur. Bu gözlemler ışığında, konak hayvanın en az bir mikrobiyal

komüniteye sahip olabileceği ve bu varyasyonların sindirim sistem karakteristikleri ve beslenme davranışları gibi hayvana ait özelliklerden ileri gelebileceği bildirilmiştir (Martinez ve ark., 2010).

Kongmun ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, rasyona hindistan cevizi yağı ve sarımsak tozu ilavesinin besinlerin sindirilebilirliği, rumen ekolojisi, rumen fermentasyonu, rumen mikroorganizmaları ve metanojen miktarı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kontrol grubuna göre amilolitik ($7.3-14.4 \times 10^6$ cfu/mL) ve proteolitik ($1.1-1.9 \times 10^7$ cfu/mL) bakterilerin sayısında artış, protozoa ($7.9-1.9 \times 10^5$ cfu/mL) sayısında ise azalma bildirilmiştir. Selülitik bakteri yüzdesi deneme gruplarında benzer bulunmuş ancak rasyona supplement ilavesinin *F. succinogenes* popülasyonunu baskıladığı görülmüştür. Metan üretiminin % 7 hindistan cevizi yağı ilavesiyle % 10 oranında azaldığı bildirilmiştir.

Yüksek oranda kaliteli kaba yemle (% 30 konsantre % 70 kaba yem) beslenen koyunlarda ruminal fermentasyon ve mikrobiyal komünite üzerine disodyum fumarat (DF)'in etkileri araştırılan çalışmada, DF ilavesinden sonra rumen mikrobiyotasında önemli değişiklikler olduğu DGGE fingerprint analizi ile ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda *B. fibrisolvans*, *P. ruminicola* ve *Clostridium sp.* gibi proteolitik bakterilerin yanında *R. albus*, *F. succinogenes* gibi selülitik bakterilerin de DF ilavesinden pozitif etkilendiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2012).

Bir diğer çalışmada farklı oranlarda kaba ve konsantre (90:10, 80:20, 70:30) yem içeren rasyonlara lerak (*Sapindus rarak*) meyve ekstraktının ilavesinin *in-vitro* fermentasyon da rumen mikroorganizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada *in-vitro* fermentasyon Tilley-Terry metoduna göre, toplam bakteri, *F. succinogenes*, *P. ruminicola* ve *R. albus* miktarları ise PCR metodu ile tespit edilmiştir. Çalışmada, rasyona lerak ekstraktının ilavesinin 24 saatlik inkübasyon sonunda protozoa sayısını azalttığı ($4.39-3.22 \log_{10}$ kopya sayısı), total bakteri sayısında bir değişiklik meydana getirmediği gözlenmiştir. Rasyonda lerak ekstraktının seviyesinin artmasından *F. succinogenes* etkilenmezken, toplam bakteri yüzdesi içerisinde *R. albus* ($1.99-6.05 \times 10^{-2}$) ve *P. ruminicola* miktarında ($2.32-7.25 \times 10^{-2}$) ise önemli bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Lerak ekstrakt ilavesine bağlı olarak propiyonat oranında da (16.4-18.9 mg/mL) artış olduğu görülmüştür. Bu verilere dayanarak rasyona lerak ekstrakt

ilavesinin rumen mikroorganizmalarını olumlu yönde etkileyerek rumen fermentasyonunu modifiye ettiği rapor edilmiştir (Suharti ve ark., 2011).

Farklı rasyonlarla beslenen bataklık mandasında rumen fermentasyonu ve mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemek üzerine yapılan araştırmada, mikroskopi, roll-tube, PCR ve PCR-DGGE metotlarından yararlanılmıştır. Çalışma sonunda % 4 üre ve üre-mermer tozu muamelesiz/muameleli pirinç samanı (% 54.9-90.5 KM, % 87.4-87.2OM, % 5.6-2.0 HP, % 69.9-77 NDF ve % 52.5-56 ADF) ile beslemenin rumen ekolojisini, rumen selüloolitik mikroorganizmalarının miktarını [*R. albus* ($3.8-31.7 \times 10^9$) *R. flavefaciense* ($0.2-13.9 \times 10^{10}$), *F. succinogenes* ($4.8-12.7 \times 10^{11}$)] ve rumen fermentasyon etkinliğini geliştirdiği bildirilmiştir (Vinh ve ark., 2011).

Lin ve ark. (2012) yaptığı bir çalışmada; *in-vitro* metan üretimi ve rumen fermentasyonu üzerine fumarat ve esansiyel yağların (tarçın, kekik, limon) kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır. Rumen mikroorganizmaların popülasyonu real-time PCR ile, metan ve UYA konsantrasyonları ise gaz kromatografi (GC) kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda esansiyel yağların kullanımının metan üretimini baskıladığı (0.98-0.37 mmol), fumarat ilavesinin ise, UYA konsantrasyonunu (3.15-2.97 mmol), toplam bakteri yüzdesi içerisindeki protozoonların (2.68-0.13), *F. succinogenes*'in ($43.3-11.5 \times 10^{-2}$), *R. flavefaciens*'in ($58.48-22.8 \times 10^{-4}$) ve metanojenlerin ($52.3-27.1 \times 10^{-2}$) miktarlarını baskılayarak metan üretimini (% 0.86-0.17 nmol) azalttığı bildirilmiştir.

Koyun rasyonlarında yonca yerine antep fıstığı kabuğunun kullanımının rumen selüloolitik bakterileri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada bakteri popülasyonun tespitinde real time PCR metodundan yararlanılmıştır. Alınan rumen örneklerinden pH (6.03-6.35), toplam UYA (95.0-76.3 mmol/L), amonyak azotu (193-84.3 mg/L) tespit edilmiştir. Rasyondaki artan antep fıstığı kabuğu seviyelerine bağlı olarak *F. succinogenes* (1.0-0.15 ng/ μ L) ve *R. albus* (1.02-0.16 ng/ μ L) popülasyonunda önemli düzeyde azalma gözlenirken, *R. flavefaciens*'in (1.19-1.21 ng/ μ L) ise düşük oranda antep fıstığı kabuğu içeren rasyonlardan etkilenmediği görülmüştür. Antep fıstığında bulunan taninlerin selüloolitik ve toplam bakteri popülasyonunda (564-315 ng/ μ L) azalmaya sebep olduğu, rumende pH' yı arttırdığı, UYA ve amonyak azotunu azalttığı sonucuna varılmıştır (Ghasemi ve ark., 2012).

Pirinç samanı ile beslenen bataklık mandasında bakteriyal popülasyon ve mikrobiyal protein sentezi üzerine Leuceaena yaprak peletlerinin (LYP) etkisi araştırılmıştır. Farklı miktarlarda (0, 150, 350, 400 g/h/d/d) LYP ile beslenen mandalarda LYP seviyesindeki artışa bağlı olarak yem tüketiminin önemli derecede arttığı (3.3-4.6 g/kg) gözlenmiştir. Ruminal amonyak azot konsantrasyonu (9.4-16.2 mg/dL) da kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artmıştır. Leuceaena yaprak peletlerinin ilave miktarı arttıkça rumendeki protozoa popülasyonu ($7.2-4.6 \times 10^5$ hücre/mL) azalırken, mantar zoosporları ($2.7-4.5 \times 10^4$ hücre/mL), amilolitik ($0.9-2.2 \times 10^7$ cfu/mL), proteolitik ($2.3-5.2 \times 10^7$ cfu/mL) ve selüloolitik ($5.4-10.6 \times 10^8$ cfu/mL) bakteri popülasyonunda önemli düzeyde artış gözlenmiştir. LYP ilavesi arttıkça metanojenik bakteri popülasyonu ($6.6-0.8 \times 10^5$ kopya/mL) azalırken toplam bakteri ($3.2-9.8 \times 10^9$ kopya/mL), *R. albus* ($1.1-9.0 \times 10^6$ kopya/mL), *F. succinogenes* ($0.9-3.2 \times 10^9$ kopya/mL) ve *R. flavefaciens* ($0.8-1.5 \times 10^9$ kopya/mL) popülasyonunda artış bildirilmiştir. LYP seviyelerindeki artışa bağlı olarak mikrobiyal azot kaynağı ve azot dengesinin dikkate değer biçimde geliştiği sonucuna varılmıştır (Hung ve Wanapat, 2013).

Yapılan bir çalışmada farklı oranlarda kaba ve konsantre (80:20, 50:50, 20:50) yem içeren rasyonlarda farklı miktarlarda (0, 333, 667, 1000 mg/L) kitosan katkısının rumen fermentasyonu ve rumen bakterileri üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüzde 50:50 oranında yemlemenin yapıldığı grup ($4.42-5.83 \times 10^{-2}$ mg/L) hariç diğer gruplarda kitosan katkısının protozoa sayısında bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir. *F. succinogenes*'in kitosan katkısındaki artışa paralel olarak tüm gruplarda ($4.4-7.83 \times 10^{-3}$, $1.20-4.73 \times 10^{-3}$ ve $0.89-9.71 \times 10^{-3}$) arttığı gösterilmiştir (Yun Li ve ark., 2013).

Bir başka çalışmada *in-vitro* rumen sisteminde bazı bakteriyal türlerin (*B.fibrisolvens*, *R. albus*, *S. bovis*, *M. elsdenii*) miktar tayini kantitatif real time PCR ile tespit edilmiştir. Rumen sıvısı kaba yem konsantre yem oranı 75:25 olan rasyonla beslenen süt ineklerinden (Sİ) ve kaba yem konsantre yem oranı 25:75 olan rasyonla beslenen semirtilmiş boğalardan (SB) temin edilmiştir. Bu iki fermentasyon sıvısı 0-24 saatlik inkübasyon aralığında karşılaştırıldığında SB grubunda tespit edilen pH değeri (6.88), Sİ grubundan (7.18) düşük, toplam UYA konsantrasyonu ($61.90 > 29.60$ mmol/L) ise yüksek bulunmuştur. Son fermentasyon ürünleri arasında çok az farklılık

gözlenmiştir. Sİ grubunda rumen sıvısında *B. fibrosolvans* konsantrasyonu (3.39×10^9 kopya/mL) SB grubunda rumen sıvısından (1.41×10^9 kopya/mL) daha yüksek bulunurken, *M. elsdenii*'ye sadece SB grubundan elde edilen fermentasyon sıvısında rastlanmıştır. Her iki rumen sıvısı içeriğinde de *R. albus* ve *S. bovis* miktarında bir fark gözlenmemiştir. Her iki rumen sıvısında 24 saatlik *in-vitro* inkübasyon sonunda *B. fibrosolvans* hariç diğer bütün bakteriyel suşlarda artış olduğu bildirilmiştir (Onime ve ark., 2013).

Bubalus bubalis (hint surti mandası) de bakteri popülasyonunun değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmada rumendeki predominant selüolitik ve non-selüolitik bakterileri real time PCR tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. 16S rRNA esas alınarak yapılan çalışmada örnekteki toplam rRNA içinde predominant bakteri olarak % 5.66 oranıyla *R. albus*'un ilk sırayı aldığı % 0.9-4.24 oranında da *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *Prevotella* türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel rRNA gen kopyalarının % 11'den az olan kısmının da *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Treponema bryantii* ve *Anaerovibrio lipolytica*'dan oluştuğu gösterilmiştir (Singh ve ark., 2013).

Bir diğer çalışmada ise flavonoidlerin rumen fermentasyonu, metan üretimi ve mikrobiyal popülasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan flavonoidlerden naringin ve kuersetin'in hariç diğer hepsinin kuru madde sindirilebilirliğini (% 87.9-81.5) azalttığı gözlemlenmiştir. Flavonoidlerin varlığında metan üretimi (8.6-4.9 mL/g KM) önemli derecede baskılanmış, toplam UYA konsantrasyonu (47.3-39.1 mM) ve 24 saatlik gaz üretimi (36.1-28.1 mL/24 saat) ise flavon, mirisetin, kaempferol flavonoidleri varlığında önemli derecede azalmıştır. Protozoa ve metanojenler kuersetin, naringin tarafından baskılanmıştır. *R. albus* ($2.4-1.5 \times 10^5$ kopya/mL), kuersetin hariç diğer tüm flavonoidler tarafından baskılanırken, *F. succinogenes* ($3.5-1.4 \times 10^6$ kopya/mL) ve *R. flavefaciens* ($5.1-3.2 \times 10^5$ kopya/mL) tüm flavonoidler tarafından baskılanmıştır (Oskoueian ve ark., 2013).

Humulus lupulus (Hops) (49.3mg/g KM) ve *Yucca schidigera* (37.5mg/g KM) ekstraktlarının tek başına ya da monensinle kombinasyonunun rumen fermentasyonu ve mikrobiyal popülasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bütün muamelelerde metan üretimi (56.5-21.4 mL/g KM), mikrobiyal protein (92.7-25.6 mg) ve amonyak azotunda

(38.4-23.6 mmol/L) azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte monensin *R. flavefaciens* 16S rRNA kopya sayısında azalmaya ($3.46-0.001 \times 10^8$ kopya/mL) neden olurken, *Selenomonas ruminantium*'un 16S rRNA kopya sayısında artışa ($10.43-87.0 \times 10^8$ kopya/mL) neden olduğu bildirilmiştir. Hops ekstraktının tek başına ya da monensin ile birlikte kullanımının *R. flavefaciens* miktarında azalmaya, *Selenomonas ruminantium*'un miktarında artışa neden olduğu; Yucca ekstraktının monensin ile kombinasyonunun *S. ruminantium*' un miktarını artırdığı ($103.1-124.4 \times 10^8$ kopya/mL) ve monensin ilavesi olmayan bütün muamelelerde metanojenlerin sayılarının azaldığı bildirilmiştir (Narvaez ve ark., 2013).

Diğer bir çalışmada hindistan cevizi yağı ve balık yağının mikrobiyal popülasyon yoğunluğu üzerine etkileri ise kantitatif PCR metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır. Rumen mikrobiyal popülasyonundaki değişiklik incelendiğinde sırasıyla balık yağının hindistan cevizi yağına göre metanojenleri (7.92-7.64 mL/L; 7.92-7.79 mL/L) daha fazla baskıladığı buna karşılık protozoa ($9.23-8.90 \log_{10}$ kopya/mL; $9.23-7.65 \log_{10}$ kopya/mL), *R. flavefaciens* (7.17-6.96 \log_{10} kopya/mL; 7.17-6.66 \log_{10} kopya/mL) ve *F. succinogenes* (7.16-6.50 \log_{10} kopya/mL; 7.16-5.21 \log_{10} kopya/mL) üzerine ters etki yarattığı gözlenmiştir. Bunun yanında *R. albus* (6.97-6.89 \log_{10} kopya/mL; 6.97-6.82 \log_{10} kopya/mL) ise her iki yağdan da etkilenmemiştir. Sonuç olarak hem hindistan cevizi yağı hem de balık yağının metan konsatrasyonunu azalttığı ancak arkeal ve bakteriyel popülasyon üzerine farklı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Patra ve Yu., 2013).

Bir diğer çalışmada bitki ekstraktlarının (ananas dikenli ve ginko yaprakları) *in-vitro* ruminal fermentasyon ve rumendeki metan-metanogenesis ile ilişkili mikroorganizmalara etkisi araştırılmıştır. *F. succinogenes*, siliat-metanojenler ve dört farklı metanojen grubunun toplam mikrobiyal popülasyondaki rolü real time PCR metodundan yararlanılarak belirlenmiştir. Metan ve karbondioksit gibi gaz profilleri ve ruminal fermentasyon karakteristikleri *in-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Bitki ekstraktlarının kullanıldığı grubun metan emisyonu (34.0-27.1 mL/g KM) ve toplam UYA (101.16-91.04 mM) oranları kontrol grubundan önemli oranda düşük bulunmuştur. İnkübe edilen karışımlarda *Methanococcales* ve *Methanosarcinales* PCR analizinde tespit edilemezken siliat-metanojen

popülasyonunun deneme gruplarında kontrol grubuna oranla % 25-49 azalma gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında kullanılan bitki ekstraktlarının protozoa popülasyonunda azalmaya sebep olarak rumende metan emisyonunu azalttığı ve böylece metanogenezi baskıladığı düşünülmektedir. Bitki ekstraktlarının ilave edildiği gruplarda *methanobacterales* popülasyonun azaldığı, *methanomicrobiales* popülasyonun ve predominant selüloolitik bakteri olan *F. succinogenes*'in miktarının 2.5 kat arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak bitki ekstraktı olarak kullanılan ananas dikenli ve ginko yapraklarının protozoa türlerini inhibe ederek metanogenezisi azalttığı ve ruminantlarda yem katkısı olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (Kim ve ark.,2013).

Kaktüs (*Opuntia ficus indica f. inermis*) ve akasya ağacında (*Acacia nilotica* ve *A. saligna*) bulunan antimikrobiyal etkili ikincil bileşiklerin rumen mikrobiyal profili üzerine etkilerinin araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan iki bitki türünde metan üretimi, amonyak konsantrasyonu, toplam fermentasyonu üzerine etkisinin belirlenmesinde *in-vitro* gaz üretim tekniği, mikrobiyal popülasyon profilindeki değişikliklerin gözlenmesinde ise real time PCR metodundan yararlanılmıştır. Yirmidört saatlik inkübasyonda, mantar popülasyonu 0.30 iken sıfırıncı saat ile karşılaştırıldığında *Acacia nilotica* ve *Opuntia*'nın etkisiyle 0.03 kat, *cyanophylla* ile 2-1.24 kat arttığı gözlenmiştir. Butün deneme gruplarında *F.succinogenes* popülasyonunun arttığı, bununla beraber tanin ihtiva eden bitkiler ve *Opuntia*'da *R. flavefaciens* popülasyonunun azaldığı *Opuntina* hariç diğer tüm deneme gruplarında metanojenik popülasyonda artış olduğu, *A. saligna*, *Opuntia* ve *A. nilotica*'nın rumen protozoa sayısında sırayla 3.68, 5.59, 5.34 kat azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *A. nilotica* ve *A. cyanophylla*'nın tanin içeriğinin metanogenesisde indirekt etkili olduğu, *O. ficus indica*'nın okzalit içeriğinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Chentli ve ark., 2014).

Koyunların rasyonlarındaki kaba yem tipinin rumen mikroorganizmaları ve fermentasyon karakteristikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Hayvanlar kaba yem olarak % 70 yonca kuru otu (YKO) ya da kuru ot (KO) ve % 30 konsantre yem içeren rasyonlarla beslenmiş ve yemlemeden sonra 0, 4, 8. saatlerde rumen sıvısı alınmıştır. Kaba yemlerde pH, laktat konsantrasyonu, ksilaz aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken amonyak azotu, toplam UYA, karboksimetilselulaz (CMCase) ve amilaz

aktivitesi yonca kuru otu ile beslenen koyunlarda kuru ot ile beslenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Kantitatif real time analizi ile mikrobiyal flora incelendiğinde kuru ot ile beslenen koyunlarda *F. succinogenes* (0.066), *R. flavefaciens* (0.013) ve mantar konsantrasyonunun (0.001) yonca kuru otu ile beslenen koyunlarınkinden (0.064, 0.012, 0.038) daha yüksek bulunmuştur. Ancak *R. albus* ve metanojenik arkelerin kaba yem tipinden etkilenmediği bildirilmiştir (Saro ve ark., 2014).

Bir diğer çalışmada farklı protein kaynağı olarak maya ile fermente edilmiş kasava çentik proteini ve soya küspesi (SK) kullanımının yanında kaba konsantre yem oranının rumen mikroorganizmaları üzerine etkisi beş farklı oranda (80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100) hazırlanan kaba/konsantre yem materyali ile *in-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Protein kaynakları bakımından karşılaştırıldığında kasava çentik protein'i kullanılan gruplarda ki toplam bakteri (10.8×10^7 hücre/mL), *F. succinogenes* (5.1×10^7 kopya/mL), *R. flavefaciens* (5.9×10^6 kopya/mL) ve *R. albus* (5.1×10^6 kopya/mL) popülasyonu, SK kullanılan gruplardan (5.8×10^7 hücre/mL; 4.3×10^7 kopya/mL; 3.8×10^6 kopya/mL; 3.6×10^6 kopya/mL) daha yüksek bulunurken, mantar zoosporları, metanojenler ve protozoal popülasyonlarının değişmediği gözlenmiştir. Kaba/konsantre yem oranları azaldığında, mantar zoosporları ($2.8-5.0 \times 10^5$ hücre/mL), toplam bakteri popülasyonunda ($3.8-4.9 \times 10^9$ kopya/mL) önemli derecede artış gözlenirken, *F. succinogenes* ($5.1-0.8 \times 10^7$ kopya/mL), *R. flavefaciens* ($5.9-0.8 \times 10^6$ kopya/mL), *R. albus* ($5.1-0.5 \times 10^6$ kopya/mL), metanojenler ve protozoal popülasyonunda ise azalma tespit edilmiştir (Polyorach ve ark., 2014).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

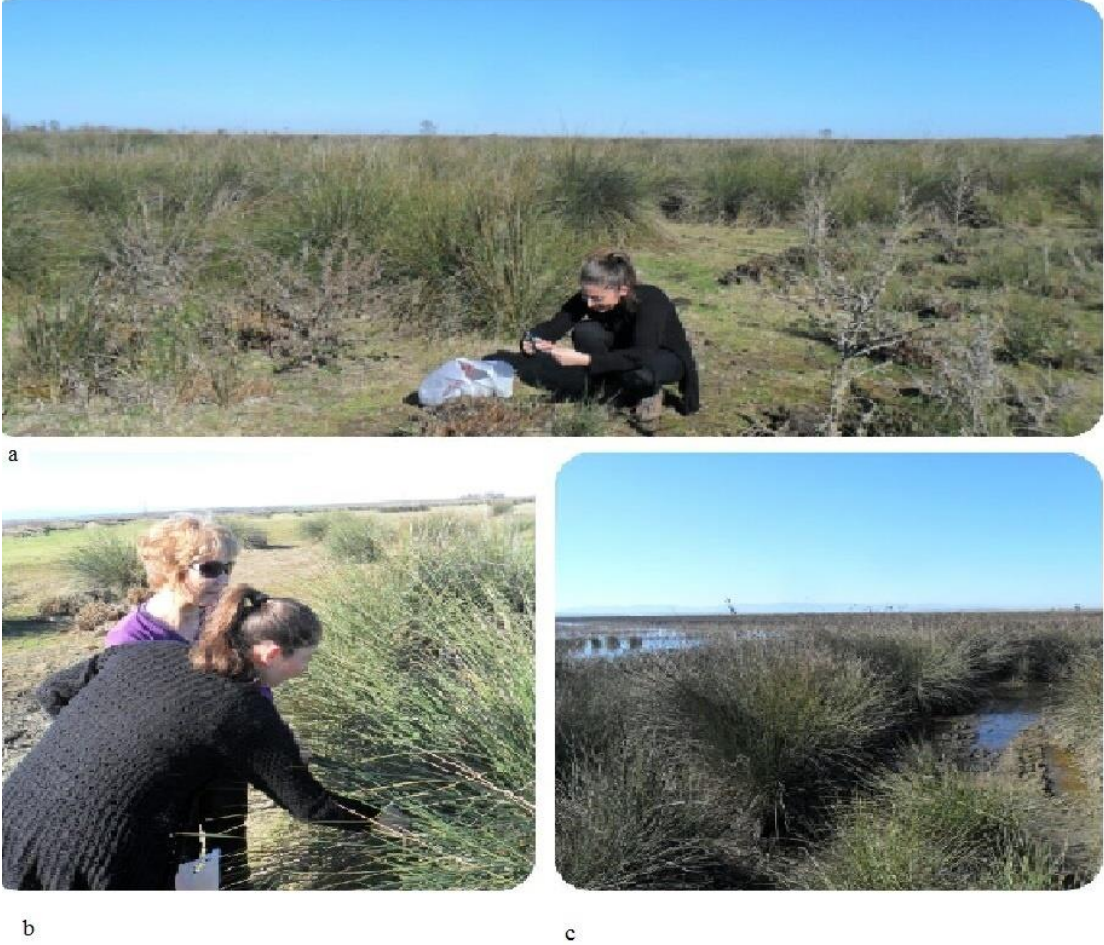
Rumen sıvısı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Ruminant Yem Değerlendirme Araştırma ve Eğitim Ünitesinde mevcut 2012/70 nolu ve 18.12.2012 tarihli OMÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı ile rumen kanülü takılmış % 65 kuru yonca otu ve % 35 toklu besi yemiyle (% 13 HP, % 10 HS, % 4 HY, % 9 HK) beslenen üç adet Karayaka koçlarından sağlandı (Şekil 1).



Şekil 1. Kanüllü koç kafesleri (a), kanüllü koç (b), rumen sıvısı alma probu (c), karbondioksit tüpü ile anaerobik ortam sağlama (d,e)

3.1.2. Yem Materyali

Projede yem materyali olarak 2014 yılı Şubat ayı Kızılırmak Deltasında 3 istasyondan (I. İstasyon: 36 19' 53 81'' E, 41 16' 30 29'' N, II. İstasyon: 36 6' 51 52'' E, 41 36' 24 24'' N, III. İstasyon: 36 5' 33 18'' E, 41 38'16 85'' N) toplanan (Şekil 2) *Juncus acutus* bitkisi kullanıldı. Yemler 65 °C bir gece ön kurutma yapıldıktan sonra 1 mm elek çapına sahip değirmende öğütülerek analizlerde kullanıldı.



Şekil 2. a, b, c, *Juncus acutus* örneklerinin toplanması

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Projede kullanılacak cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Projede Kullanılan Cihazlar ve Kullanım Amaçları

Projede Kullanılan Cihaz Listesi	Projede Kullanım Amacı
Değirmen	Yem örneklerin öğütülmesi
Hassas terazi	Örneklerin tartımı
Kül fırını	Kuru yakma
pH metre	pH ölçümü ve standart hazırlama
Protein tayin cihazı (kjeldahl sistemi)	Ham protein analizi
Yağ tayin cihazı	Ham yağ analizi
Su banyosu	Örneklerin deney süresince inkübasyonu
Etüv	Örneklerin kurutulması
Çeker ocak	Örneklerin yakılması
Distile su cihazı	Analizlerde kullanılacak saf su üretimi
ANKOM 200 Fiber Analyzer cihazı	NDF, ADF, ADL tayini
İn-vitro gaz üretim sistemi (ANKOM)	OMS tayini, ME hesaplanması
Bio-Rad Real Time PCR cihazı	Rumen selülitik bakterilerinin miktar tespiti

3.2. Metot

3.2.1. Yemlerin Kimyasal Kompozisyonunu Belirlemek için Yapılan Analizler

Kuru Madde Analizi

Analize başlamadan önce kuru madde kapları 2 saat 105 °C kurutma dolabında bekletilerek içindeki nemin uçması sağlandı. Ardından kurutma dolabından alınan kuru madde kapları oda sıcaklığına gelene kadar desikatörde tutuldu. Bir g yem (A) materyali darası hassas terazide alınmış (D) kurutma kaplarında tartıldı (A1). Analizi yapılan yem materyali kaba yem olduğu için önce ön kurutma yapıldı sabit ağırlığa gelene kadar 65 °C bir gece ardından 105 °C bir gece bekletildi. Süre sonunda desikatöre alınarak oda sıcaklığına geldikten sonra tartımı yapıldı (A2). Gerekli hesaplamalar yapılarak yemin yüzde kuru madde miktarı hesaplandı (AOAC, 2006)

$$\% \text{ Nem} = \frac{A2 - D}{A1 - D} \times 100$$

$$\% \text{ KM} = 100 - \% \text{ Nem}$$

Ham Kül ve Organik Madde Analizi

Boş olarak tartımı yapılan porselen krozeler ham kül fırınında 550 °C'de 2 saat bekletildi. Ardından desikatöre alınarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Bir g yem (A) materyali hassas terazide darası alınmış krozeler (D) içerisinde tartıldı (A1). Krozeler kül fırınına yerleştirilerek 550 °C de 4 saat yemin organik kısmı yakıldı. Süre sonunda desikatöre alınan krozeler oda sıcaklığına geldikten sonra hassas terazide tartımı yapıldı (A2). Gerekli hesaplamalar yapılarak yem materyalinin yüzde ham kül ve yüzde organik madde içeriği bulundu (AOAC, 2006).

$$\% \text{ HK} = \frac{A2 - D}{A1 - D} \times 100$$

$$\% \text{ OM} = \% \text{ KM} - \% \text{ HK}$$

Ham Protein Tayini

Yem derişik H₂SO₄ (sülfürik asit) ile yaş yakma yöntemiyle yakılarak ve yapısındaki N (azot) önce amonyum sülfata sonra da amonyağa dönüştürüldü. Son olarak da titrasyonla amonyaktaki azot miktarına karşılık HP miktarı hesaplandı (AOAC, 2006).

A. Yaş Yakma

Kjeldahl tüpüne tartımı yapılan bir g yem materyali konduktan sonra tüpe 2 adet katalizör Kjeldahl tableti ve üzerine 20 mL H₂SO₄ eklendi. Tüplerden bir tanesine ise kör tüp olarak kullanılmak üzere içine yem materyali konmadan diğer kimyasallarla işleme alındı. Kjeldahl tüplerine 200 °C'de 45 dakika ön ısıtma yapıldıktan sonra 400 °C'de 60 dakika yakma işlemi gerçekleştirildi.

B. Distilasyon

Yakma işlemi tamamlandıktan sonra örnekler distilasyon ünitesine alındı ve örneğin toplanacağı erlenmayere metil red ve bromkresol yeşilinden oluşan indikatörden (10 mL Brom kresol + 7 mL Metil red ya da 0.1 g Brom Kresol + 0.02 g metil red 100 mL alkolde çözünür) 8 damla damlatıldı. Distilasyon ünitesinde kullanılacak kimyasallar (H₂O: 50 mL, NaOH: 75 mL, H₃BO₃: 60 mL) hazırlandıktan sonra distilasyon ünitesi çalıştırıldı.

C. Titrasyon

Distilasyon sonrası erlende toplanan örnek 0,75 normal H₂SO₄ ile titre edildi ve pembe renk oluşumu gözleendiğinde titrasyon sonlandırıldı. Kullanılan H₂SO₄ miktarı kaydedildi ve protein analiz formülünden yararlanılarak numunedeki yüzde protein oranı hesaplandı.

$$\% \text{ Protein} = (K) \times (V) \times (N) \times (f_{H_2SO_4}) \times (100) / (M) \times (1000) \times (fp)$$

K: 14,007 (Azotun atom ağırlığı)

V: Kullanılan H₂SO₄ (mL)

N: H₂SO₄'nin normalitesi (0,75)

$f_{H_2SO_4}$: 0,75 N H_2SO_4 'nin faktörü

f_p : Proteine çevirme faktörü (6,25)

M: Numune miktarı

Ham Yağ Analizi

Bir g öğütülmüş yem, darası alınmış kartuşlara konularak tartımları yapıldı (A). Benzer şekilde cam eter beherler de kuru madde dolabında $105^{\circ}C$ de 2 saat tutulduktan sonra desikatöre alındı ve oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra tartılarak daraları alındı (B). Ardından kartuşlar soxhlet HY analiz cihazına yerleştirildi. İşlem bitince eterin uçmasını sağlamak için beherler $105^{\circ}C$ ' de yarım saat kurumaya bırakıldı. Kurutma sonrası tartımı yapılarak (C) HY miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı (AOAC, 2006) (Şekil 3).

% HY: $(C-B/A-B) \times 100$



Şekil 3. *Juncus acutus* örneklerinin Ham yağ (a), Kuru madde (b), Ham kül (c) analizi

Nötral Deterjan Fiber (NDF) Analizi

NDF hücre duvarının lifli karbonhidratlarını (selüloz ve hemiselüloz), lignin, ligninleşmiş ve sıcaklıkla zarar görmüş bir kısım proteinleri ve silisyum içerir. Bu fraksiyon, yemin özgül ağırlığı hakkında da fikir veren iyi bir göstergedir. Yemlerin hücre duvarı bileşenlerini oluşturan NDF, ADF ve ADL içerikleri Van Soest ve ark. (1991) tarafından bildirilen yöntemlere göre ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) cihazı kullanılarak yapıldı (Van Soest ve ark., 1991).

NDF analizinde kullanılan solüsyon; 30 g Sodyum Lauryl Sülfat + 18,61 g EDTA-di sodyum salt dihidrat + 6,81 g sodyum tetra borat dekahidrat + 4,56 g sodyum

fosfatdibazik-susuz + 10 mL trietilen glikol + 1 L distile su (ısıtma ve karıştırma ile pH 6,9-7,1 arası olmalı) içerir. NDF analizinde kullanılan solüsyonun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3' de verildi.

Tablo 3. NDF analizinde kullanılan solüsyonun hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

Kimyasal Madde	Miktar
Sodyum Lauryl Sülfat	30 g
EDTA-di sodyum salt dihidrat	18,61 g
Sodyum tetra borat dekahidrat	6,81 g
Sodyum fosfatdibazik-susuz	4,56 g
Trietilen glikol	10 mL
Distile su	1 L

Numaralandırılmış torbalar önce boşken (W1) ardından 0.5 gr yem konulduktan sonra tartıldı (W2). Torbaların ağzı kapatıldıktan sonra her kata 3 torba olacak şekilde plastik raflara dizilerek kompartmana yerleştirildi. Cihazın tahliye vanası kapalı konumda iken 20 g sodyum sülfat + 4 mL alfa amilazı 2000 mL ND solüsyonu içinde çözündürülerek (24 numune için) kompartmana döküldü.

Agitate+heat düğmesine basılarak kapağı kapatıldı ve 75 dakika beklendi. Süre sonunda Agitate+heat düğmesine basıldı ve cihaz kapatıldı. Vana yavaşça açılarak solüsyonun tahliyesi sağlandı. Ardından kapak açıldı ve tahliye vanası tekrar kapatıldı. 2000 mL kaynar su + 4 mL alfa amilaz dökülerek cihazın agitate düğmesi açık, heat düğmesi kapalı konuma getirildi. Beş dakika yıkama yapıldı. Vana aç kapa yapılarak bir kaç kez sıcak suyla yıkama yapıldı. En son vana kapatılarak soğuk su ile yıkama yapıldı. Torbalar süzüldü ve asetonda 3 dakika bekletildikten sonra, etüvde 105 °C de kurutuldu ve tartıldı (W3). Krozeler tartılıp darası alındı (N), içerisine yerleştirilen numuneler kül fırınına konup 550 °C de 3-4 saat yakıldıktan sonra dışarıya alınıp soğuduktan sonra tartımı yapıldı (M). Yaş yem, kuru madde ve organik madde bazında % NDF hesaplamasında kullanılan formüller Tablo 4' de gösterildi.

Hesaplama:

Kül= M-N

OM (W4)= W3-kül

Tablo 4. NDF Hesaplama

-Yaş yem bazında	-Kuru madde bazında	-Organik madde bazında
% NDF değeri	% NDF değeri	% NDF değeri
$(W3-(W1xC1))x100/W2$	$(W3-(W1xC1))x100/W2xKM$	$(W4-(W1xC2))x100/W2xKM$
W1	Torba ağırlığı	
W2	Numune ağırlığı	
W3	Ekstraksiyon sonrası ağırlık	
W4	Organik materyal ağırlığı (OM)(W3-kül) (kuru madde dolabından çıktuktan sonraki ağırlık – kül)	
C1	Boş torba düzeltme faktörü (etüvden sonraki ağırlık/boş torbanın kendi ağırlığı)	
C2	Boş torba kül düzeltme faktörü (yanma sonrası boş torba ağırlığı/ boş torbanın kendi ağırlığı)	

Asit Deterjan Fiber (ADF) ve Asit Deterjan Lignin (ADL) Analizleri

ADF ise NDF içerisinde hemiselüloz çıkartılarak elde edilir. Bu nedenle bu fraksiyon, yemin sindirilebilirliği hakkında ve hayvanın enerji alımı hakkında fikir veren iyi bir göstergedir.

ADF analizi ANKOM 200 Fiber Analyzer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. ADF analizinde kullanılacak solüsyon; 20g CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) + 1L 1N H₂SO₄ içinde çözülürerek hazırlandı. Numaralandırılmış torbalar önce boşken (W1) ardından 0.5 g yem konulduktan sonra tartıldı (W2). Torbaların ağzı kapatıldıktan sonra plastik raflara konarak cihaza yerleştirildi. Cihazın vanası kapatıldıktan sonra 2000 mL (tam numune için) solüsyon eklenerek cihazın kapağı sıkıca kapatıldı.

Agitate+heat düğmeleri açık konumda cihaz 60 dakika çalıştırıldı. Çalışma bitiminde agitate+heat düğmeleri kapalı konuma getirilip vana açıldı. Solüsyon boşaldıktan sonra vana tekrar kapatılarak 2000 mL sıcak su ile numuneler 5 dakika yıkandı. Son olarak soğuk su ile yıkama işlemi tamamlandı. Torbalar süzüldü ve asetonda 3 dakika bekletildikten sonra, etüvde kurutulup (105 °C 2-4 saat) tartıldı (W3). Yaş yem, kuru madde ve organik madde bazında % ADF hesaplamasında kullanılan formüller Tablo 5’ de gösterildi. Üç istasyondan toplanan örneklerden bulunan % ADF, aşağıda verilen eşitlikle yerine konularak ME (MJ/kg KM) değerleri hesaplandı (Van Soest ve ark., 1991).

$$ME_{ADF}, MJ/kg KM = 14.60 - 0.13x ADF$$

Asit deterjan lignin analizi için:

ADL analizi için yukarıda bahsedildiği şekilde önce ADF analizi yapıldı. Kuruyan torbalar 500 mL (% 72 lik sülfirik asit) solüsyonu içeren erlenin içine atıldı. Yarım saatte bir karıştırılarak toplam üç saat bu solüsyonda kalması sağlandı. Süre sonunda asit solüsyon uzaklaştırılarak torbalar beşer dakikadan üç kez sıcak suyla ardından bir kez de soğuk suyla yıkanarak yıkama işlemi tamamlandı. Torbalar süzülerek asetonda üç dakika bekletildikten sonra, etüvde kurutuldu (105 °C de 2-4 saat) ve tartıldı (W5). Darası alınan krozeler tartıldıktan sonra (N), kül fırınına koyularak 550 °C’ de 3-4 saat yakıldıktan sonra desikatörde tutularak tartımları yapıldı (M). (Van Soest ve ark., 1991). Yaş yem, kuru madde ve organik madde bazında % ADL hesaplamasında kullanılan formüller Tablo 6’de gösterildi.

ADF Hesaplama:

Kül= M-N; W4=W3-kül

Tablo 5. ADF Hesaplama

-Yaş yem bazında % ADF	-KM bazında % ADF	-OM bazında % ADF
$(W3-(W1 \times C1)) \times 100 / W2$	$((W3-(W1 \times C1)) \times 100 / W2 \times KM)$	$((W4-(W1 \times C2)) \times 100 / W2 \times KM)$
W1	Torba darası	
W2	Numune ağırlığı	
W3	Ekstraksiyon sonrası ağırlık	
W4 OM	W3-kül	
C1	Boş torba düzeltme faktörü (etüvden sonraki ağırlık/boş torbanın kendi ağırlığı)	
C2	Boş torba kül düzeltme faktörü (yanma sonrası boş torba ağırlığı/ boş torbanın kendi ağırlığı)	

ADL Hesaplama:

Kül= M-N; W6=W5-kül

Tablo 6. ADL Hesaplama

-Yaş yem bazında % ADL	-KM bazında % ADL	-OM bazında % ADL
$(W5-(W1xC1))x100/W2$	$((W5-(W1xC1))x100/W2xKM$	$((W6-(W1xC2))x100/W2xKM$
W1	Torba darası	
W2	Numune ağırlığı	
W5	Ekstraksiyon sonrası ağırlık	
W6 OM	W5-kül	
C1	Boş torba düzeltme faktörü (etüvden sonraki ağırlık/boş torbanın kendi ağırlığı)	
C2	Boş torba kül düzeltme faktörü (yanma sonrası boş torba ağırlığı/ boş torbanın kendi ağırlığı)	

3.2.2. *In-vitro* Gaz Üretim Metodu

Yem ham maddelerinin *in-vitro* koşullarda sindirilebilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde Menke ve Steingass (1988) tarafından bildirilen gaz üretim metodunu esas alan ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi kullanıldı (Şekil 4).

Yapay tükürüğün hazırlanması: Yapay tükürük, 499.3 mL distile su, 250 mL makro mineral çözeltisi, 0.12 mL mikro mineral çözeltisi, 250 mL tampon çözeltisi, 1.25 mL resazurin çözeltisi ve 24 mL redüksiyon çözeltisi kullanılarak hazırlandı (12 şişe için hesaplanan miktar).

Yapay tükürüğün hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanmış şekilleri Tablo 7' de verildi.

Tablo 7. Yapay tükürüğün hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

Hazırlanacak Solüsyon	Kimyasal Madde	Miktar
Makro Mineral Çözeltisi	Na ₂ HPO ₄	1.55 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15 g
	Na ₂ HPO ₄	1.425 g
	Distile su	200 mL
Mikro Mineral Çözeltisi	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.66 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.5 g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.05g
	FeCl ₂ .6H ₂ O	0.49 g
	Distile su	5 mL
Tampon Çözeltisi	NaHCO ₃	8.75 g
	(NH ₄) HCO ₃	1 g
	Distile su	250 mL
Resazurin Çözeltisi	Resazurin	1.25 mg
	Distile su	1.25 mL
Redüksiyon Çözeltisi	1.0 N NaOH	1 mL
	Na ₂ S.7H ₂ O	156.25 mg
	Sistein-HCl	156.25 mg
	Distile su	24 mL

In-vitro gaz üretim sisteminde kullanılan modüller ve modüllerden gelen verilerin kablosuz dizüstü bilgisayarda kaydedilmesi Şekil 4' de gösterildi.



Şekil 4. *In-vitro* gaz üretim sisteminde kullanılan şişeler (a), şişelerin modül başlıkları (b), modüllerden gelen verilerin kablosuz dizüstü bilgisayarda kaydedilmesi (c, d)

Yöntemde yemlerin gaz üretimini saptayabilmek için 250 mL hacimli modüller (cam şişeler) kullanıldı. 1 g kuru yem örnekleri iki tekerrürlü olarak cam şişeler içerisine konuldu. Gaz oluşumunu sağlamak amacıyla şişelerin içerisine pH' ları ölçülüp 20 mL rumen sıvısı ve 80 mL çözelti karışımından eklendi. Rumen sıvısıyla birlikte kullanılacak çözelti 499.3 mL saf su + 250 mL makro mineral + 0.12 mL mikro mineral çözeltisi + 250 mL tampon çözelti + 1.25 mL resazurin ve 24 mL redüksiyon çözeltilerinden oluşmaktadır. Bu işlemden sonra tüpler 39 °C'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Fermantasyon sonucu tüpler içinde açığa çıkan gaz değerleri 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde belirlendi. Üretilen gaz miktarları, Ørskov ve

McDonald (1979), yemlerin ME değerleri Blümmel ve Ørskov (1993), SOMD ise Menke ve ark. (1979) tarafından geliştirilen metotlar ile belirlendi.

Gaz üretiminin mL olarak hesaplanmasında 39 °C’de ölçülen gaz basıncı (P_{psi}) kullanıldı. ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi konfigürasyonu psi veya mbar biriminde gaz basınç ölçümlerine dayanmaktadır.

Ölçülen gaz basınçları aşağıda verilen ideal gaz kanunu eşitliği kullanılarak mol’ e çevrildi. Sonra aşağıda verilen Avagadro kanunu eşitliği kullanılarak mL olarak üretilen gaz hacmi (GÜ) hesaplandı.

İdeal Gaz Kanunu;

$$n = P \left(\frac{V}{RT} \right)$$

n: Gaz üretimi (mol)

P= Basınç [kilopascal (kP_a)]

V= Gaz ölçümü yapılan şişe içindeki gaz hacmi (L)

T: Sıcaklık (°K)

R: Gaz sabiti (8,314472 L kP_a K⁻¹mol⁻¹)

Avagadro Kanunu;

Avagadro kanunun kullanılmasıyla, atmosferik basınç psi olarak ölçüldü (1 psi=6.894757293 kP_a).

1 mol 273.150 °K’de ve 101.325 kP_a standart koşullarda 22.4 L yer kaplar. Böylece mol olarak ölçülen gaz mL’ye aşağıdaki eşitlik ile çevrildi.

$$\text{Üretilen gaz (mL)} = nx22.4x1000$$

ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi-gaz şişe hacim kapasitesi

Her bir şişenin gerçek hacim kapasitesi, kullanılan derecelenmiş hacim kapasitesinden büyüktür. Çalışmada kullanılan 250 mL özel inkübasyon şişeleri için gerçek hacim kapasitesi 310 mL olarak alındı.

Örnek Hesaplama

- ANKOM gaz üretim sistemi ile ölçülen kümülatif basınç 39° C’de 10 psi
- Çalışmada kullanılan derecelenmiş cam şişe hacmi 250 mL (gerçek hacim kapasitesi 310 mL)
- Cam şişeye konulan toplam sıvı(örnek+çözelti+rumen sıvısı) 102 mL
- Gazın şişenin üst kısmında kaplayacağı hacim

$$310-102=208 \text{ mL}=0.208 \text{ L}$$

$$P_{\text{ölçülen}}=4.5 \text{ psi}$$

$$1 \text{ psi}=6.894757293 \text{ kPa}$$

$$P= 4.5 \times 6.894757293$$

$$P= 31.026 \text{ kPa}$$

$$V= 0.208 \text{ L}$$

$$T= 273 \text{ K}+39^\circ \text{C}=312 \text{ }^\circ \text{K}$$

$$n= P\left(\frac{V}{RT}\right)=31.026\left(\frac{0.208}{312 \times 8.314472}\right)$$

$$n= 31.026 \times 0.0000802$$

$$n= 0.00248 \text{ mol}$$

Hesaplanan mL gaz üretim (GÜ) hacimlerinin beşte biri alındı.

Juncus acutus'un SOMD'i 24 saatlik GÜ, HP ve ADL değerleri kullanılarak hesaplandı.

$$\text{SOMD (\%)} = 57.2+0.365 \text{ GÜ}+0.304 \text{ HP}-1.98 \text{ ADL}$$

Kaba yemler için önerilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak *Juncus acutus*'un metabolize olabilir enerji değeri $ME_{GÜ}$, ME_{SOMD} (MJ/ kg KM) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı (Menke ve Steingass.,1988).

$$ME_{GÜ} = 2.20 + 0.136 GÜ + 0.0057 HP + 0.0029 HY$$

$$ME_{SOMD} = 0.16 SOMD$$

Ørskov ve McDonald (1979) modeli modifiye Mitscherlich $y = b(1 - e^{-ct})$ eşitliği kullanılarak gaz üretim kinetik parametrelerinden potansiyel gaz üretimi (b) ve hız sabiti (c) hesaplandı. Eşitlikte y gaz üretimini, t inkübasyon süresini göstermektedir.

Toplam gaz hacminin yarısını üretmek için geçen zaman ($T_{1/2}$) aşağıdaki eşitlikle hesaplandı.

$$T_{1/2} = \ln 2 / c = 0.693 / c$$

3.2.3. Real Time PCR Metodu

Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. Üç predominant selulolitik rumen bakterisi olan *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*'in miktar tespiti bu üç bakteri için tasarlanmış real time PCR kiti kullanılarak (Seegene 2X multiplex master mix with Eva Green I, HPLC grade primer) Samsun Halk Sağlığı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan real-time PCR cihazı (Bio-Rad) ile gerçekleştirildi.

DNA İzolasyonu

İn-vitro gaz üretim sistemi değerlendirilmesinde kullanılan 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 saatlik inkübasyonlar sonrasında alınan sıvılardan DNA izolasyonu, genel bakteri DNA ekstraksiyon protokolü uygulanarak gerçekleştirildi.

Yukarıda belirtilen saatlerde rumen sıvısından 1 mL alınarak 1.5 mL ependorf içinde 13000 rpm de soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Kalan kısmın üzerine CHELEX-Resin ekstraksiyon solusyonundan 200 µL eklendi ve yarım saat kaynamaya bırakıldı. Süre sonunda ependorfların kısa bir santrifüjünden sonra üstteki sıvı başka bir ependorfa alınarak PCR analizinde kullanılacağı zamana kadar -20 °C de derin dondurucuda saklandı (Şekil 5).



Şekil 5. DNA izolasyonu

Real Time PCR da Kullanılacak Primerlerin Seçimi

Üç predominant selüloolitik bakterinin (*F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*) real-time PCR (Vinh ve ark., 2011) ile miktar tespitinin yapılacağı çalışmada aşağıdaki primerler (Koike ve Kobayashi, 2001) kullanıldı.

F. succinogenes

Forward (Fs219f): 5'-GGTATGGGATGAGCTTGC-3'

Reverse (Fs654r): 5'-GCCTGCCCCTGAACTATC-3'

R. albus

Forward (Ral281f): 5'-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG-3'

Reverse (Ral439r): 5'-CCTCCTTGCGGTTAGAACA-3'

R. flavefaciens

Forward (Rf154f): 5'-TCTGGAAACGGATGGTA-3'

Reverse (Rf425r): 5'-CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA-3'

Real Time PCR Amplifikasyonu

Real time PCR amplifikasyonu için PCR karışımı; 10 μ L master mix, her bakteri için kendine has tasarlanmış forward ve revers primerlerinden 1'er μ L, 4 μ L moleküler grade su ve 3 μ L genomik DNA'dan hazırlandı (Şekil 6).



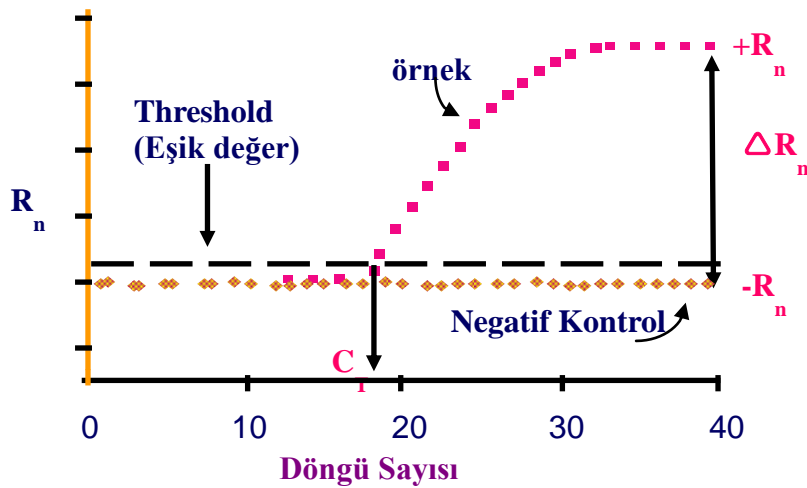
Şekil 6. *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus* için tasarlanmış primerler, 2x master mix, moleküler grade su ve genomik DNA'lar (a) laminar flow içinde real time PCR amplifikasyonu (b, c)

Real Time PCR Protokolü

F. succinogenes için PCR protokolü DNA çift sarmalının ayrılması (denatürasyon) için 94 °C’de 30 saniye, annealing (primerlerin bağlanması) için 60 °C’de 30 saniye, Extension (uzama) 72 °C’de 30 saniye olmak üzere toplam 48 döngüden oluşur. Ancak ilk döngüde denatürasyon 9 dakika, son döngüde uzama 10 dakikadır. *R. albus* ve *R. flavefaciens* için primerlerin bağlanma ısısı 55 °C olmak şartıyla diğer protokol basamakları ortaktır.

Real Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

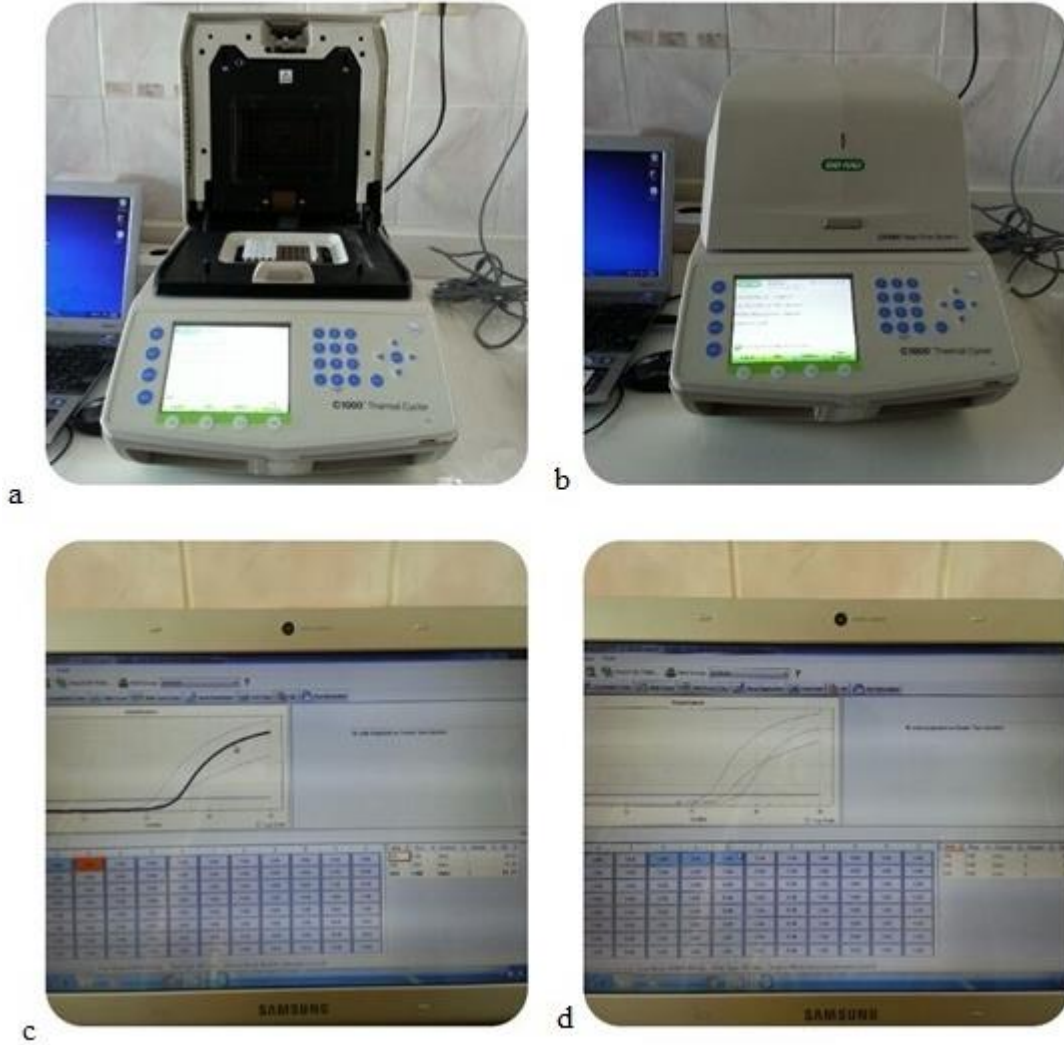
Cycle threshold (C_T), gerçek zamanlı PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) verilen addır (Şekil 7).



Şekil 7. Real time PCR da eşik değerinin hesaplanması

- R_{n+} , Templeyinde dahil olduğu reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu
- R_{n-} , negatif kontrolün (pasif boya) ve reaksiyon vermeyen örneklerin floresan emisyonu
- ΔR_n , R_{n+} ve R_{n-} arasındaki fark

Teorik olarak amplifikasyonun ekspanensiyel fazında hedef örneğin başlangıç miktarı ve amplifikasyon miktarı kantitatif olarak ilişkilidir. Bu nedenle real time PCR da sonuçlar eşik değeri esas alınarak cihaz tarafından otomatik olarak değerlendirildi (Şekil 8).



Şekil 8. Örneklerin real time PCR cihazına yerleştirilmesi (a, b), real time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (c,d)

Standart kullanılmadan yapılan real time PCR çalışmalarında C_T değerlerine bakılarak miktardaki azalma veya artmanın kaç kat olduğu ya da %'de kaç olduğunu belirlemede Livak metodundan yararlanılır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Örnek;

Çalışılan bakterinin birinci saat C_T değeri 34, 2. saat 32, 3. saat 31 ve dördüncü saat 30 olsun.

$$\text{Formül; } 2^{(1. \text{ Saat } C_T - \text{bakılmak istenen saatteki } C_T)} = 2^{34-32} = 2^2 = 4$$

Bu uygulamada birinci saat başlangıç olarak alınır ve bunun değeri 1 birim bakteri olarak kabul edilir. Yukarıdaki formüle göre 2. saatteki değer 4, 3. saatteki değer 8, 4. saatteki değer 32 olur. Yani 1. saatte 1 birim olan bakteri, 2. saatte 4 birim, 3. saatte 8 birim, 4. saatte 32 birim olur.

C_T değerinde bir artma olduğunda ise;

$$2^{34-35} = 2^{-1} = 0,50 \text{ olur ki bu da bakterinin yarı yarıya azaldığını gösterir.}$$

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmada laboratuvar analizlerinden elde edilen veriler (KM, HK, OM, HP, HY, NDF, ADF, ADL ve ME) aritmetik ortalamalar ve standart sapmalar şeklinde özetlenmiştir. İstasyonlar içi ve arası istatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. İstasyonlar için ortalamalar arası farklılıklar $P < 0.05$ seviyesine göre DUNCAN çoklu karşılaştırma testi uygulanarak belirlenmiştir (SAS, 2007).

İn-vitro gaz üretiminin zamana göre değişiminin incelenerek açıklanabilmesi amacıyla zamana bağlı olarak değişen üstel negatif dağılım fonksiyonu kullanılarak (TUT 125, 2007) modellenmiştir. Kullanılan eğri fonksiyonunun matematiksel gösterimi $y = b(1 - \exp^{-ct})$ şeklindedir. Burada;

t: Zamanı

y: t zamanındaki gaz üretimi miktarını

b: İntercept katsayısını

c: t zamana bağlı olarak değişen hız sabitini

göstermektedir.

Buna göre eğri uyumu SAS (2007) istatistik paket programında PROC NLIN prosedürü kullanılarak Gauss-Newton istatistik yöntemine göre 10^{-8} yakınsama katsayısı kabul edilerek yapılmıştır. Model uyumu yapıldıktan sonra model parametreleri tahmin edilmiştir. Çalışmada tüm şekil ve grafikler SAS STAT/GARPH ve excell yardımıyla oluşturulmuştur (SAS, 2007).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Kızılırmak Deltasından deltayı temsil edecek şekilde üç farklı istasyonun herbirinden 20'şer adet toplanan sulak alan bitkisi *Juncus acutus* yem materyali olarak kullanıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü istasyonda kökleri birbirine yakın beşer bitkiden toplanan örnekler birleştirildi. Her istasyondan dört kümülatif örnek oluşturuldu. Tüm analizler iki tekerrürlü yapıldı. *Juncus acutus*'un kimyasal kompozisyonu Wendee analiz sistemi ile, % SOMD ve ME değeri *in-vitro* gaz üretim tekniği ile, rumenin predominant selüloolitik bakterileri olan *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un miktarı üzerine etkisi de real time PCR kullanılarak belirlendi.

4.1. *Juncus acutus*'un Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

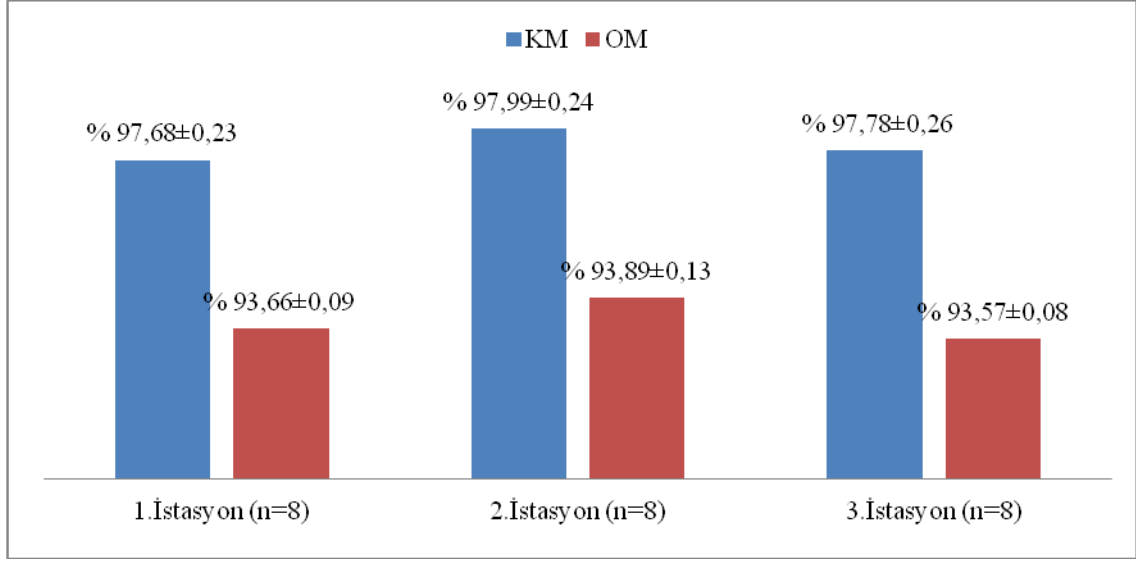
Kızılırmak deltasında üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un kimyasal kompozisyonu Tablo 8'de gösterildi. *Juncus acutus*'un üç farklı istasyondan toplanan havada kurutma üzerinden % KM değerleri sırasıyla % 43.6, % 43.6 ve % 40.8 bulundu.

Tablo 8. *Juncus acutus*'un kimyasal kompozisyonu

Ham Besin Maddeleri (%)	I. İstasyon	II. İstasyon	III. İstasyon
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
	(n=8)	(n=8)	(n=8)
KM (65 ⁰ C)	43.63±0.16	43.6±0.08	40.8±0.09
KM (105 ⁰ C)	97.68±0.23	97.99±0.24	97.78±0.26
HK	4.02±0.03	4.10±0.02	4.21±0.01
OM	93.66±0.09	93.89±0.13	93.57±0.08
HP	10.03±0.06a	9.79±0.07b	9.77±0.07b
HY	1.47±0.06	1.48±0.03	1.46±0.02
NDF	73.66±0.10	73.70±0.08	73.70±0.10
ADF	46.08±0.04	46.58±0.11	46.17±0.10
ADL	12.27±0.06a	12.17±0.09b	12.01±0.12c
ME, MJ/kg KM	8.61 ±0.01	8.55 ±0.02	8.60± 0.01

^{a, b, c} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.05). KM: Kuru Madde, OM: Organik Madde, HP: Ham Protein, HY: Ham Yağ, HK: Ham Kül, NDF: Nötral Deterjan Fiber, ADF: Asit Deterjan Fiber, ADL: Asit Deterjan Lignin, ME: Metabolik Enerji

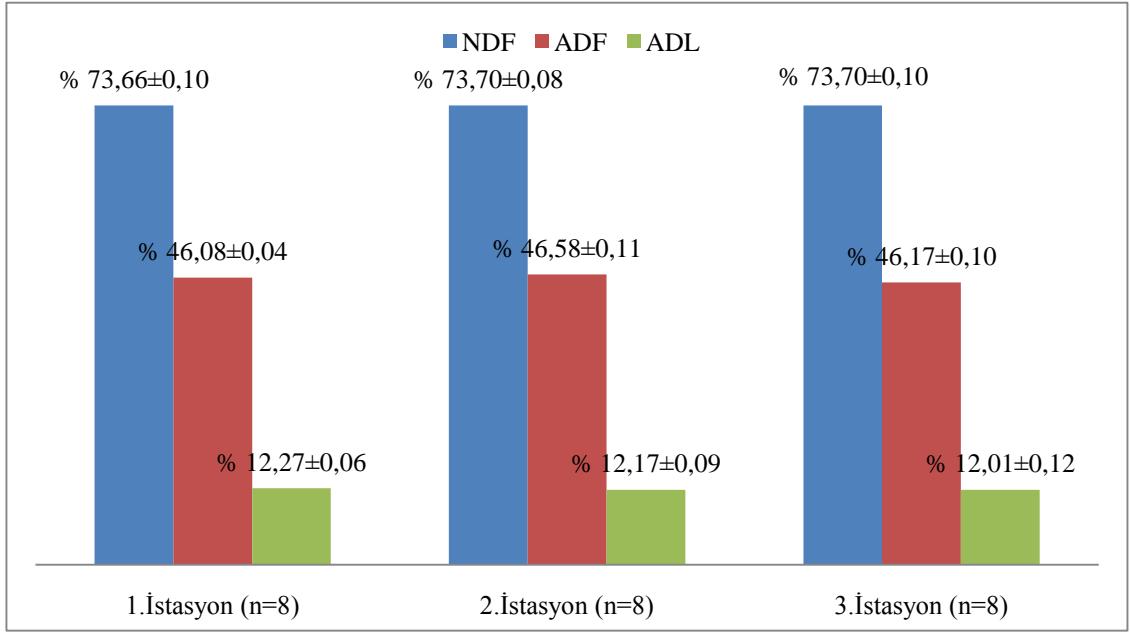
Juncus acutus'un üç istasyona göre minimum ve maksimum ham besin madde miktarları KM (% 97.68-97.99), OM (% 93.57- 93.89), HK (% 4.02-4.21), HP (% 9.77-10.03), HY (% 1.46-1.48), NDF (% 73.66-73.70), ADF (% 46.08-46.58), ADL (% 12.01-12.27) ve ME (8.55-8.61 MJ/kg KM) arasında bulundu. Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus* bitkisinin % KM ve % OM değerleri karşılaştırmalı sütun grafik olarak Şekil 9' da gösterildi.



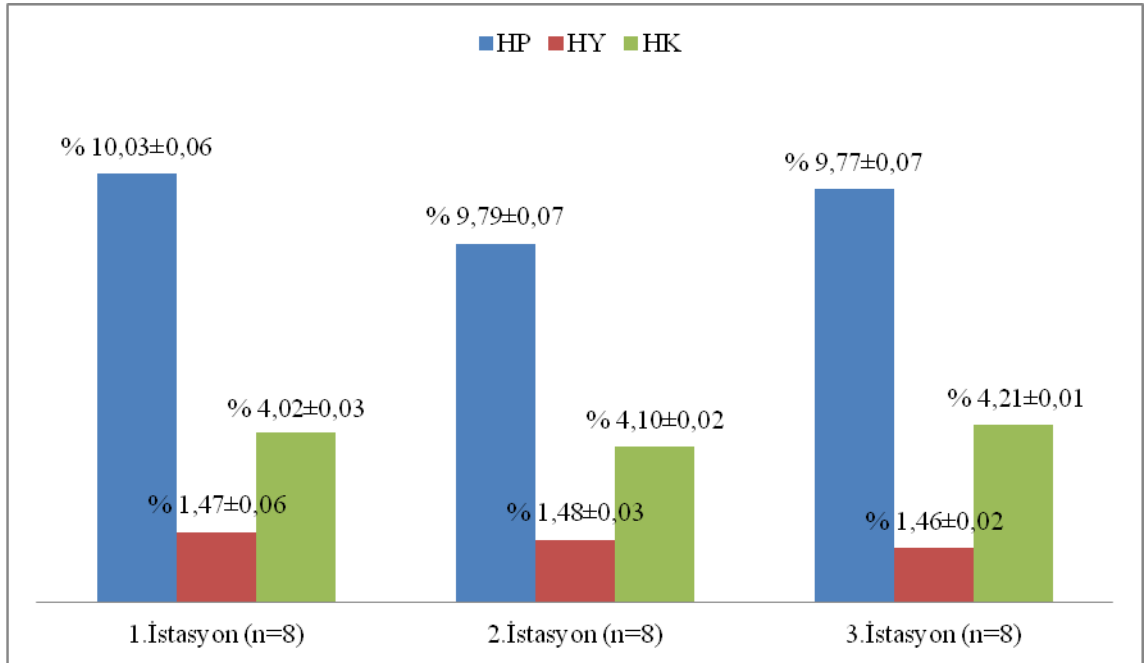
Şekil 9. *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre % KM ve % OM ortalama değerleri. KM: Kuru Madde, OM: Organik Madde

Juncus acutus bitkisinin % NDF, % ADF ve % ADL değerleri karşılaştırmalı sütun grafik olarak Şekil 10’de verildi. *Juncus acutus* bitkisinin % HP, % HY ve % HK değerleri karşılaştırmalı sütun grafik olarak Şekil 11’de gösterildi.

Juncus acutus’un kimyasal bileşenleri % HP ve % ADL değerleri hariç istasyonlar arasında önemli farklılık göstermedi ($p>0.05$). % HP birinci istasyonla ikinci ve üçüncü istasyon arasında fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$), (Tablo 8, Şekil 11). Üç istasyonun % ADL değerleri arasındaki fark da istatistiksel olarak önemli bulundu (Tablo 8, Şekil 10). Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11 incelendiğinde KM, OM, HK, ADF, NDF ve HY bakımından istasyonlara ait fark olmadığı görüldü ($P>0.05$).



Şekil 10. *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre % NDF, % ADF ve % ADL ortalama değerleri. NDF: Nötral Deterjan Fiber, ADF: Asit Deterjan Fiber, ADL: Asit Deterjan Lignin



Şekil 11. *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre % HP, % HY ve % HK ortalama değerleri. HP: Ham Protein, HY: Ham Yağ, HK: Ham Kül

4.2. *Juncus acutus*'un *İn-vitro* Gaz Üretim Metodu ile Gaz Üretiminin Belirlenmesi

İn-vitro gaz üretiminde kullanılan rumen sıvısında ölçülen pH 6.03-6.34 arasında değişti. Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki gaz üretim miktarları ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile basınç (psi) değeri üzerinden kaydedilen ve materyal metotdaki formüller kullanılarak mL cinsinden hesaplanan ortalama GÜ değerleri Tablo 9' da verildi. Üç ve altı saatlik inkübasyon zamanlarında *in-vitro* gaz üretim miktarları (P_{psi}), ($G\ddot{U}_{mL}$) istasyonlar arasında farklı bulundu ($P<0.05$). *İn-vitro* gaz üretim miktarı (P_{psi}), ($G\ddot{U}_{mL}$) değeri 12 saatlik inkübasyonda üçüncü istasyon değerleri I ve II. İstasyonlardan farklı bulundu ($P<0.05$). Yirmidört saatlik inkübasyonda II. İstasyon I. ve III. İstasyona benzer bulunurken I. ve III. İstasyon birbirinden farklı bulundu ($P<0.05$). Kırksekiz saatlik inkübasyonda ise III. İstasyon değerleri I. ve II. İstasyona benzer bulunurken, I. ve II. İstasyonlar birbirinden farklı bulundu. Yetmiş iki ve 96 saatlik inkübasyonda istasyonlar arasında fark saptanmadı ($P>0.05$).

Tablo 9. *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile ölçülen gaz miktarlarının basınç ($P_{psi}/1g$ KM) ve hesaplanan hakim ($G\ddot{U}_{mL}/200$ mg KM) ortalama değerleri

İnkübasyon Zamanı (Saat)	İn-vitro gaz üretim miktarı ($P_{psi}/G\ddot{U}_{mL}$)	I.İstasyon $\bar{X} \pm S_x$ (n=8)	II.İstasyon $\bar{X} \pm S_x$ (n=8)	III.İstasyon $\bar{X} \pm S_x$ (n=8)
3	P_{psi}	2.69±0.95a	1.47±0.51b	0.81±0.28c
	$G\ddot{U}_{mL}$	6.83±2.41a	6.58±1.26b	1.90±0.67c
6	P_{psi}	4.58±1.62a	3.21±1.13b	2.22±0.78c
	$G\ddot{U}_{mL}$	11.31±3.99a	7.97±2.81b	5.26±1.86c
12	P_{psi}	6.15±2.17a	5.40±1.91a	4.45±1.57b
	$G\ddot{U}_{mL}$	15.28±5.40a	13.44±4.75a	10.97±3.88b
24	P_{psi}	7.39±2.61a	7.15±2.82ab	6.79±2.40b
	$G\ddot{U}_{mL}$	18.31±6.47a	16.98±6.00ab	16.87±5.96b
48	P_{psi}	8.26±2.92a	8.03±2.83b	8.24±2.91ab
	$G\ddot{U}_{mL}$	20.79±7.35a	19.86±7.02b	20.42±7.22ab
72	P_{psi}	8.82±3.11	8.26±2.92	8.49±3.0
	$G\ddot{U}_{mL}$	21.86±7.73	20.45±7.23	21.12±7.46
96	P_{psi}	8.82±3.11	8.26±2.92	8.49±3.0
	$G\ddot{U}_{mL}$	21.85±7.78	20.45±7.23	21.12±7.46

a, b,c Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)

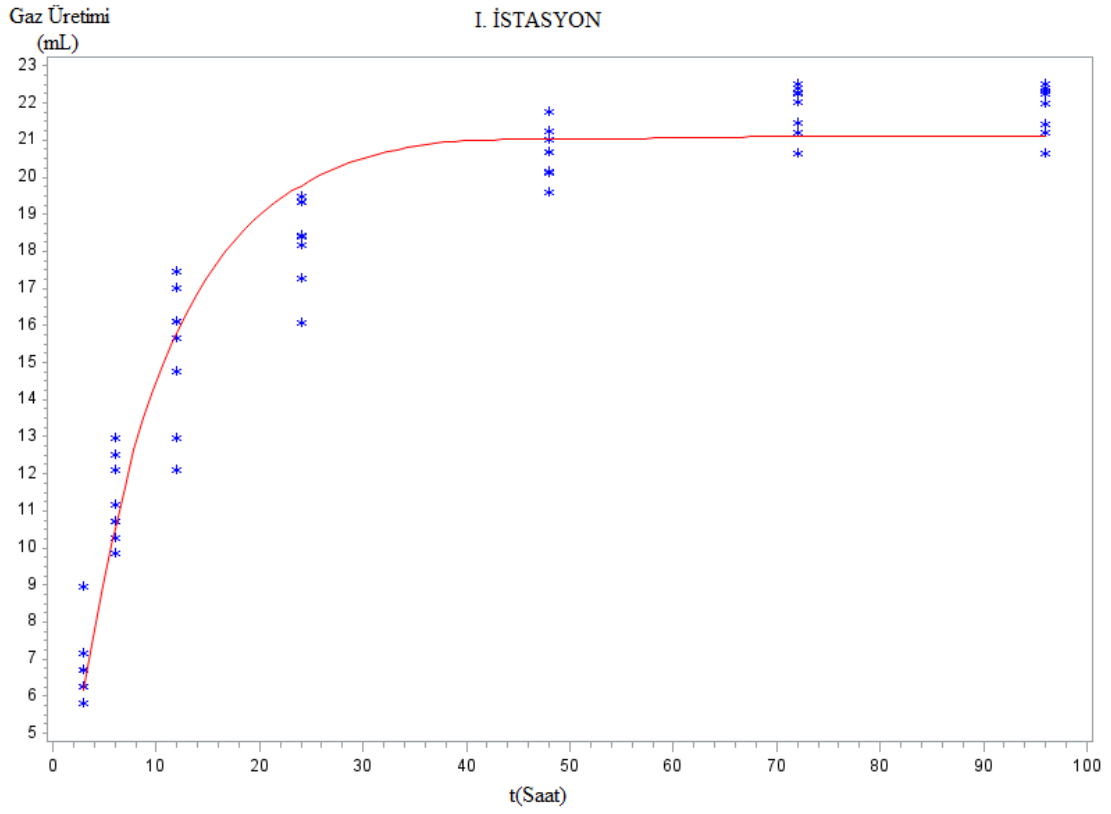
Üstel negative dağılım fonksiyonunu temel alan Ørskov ve McDonald (1979) modeli modifiye Mitscherlich $y= b(1-e^{-ct})$ eşitliği kullanılarak 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerinin herbirinde sekiz örneğin değerleri ile I., II. ve III. istasyonlardan toplanan *Juncus acutus*'un gaz üretim değişimleri sırasıyla Şekil 12, 13 ve 14' de gösterildi.

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 24 saatlik mL gaz üretim miktarından hesaplanan % SOMD, SOMD' den hesaplanan ME_{SOMD} , *in-vitro* gaz üretim tekniğinden hesaplanan $ME_{GÜ}$ ve Şekil 12, 13 ve 14'den hesaplanan potansiyel gaz üretimi (b), hız sabiti (c) ve toplam gaz hacmini yarısını üretmek için geçen zamanın ortalama değerleri Tablo 10' da verildi. % SOMD bakımından I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulundu ($P<0.05$). Sindirilebilir OM'nin 0.16 katsayısı ile çarpımından hesaplanan ME_{SOMD} değerleri bakımından da I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulundu ($P<0.05$). *In-vitro* gaz üretim kinetik parametrelerinin hesaplanmasında zamana bağlı olarak değişen üstel negatif dağılım fonksiyonu kullanılarak bulunan c değerleri bakımından I., II. ve III. İstasyonlar arasında istatistiksel farklılık bulundu ($P<0.05$). Potansiyel gaz üretimi olarak hesaplanan b değeri bakımından I. İstasyon ile II. ve III. İstasyonlar arasında fark saptanmadı ($P>0.05$). Bununla beraber II. ve III. istasyonlar arasında istatistiksel fark önemli bulundu ($P<0.05$). Toplam gaz hacmini yarısını üretmek için geçen zaman bakımından I., II. ve III. İstasyonlar arasında istatistiksel farklılık bulundu ($P<0.05$).

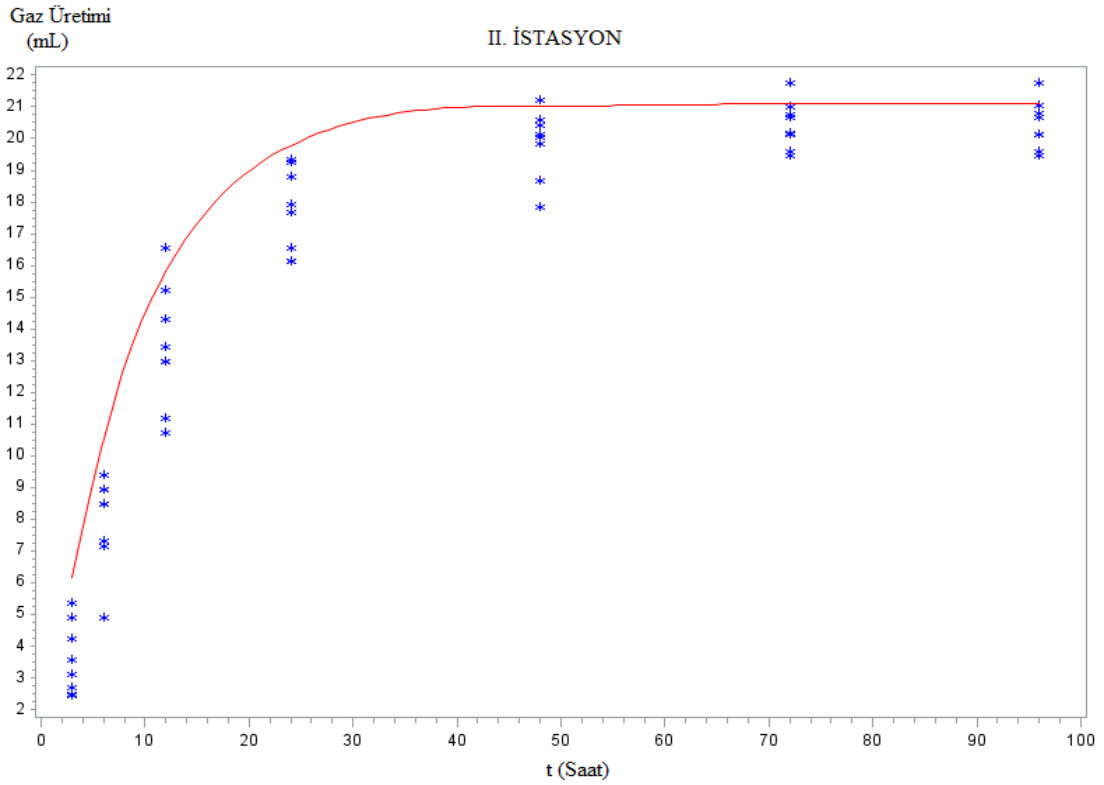
Tablo 10. *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre 24 saatlik *in-vitro* gaz üretim miktarlarından ($P_{psi}/1$ g KM, $G\ddot{U}_{mL}/200$ mg KM) hesaplanan % SOMD, ME_{SOMD} (MJ/kg KM), $ME_{G\ddot{U}}$ (MJ/kg KM) değerleri

<i>In-vitro</i> Gaz Üretim Parametreleri	I.İstasyon	II.İstasyon	III.İstasyon
	$\bar{X} \pm S_x$ (n=8)	$\bar{X} \pm S_x$ (n=8)	$\bar{X} \pm S_x$ (n=8)
P_{psi}	7.39±0.16a	7.15±0.19ab	6.79±0.14b
$G\ddot{U}_{mL}$	18.31±0.41a	17.73±0.47ab	16.87±0.39b
SOMD	42.64±0.02a	42.48±0.15b	42.54±0.14b
ME_{SOMD}	6.82±0.02a	6.79±0.02b	6.81±0.02b
$ME_{G\ddot{U}}$	5.26±0.05a	5.17±0.06ab	5.05±0.05b
(b)	21.1078±0.2606ab	20.4587±0.2700b	21.9427±0.4543a
(c)	0.0950±0.0053a	0.0832±0.0038b	0.0548±0.0031c
$T_{1/2}$	7.29±0.13c	8.33±0.16b	12.65±0.18a

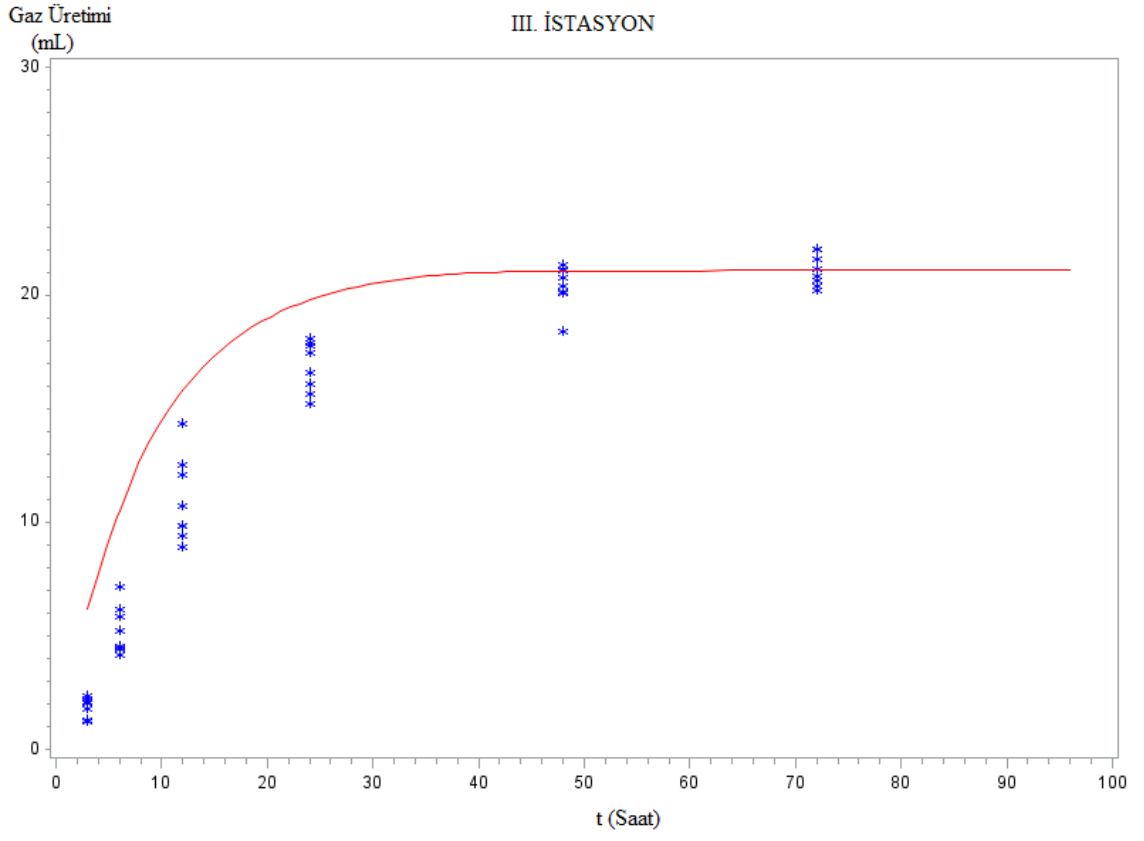
a, b, c Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). SOMD: Sindirilebilir organik madde, ME_{SOMD} : Sindirilebilir organik maddeden hesaplanan metabolik enerji, $ME_{G\ddot{U}}$: *In-vitro* gaz üretiminden hesaplanan metabolik enerji, (b): potansiyel gaz üretimi, (c): hız sabiti, $T_{1/2}$: Toplam gaz hacminin yarısını üretmek için geçen zaman (Saat)



Şekil 12. Birinci istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un inkübasyon zamanına göre gaz üretim değişimi

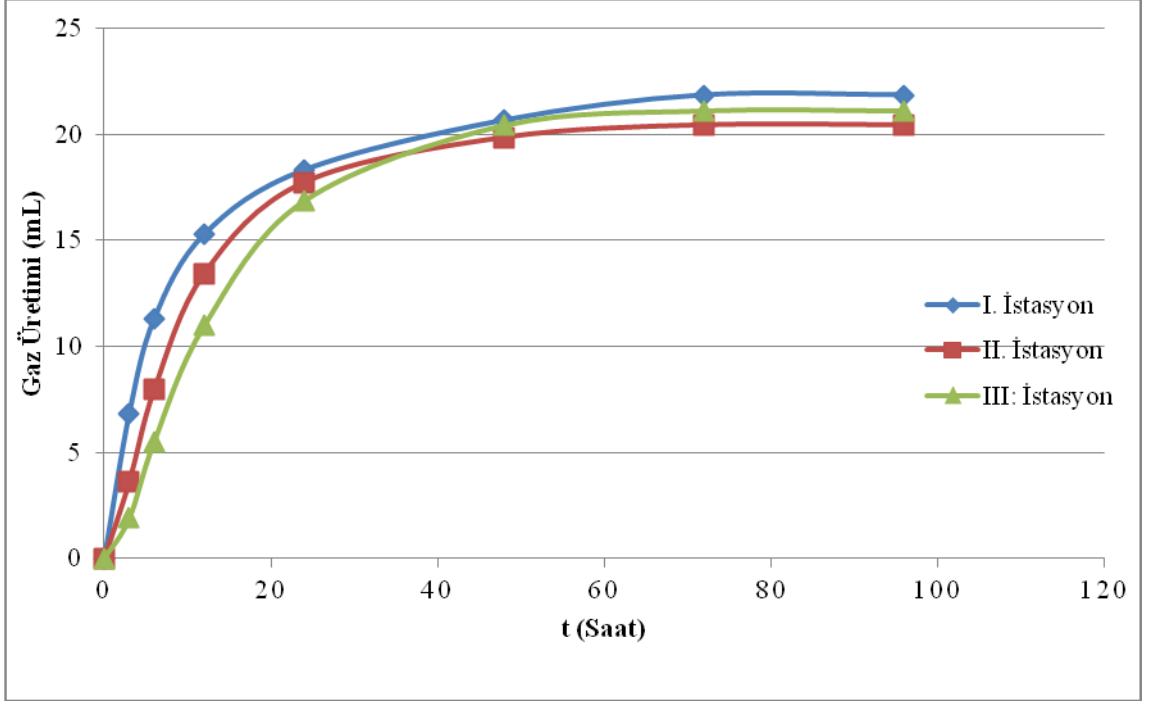


Şekil 13. İkinci istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un inkübasyon zamanına göre gaz üretim değişimi



Şekil 14. Üçüncü istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un inkübasyon zamanına göre gaz üretim değişimi

Ortalama *İn-vitro* gaz üretim miktarlarının (mL) inkübasyon süreleri ile değişimi Şekil 15’de gösterildi.



Şekil 15. *Juncus acutus*'un istasyonlara göre inkübasyon zamanına bağlı ortalama gaz üretim değişimi

4.3. Rumenin Predominant Selülitik Bakterileri *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*'in Real Time PCR ile Miktar Artışının Tespiti

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*'in real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerleri, C_T değerlerinden hesaplanan artış miktarları sırasıyla Tablo 11 ve Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 11. *Juncus acutus*'un istasyonlara göre 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen ortalama threshold (C_T) değerleri

İnkübasyon zamanı (Saat)	I.İstasyon C_{Tot} değerleri			II.İstasyon C_{Tot} değerleri			III.İstasyon C_{Tot} değerleri		
	FS	RF	RA	FS	RF	RA	FS	RF	RA
0	21.93	25.31	26.91	22.65	25.37	27.28	22.44	24.91	26.61
3	21.75	25.23	26.86	22.59	25.32	27.24	22.13	24.8	26.56
6	21.54	25.01	26.83	22.27	25.23	27.18	21.87	24.65	26.54
12	21.22	24.9	26.71	21.76	24.91	26.98	21.52	24.45	26.31
24	20.36	24.11	25.98	21.12	24.10	26.53	20.98	23.95	25.94
48	19.96	23.88	25.71	20.81	23.95	26.12	20.54	23.57	25.39
72	19.95	23.87	25.70	20.77	23.94	26.09	20.55	23.54	25.36
96	19.95	23.87	25.71	20.77	23.92	26.08	20.56	23.53	25.35

F. succinogenes (FS) bakımından değerlendirildiğinde üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 3 ve 6 saatlik inkübasyonunda III. İstasyon I. ve II. İstasyondan farklı bulundu. Onikinci, 24., 48.,72. ve 96. saatlerde I. İstasyon ile II. ve III. İstasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($P<0.05$).

R. flavefaciens (RF) bakımından değerlendirildiğinde üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un üç istasyonda da 3. ve 12. saatlerinde istatistiksel fark tespit edilmedi ($P>0.05$). 6 saatlik inkübasyonda II. İstasyon I. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulundu ($P<0.05$). Üç istasyon arasında 24 saatlik inkübasyonlar karşılaştırıldığında istasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($P<0.05$). 48., 72. ve 96. saatlerde III. İstasyon ile I. ve II. İstasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($P<0.05$).

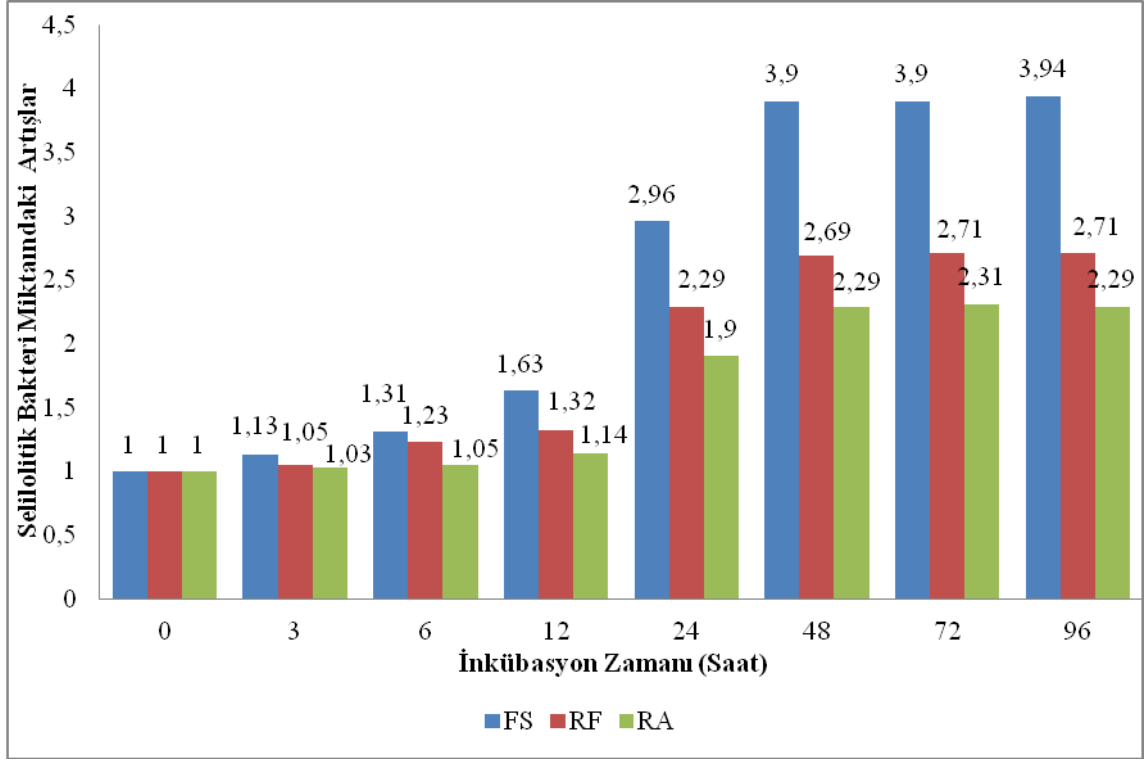
R. albus (RA) bakımından değerlendirildiğinde 24. saat dışında tüm istasyonlarda istatistiksel farklılıklar bulunmadı ($P>0.05$). Sadece 24. saatte I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulundu ($P<0.05$). 3, 6, 12, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlar arasında istatistiksel fark bulunmadı ($P>.05$). Sadece 24 saatlik inkübasyonda I. İstasyon II ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulundu ($P<0.05$).

Tablo 12. *Juncus acutus*'un istasyonlara göre 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki (t) inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R.albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan artış miktarları

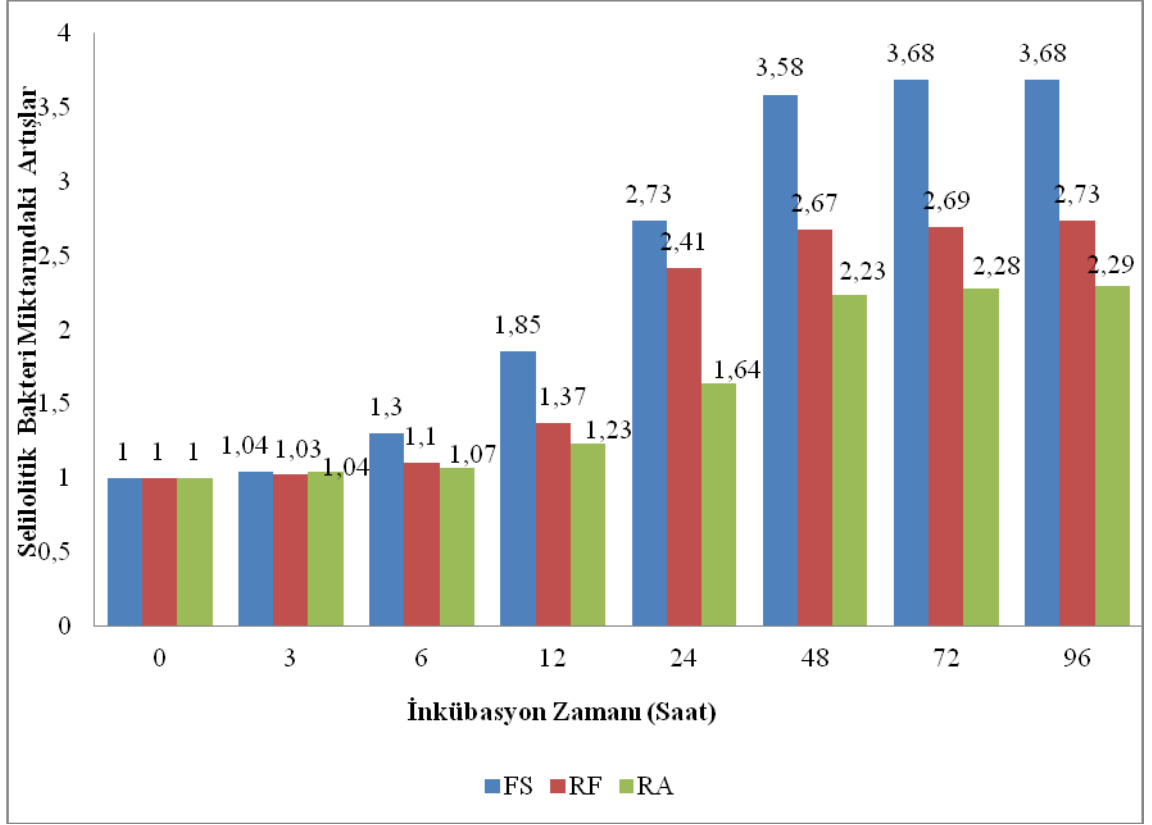
T	FS				RF				RA			
	I. İst	II İst	III. İst	SEM	I. İst	II İst	III. İst	SEM	I. İst	II İst	III. İst	SEM
0	1	1	1		1	1	1		1	1	1	
3	1.13 ^a	1.04 ^a	1.23 ^b	0.03	1.05	1.03	1.07	0.02	1.03	1.04	1.03	0.01
6	1.31 ^b	1.30 ^b	1.48 ^a	0.05	1.23 ^a	1.10 ^b	1.19 ^a	0.03	1.05	1.07	1.04	0.03
12	1.63 ^b	1.85 ^a	1.89 ^a	0.03	1.32	1.37	1.37	0.04	1.14	1.23	1.23	0.02
24	2.96 ^a	2.73 ^b	2.75 ^b	0.06	2.29 ^b	2.41 ^a	1.94 ^c	0.05	1.90 ^a	1.64 ^b	1.59 ^b	0.04
48	3.90 ^a	3.58 ^b	3.70 ^b	0.05	2.69 ^a	2.67 ^a	2.53 ^b	0.03	2.29	2.23	2.32	0.05
72	3.90 ^a	3.68 ^b	3.70 ^b	0.08	2.71 ^a	2.69 ^a	2.58 ^b	0.04	2.31	2.28	2.37	0.04
96	3.94 ^a	3.68 ^b	2.68 ^b	0.06	2.71 ^a	2.73 ^a	2.60 ^b	0.04	2.29	2.29	2.39	0.03

^{a, b, c} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). SEM: Standart hata. İst: İstasyon

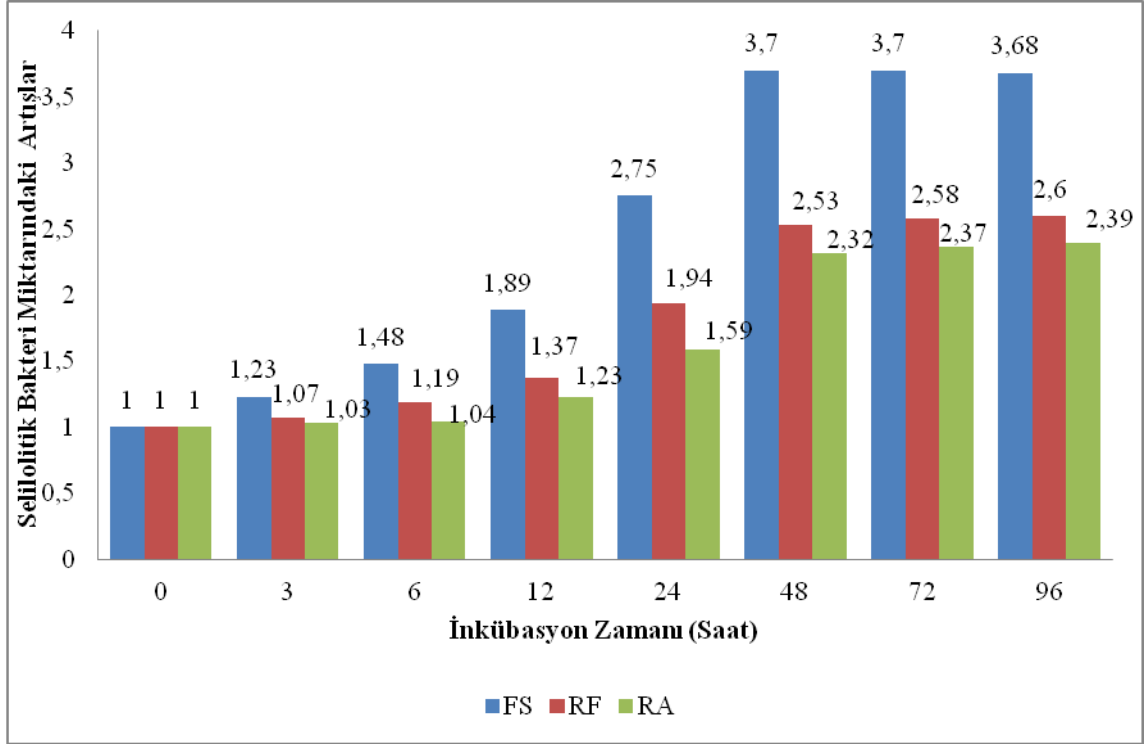
I., II. ve III. İstasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama artış miktarlarının değişimi sırasıyla Şekil 16, 17 ve 18'de gösterildi. Şekillerde görülüşü gibi *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA) zamanla artış göstermiştir.



Şekil 16. Birinci istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama artış miktarları



Şekil 17. İkinci istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama artış miktarları



Şekil 18. Üçüncü istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından elde edilen rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama artış miktarları

5. TARTIŞMA

5.1. *Juncus acutus*'un Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

Bir sulak alan bitkisi olan *Juncus acutus* ruminant hayvanlar için kaba yem kaynağı olarak kullanılmak üzere değerlendirilmiştir. Tablo 8'de görüldüğü gibi Kızılırmak Deltasında üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus* bitkisinin istasyonlara göre kimyasal bileşimleri arasında % HP ve % ADL dışında önemli farklılıklar saptanmamıştır ($P>0.05$).

Juncus acutus'un KM içeriği % 97.68-97.99 arasında değişmiştir. İstasyonlar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($P>0.05$). Bu değerler Kamalak (2005)'in buğday samanı ve arpa samanı, Güngör ve ark. (2008)'nin nohut samanı ve macar fiği, Sarnklong ve ark. (2010)'nin pirinç samanı, Kalkan ve Filya (2011)'nin buğday samanı, Kafilzadeh ve ark. (2012)'nin buğday samanı, Avcı ve ark. (2012)'nin geven otu, Kafilzadeh ve ark. (2012) yulaf samanı, Akçil ve Denek (2013)'in buğday samanı, çayır kuru otu, yonca kuru otu ve okaliptus yaprağı ile yaptığı çalışmalardan elde edilmiş KM değerine benzer bulunmuştur. Tarla sarmaşığı, top akasya, gülübricim, yalancı akasya (Canbolat, 2012b; 2012d), dut yaprağı (Güven, 2012), mısır silajı (Akçil ve Denek, 2013), antep fıstığı kabuğu (Boğa ve ark., 2013) ile karşılaştırıldığında ise KM' si daha yüksek tespit edilmiştir.

Juncus acutus'un HP içeriği % 9.77-10.03 arasında bulunmuş ve istasyonlar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($P<0.05$). *Juncus acutus*'un ham protein içeriği kenaf bitkisi (% 9.48) (Canbolat ve Sincik, 2007), macar fiği kuru otu (% 12.85), üzüm cibresi (% 12.15), kötü kaliteli yonca kuru otu (% 12.11) (Güngör ve ark., 2008), geven otu (% 9.90) (Avcı ve ark., 2012), okaliptus yaprağı (% 12.65) (Akçil ve Denek, 2013), elma ağacı yaprağı (% 10.80) (Nahand ve ark., 2010), yer elması kabuğu (% 11.14) (Akinfemi ve ark., 2009)'na benzer bulunmuştur. Nohut samanı (% 5.89), buğday samanı (% 3.63), arpa samanı (% 4.22), kuru mısır hasılı (% 3.83), mısır silajı (% 5.61) (Kamalak, 2005; Güngör ve ark., 2008), antep fıstığı kabuğu (% 7.27) (Boğa ve ark., 2013), mısır koçanı (% 3.89), kasava kabuğu (% 5.25), portakal posası (% 7.53), darı (% 7.26) (Akinfemi ve ark., 2009), çayır kuru otu (% 6.69) (Akçil ve Denek, 2013) *Juncus acutus* (% 7.1) (El Shear, 2010) ile karşılaştırıldığında ise HP bakımından

daha zengin bulunmuştur. İyi kaliteli yonca kuru otu (% 18.25), fiğ kuru otu (% 20.79), bezelye kuru otu (% 17.84), kolza kuru otu (% 16.82), gazal boynuzu kuru otu (% 18.56) (Canbolat ve ark., 2013b), domates posası (% 22.17), bira üretiminde kullanılan arpa (% 19.80) (Aghajanzadeh-Golshani ve ark., 2010; Mirzaei-Aghsaghali ve ark., 2011) ve tarla sarmaşığı (% 23.83) (Canbolat, 2012b) ile karşılaştırıldığında ise HP bakımından daha değersiz bulunmuştur. *Juncus acutus* HP yönünden kaliteli kaba yemlerin değerine yakın olması nedeniyle iyi bir kaba yem kaynağı olabilir.

Juncus acutus'un HY içeriğı % 1.46-1.48 arasında bulunmuş ve istasyonlar arasında farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Macar fiğ kuru otu (% 0.94), nohut samanı (% 1.35) (Güngör ve ark., 2008), geven otu (% 1.20) (Avcı ve ark., 2012) ile karşılaştırıldığında HY bakımından daha zengin olduğu, korunga (% 5.7), tarla sarmaşığı (% 4.92) (Canbolat, 2012a; 2012b), elma ağacı yaprağı (% 9.0) (Nahand ve ark., 2010)' na göre fakir ve kötü kaliteli yonca kuru otuna (% 1.47) benzer olduğu tespit edilmiştir (Güngör ve ark., 2008).

Juncus acutus'un HK içeriğı % 4.02-4.21 arasında bulunmuş ve istasyonlar arası istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Top akasya (% 13.00), gülbrişim (% 11.03), gladiçya (% 11.83), tarla sarmaşığı (% 7.97) (Canbolat, 2012a; 2012b), dut yaprağı (% 15.40-22.36) (Güven ve ark., 2012), antep fıstığı kabuğı (% 5.5-19.86) (Boğa ve ark., 2013), buğday samanı (% 6.37) ve nohut samanı (% 7.48), mısır silajı (% 8.10), iyi (% 8.74) ve kötü kaliteli yonca kuru otu (% 10.57) (Güngör ve ark., 2008) ile karşılaştırıldığında HK bakımından fakir olduğu, kolza samanı (% 3.87) (Canbolat, 2013a)'na ise benzer olduğu bulunmuştur. Ham kül içeriğı yönünden kaba yem olarak kullanılabileceğı ortaya konmuştur.

Juncus acutus'un hücre duvar bileşenlerinden olan NDF, ADF sırasıyla % 73.66-73.70 ve % 46.08-46.58 arasında değıştiğı bulunmuş ve tüm bu değerler bakımından istasyonlar arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). *Juncus acutus*'un NDF ve ADF içerikleri sırasıyla çayır kuru otu (% 70.46, % 40.97) , buğday samanı (% 79.05, % 51.01), arpa samanı (% 72.73, % 54.33) (Kamalak 2005; Akçil ve Denek., 2013), pirinç samanı (% 70.03, % 39.83) (Sarnklong ve ark., 2010), darı (% 70.28, % 48.62) ve kasava kabuğı (% 68.48, % 47.41) (Akinfemi ve ark., 2009)'na benzer; kolza samanından (% 77.16, % 56.75) (Canbolat, 2013a) düşük bulunurken;

Juncus acutus'un % NDF ve ADF içerikleri sırasıyla yonca kuru otu (% 40.44, % 26.60), fiğ kuru otu (% 41.51, % 27.57), bezelye kuru otu (% 46.0, % 27.89) (Canbolat ve ark., 2013b), tarla sarmaşığı (% 34.0-54.04, % 28.76-40.34), korunga (% 50, % 34.8) (Canbolat, 2012a; 2012b), kuru domates posası (% 50.6, % 34.5) (Mirzaei Aghsaghali ve ark., 2011), dut yaprağı (% 19.38-33.33, % 17.33-26.06) (Güven, 2012), okaliptus yaprağı (% 39.64, % 30.17) (Akçil ve Denek, 2013), antep fıstığı kabuğı (% 18.25-22.49, % 14.32-18.29) (Boğa ve ark., 2013) ile kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur. BRR129, Neijeishail, BINA5, Pajam, Kablabadam ve BR 11 pirinç çeşitleri samanlarının NDF değerleri sırasıyla % 72.53, 72.16, 74.29, 74.95, 74.86 ve 77.57, ADF değerleri sırasıyla % 41.38, 43.62, 42.83, 44.22, 46.32 ve 43.64 bulunmuş, bu değerler *Juncus acutus*'un değerleri ile çok yakın benzerlik göstermektedir (Rahman ve ark.,2010). *Juncus acutus*'un hücre duvar bileşenlerinden olan ADL % 12.01-12.27 arasında değiştiğı bulunmuş ve istasyonlar arasında istatistiksel fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). *Juncus acutus* ADL içeriğı bakımından diğerkaba yemlerle kıyaslandığında buğday samanına (% 12.16) (Kalkan ve Filya, 2011) benzer, mısır hasılı (% 6.3), sorgum hasılı (% 6.9), buğday hasılı (% 6.3), arpa hasılı (% 7.9), iyi (% 8.26) ve kötü (% 9.92) kaliteli yonca kuru otundan yüksek (Güngör ve ark., 2008; Canbolat 2012d), mısır koçanı (% 16.83), yerelması kabuğı (% 15.89) (Akinfemi ve ark., 2009), üzüm cibresinden (% 34.46) (Güngör ve ark., 2008) düşük bulunmuştur.

Bir kaba yemin toplam NDF içeriğı, kaba yemin genel kalitesini ve sindirilebilirliğini ortaya koyan bir göstergedir. Yüzde 40 NDF değeri olan bir kaba yem, % 70 NDF değeri olan kaba yemden daha kolay sindirilebilir niteliktedir. Bu nedenle yemlerde NDF, ADF ve ADL miktarının düşük olması istenir. *Juncus acutus*'un hücre duvar bileşenleri bakımından (% 73 NDF, % 46 ADF ve % 12 ADL) zengin olduğı yapılan kimyasal analizlerle görülmüştür. Bu değerleri dikkate alarak *Juncus acutus*'u kaba yemlerle karşılaştırdığımızda özellikle buğday samanına ve çayır kuru otuna benzer profile sahip olduğı ve bu özellikleriyle alternatif bir kaba yem kaynağı olabileceğı söylenebilir.

Juncus acutus'un kimyasal kompozisyonuna dayalı ME değeri (8.55-8.61 MJ/kg KM) arasında hesaplanmıştır. Üç istasyondan toplanan *Juncus acutus* örneklerinin ADF kullanılarak hesaplanan ME değerleri arasında farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

Juncus acutus'un ME_{ADF}' si kuru mısır hasılı (7.67), nohut samanı (9.42), buğday samanı (7.26), üzüm cibresi (7.66), mısır silajı (8.42-11.05), iyi (10.80) ve kötü kaliteli yonca kuru otuna (10.07) (Güngör ve ark., 2008; Özkul ve ark., 2005) benzer bulunmuştur.

5.2. *Juncus acutus*'un *In-vitro* Gaz Üretim Metodu ile Gaz Üretim Belirlenmesi

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki gaz üretim miktarları ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile basınç P_{psi} değeri üzerinden kaydedilen ve materyal metotdaki formüller kullanılarak mL cinsinden hesaplanan ortalama değerleri Tablo 9' da, GÜ_{mL} değerlerinin inkübasyon zamanına bağlı gaz üretim miktarının değişimi Şekil 12, 13 ve 14' de gösterilmiştir. Tablo 9 incelendiğinde 24 ve 48 saatlik (P_{psi}) ve (GÜ_{mL}) bakımından bazı istasyonlar arasında istatistiksel farklılıklar tespit edilmiştir. Bu saatlerde gözlemlenen istasyonlar arası gaz üretim miktarlarındaki farklılıkların, ihtiva ettikleri ADL miktarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Çünkü yemlerin hücre duvarı bileşenleri ile gaz üretimi arasında mikrobiyal aktivitedeki azalmaya bağlı olarak ters ilişki olduğu ve bunun yanında yemdeki NDF oranının artması ile gaz üretiminin de arttığı (Mertens ve ark., 1997) bildirilmiştir. Benzer şekilde yemlerin NDF miktarı yanında sindirilebilirliğinin de gaz üretim miktarını doğrusal olarak etkilediği (Pell ve ark., 1997) gösterilmiştir. Bununla birlikte yemlerin NDF içeriklerinin artmasıyla gaz üretim miktarlarının da artacağı ya da azalacağını söylemek her zaman mümkün değildir (Kılıç, 2005; Kılıç ve Boğa, 2009). *Juncus acutus*'un ADL miktarı % 12.01-12.27, 24 saatlik gaz üretim miktarı ise 16,87-18,31 mL arasında bulunmuştur. Benzer şekilde ADL miktarı % 12.16 olan buğday samanında 24 saatlik *in-vitro* gaz üretim miktarı 14,92 mL olarak bulunmuştur (Kalkan ve Filya, 2011).

Yemlerin besin maddeleri içeriklerindeki farklılıklar *in-vitro* gaz üretimini, gaz üretim parametrelerini, bunlardan hesaplanan enerji değerlerini ve % SOMD değerlerini önemli ölçüde etkilemektedir.

Gaz üretiminden hesaplanan ME_{GÜ} değeri bakımından II. İstasyon ile I. ve III. İstasyonlar arasında fark bulunmazken (P>0.05), I. ve III. İstasyonlar istatistiksel olarak

birbirinden farklı bulunmuştur ($P<0.05$). Tablo 10 incelendiğinde özellikle I. İstasyonun $ME_{GÜ}$ değeri diğer istasyonlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni olarak $ME_{GÜ}$ değerinin hesaplanmasında kullanılan HP değerinin istasyonlar arasında farklı bulunmasından kaynaklandığı (Tablo 8), bununla beraber $GÜ$ değeri de $ME_{GÜ}$ 'nin hesaplanmasında kullanılan bir parametre olduğu için $GÜ$ den de etkilenebileceği söylenebilir. *Juncus acutus* gaz üretiminden hesaplanan $ME_{GÜ}$ değerleri bakımından diğer kaba yemler ile karşılaştırıldığında arpa samanı (7.15 MJ/kg KM), buğday samanı (7.04 MJ/kg KM), (Kamalak, 2005), mısır koçanı (6,63 MJ/kg KM), darı (7.56 MJ/kg KM) (Akinfemi ve ark., 2009), buğday samanı (4.35 MJ/kg KM) ile benzer bulunmuştur (Kalkan ve Filya, 2011). BRRI29, Neijeishail, BINA5, Pajam, Kablabadam ve BR 11 pirinç çeşitleri samanlarının gaz üretim sistemi ile hesaplanan ME MJ/kg KM değerleri sırasıyla 6.68, 5.99, 5.97, 5.73, 5.65 ve 5.61 bulunmuş, bu değerler *Juncus acutus*'un değerleri ile çok yakın benzerlik göstermektedir (Rahman ve ark.,2010). Bunun yanında *Juncus acutus*'un gaz üretiminden hesaplanan $ME_{GÜ}$ değeri kolza otunun $ME_{GÜ}$ değeri (12.02 MJ/kg KM) (Canbolat, 2013), ve antep fıstığı kabuğu (9.76-11.05 MJ/kg KM) $ME_{GÜ}$ değerinden (Boğa ve ark., 2013) düşük bulunmuştur.

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 24 saatlik mL gaz üretim miktarından hesaplanan % SOMD, SOMD den hesaplanan ME_{SOMD} , *in-vitro* gaz üretim tekniğinden hesaplanan $ME_{GÜ}$ ve Şekil 12, 13 ve 14'den hesaplanan potansiyel gaz üretimi (b) ve hız sabiti (c) ortalama değerlerinin verilmiş olduğu Tablo 10 incelendiğinde % SOMD bakımından I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P<0.05$). % SOMD bakımından istasyonlar arasındaki bu fark gaz üretimiyle ilişkilendirilebilir. *Juncus acutus*'un özellikle I. İstasyondaki HP ve gaz üretiminin diğer istasyonlara göre daha yüksek olması % SOMD'ni artırmıştır. Bununla birlikte hücre duvarı bileşenlerinin NDF, ADF ve ADL değerlerinin yüksek olması mikrobiyal fermentasyonu baskılayarak % SOMD'ni düşürdüğü de söylenebilir. *Juncus acutus* sahip olduğu % 42.48-42.64 arasındaki % SOMD değeriyle buğday samanı (% 46.76) ve arpa samanındaki (% 46. 21) % SOMD'ne benzer bulunmuştur (Kamalak, 2005). BRRI29, Neijeishail, BINA5, Pajam, Kablabadam ve BR 11 pirinç çeşitleri samanlarının gaz üretim sistemi ile hesaplanan % SOMD değerleri sırasıyla % 44.58, 39.94, 39.87, 38.30, 37,67 ve 33.53 bulunmuş, bu değerler *Juncus acutus*'un % SOMD değerleri ile çok yakın benzerlik göstermektedir (Rahman ve ark., 2010).

Akinfemi ve ark. (2009) tarafından *in-vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak yapılan çalışmada mısır koçanı ve darının % SOMD değerleri sırasıyla % 48.32 ve % 50.20 bulunmuş olup bu değerler *Juncus acutus*'un % SOMD değerleri ile benzerlik göstermektedir. Bunu yanında *Juncus acutus*'un yonca kuru otu (% 73.91), fiğ kuru otu (% 78.29) ve kolza kuru otu (% 71.77) gibi bazı baklagil kaba yemlerinin % SOMD değerleri ile karşılaştırıldığında ise düşük olduğu görülmektedir (Canbolat ve ark., 2013). Sindirilebilir OM'nin 0.16 katsayısı ile çarpımından hesaplanan ME_{SOMD} değerleri bakımından da I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P<0.05$).

Zamana bağlı gaz üretim değerleri bakımından istasyonlar arasında farklılıklar bulunduğu için bu değerlerden hesaplanan gaz üretim kinetikleri (b ve c) ve c değerleri kullanılarak hesaplanan $T_{1/2}$ değerleri istasyonlar arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). Potansiyel gaz üretimi olarak hesaplanan b değeri bakımından istasyonlar karşılaştırıldığında; I. İstasyon ile II. ve III. İstasyonlar arasında fark gözlenmezken ($P>0.05$), II. ve III. istasyonlar arasında istatistiksel farkın önemli olduğu görülmüştür ($P<0.05$). *In-vitro* gaz üretim kinetik parametrelerinin hesaplanmasında zamana bağlı olarak değişen üstel negative dağılım fonksiyonu kullanılarak bulunan c değerleri bakımından istasyonlar arası istatistiksel farklılık gözlenmiştir ($P<0.05$). C parametresi kullanılarak hesaplanan $T_{1/2}$ değeri bakımından da istasyonlar arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). Gaz üretim kinetikleri b ve c değerlerindeki istasyonlar arası bu farklılıkların başlıca hücre duvarı bileşeni olan ADL'den ve HP miktarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği söylenebilir. Bunun yanında yemin yapısındaki ikincil metabolitlerin varlığında potansiyel gaz üretimi dolayısıyla b ve c değerleri etkilenebilir. Bu projede gaz üretiminin tespitinde ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi kullanılmış ve gaz üretim miktarları basınç üzerinden kaydedilip, çevirme faktörleri kullanılarak mL olarak ifade edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi kullanılarak ME ve SOMD değerlerini hesaplama eşitliklerine ve gaz üretim kinetik parametreleri değerlerine rastlanmamıştır. Bu nedenle *Juncus acutus*'un gaz üretim değerleri ve bunlardan hesaplanan parametrelerin karşılaştırılmasında şırınga yöntemi kullanılarak kaba yemlerle yapılan gaz üretim bulguları kullanılmıştır. *Juncus acutus*'un b ve c değerleri (Tablo 8, Şekil 12, 13, 14, 15) Türkiye'deki bazı egzotik ağaç yapraklarınınkinden (top akasya, gülibrişim,

gladiçya ve yalancı akasya), potansiyel gaz üretimi (71.77-61.59 mL), bakımından düşük bulunurken *Juncus acutus* ve egzotik ağaç yapraklarının sırasıyla c değerleri bakımından benzer olduğu (0.054-0.095; 0.068-0.083) görülmüştür (Canbolat, 2012c). Tarla sarmaşığı ile karşılaştırıldığında ise aynı şekilde potansiyel gaz üretimi (61.59-71.77 mL) düşük, c değeri (0.079-0.099) ise benzer bulunmuştur (Canbolat, 2012b). *Juncus acutus*'un *in-vitro* gaz üretim kinetikleri kuru domates posasının kinetikleri ile karşılaştırıldığında b değerinin (52.90) düşük c değerinin (0.081) ise benzer olduğu görülmüştür (Mirzaei-Aghsaghali ve ark., 2011). *Juncus acutus*'un Ørskov ve McDonald (1979) modelinden hesaplanan $T_{1/2}$ değerleri üç istasyon için 7.29-12.65 saat aralığında olup üçgül kuru otu (7.20 saat), yulaf samanı (8.51 saat) ve buğday samanı (15.53 saat)'na benzer bulunmuştur.

5.3. Rumenin Predominant Selülitik Bakterileri *F. succinogenes*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*'in Real Time PCR ile Miktar Artışının Tespiti

I., II. ve III. İstasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından alınan rumen sıvılarındaki *F. succinogenes* (FS), *R. flavefaciens* (RF) ve *R. albus* (RA)'un real time PCR ile tespit edilen threshold (C_T) değerlerinden hesaplanan ortalama artış miktarlarının değişimi sırasıyla Şekil 16, 17 ve 18'de gösterilmiştir. *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un miktarlarında zamanla artış tespit edilmiştir (Şekil 16, 17 ve 18). *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un, *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından alınan rumen sıvılarındaki bulunabilirlik düzeyleri ve artış miktarları değerlendirildiğinde *F. succinogenes* > *R. flavefaciens* > *R. albus* şeklinde sıralandığı görülmüştür. Bu sıralama literatür bulgularıyla uyum içerisindedir (Shi ve ark., 1997). Rumenin üç predominant bakterisi *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'dur. Bu bakterilerden özellikle *R. flavefaciens* ve *F. succinogenes* selüloz sindirimi için rekabet halindedirler. Sellobiyozdan zengin yemlerde *R. flavefaciens* daha hızlı çoğalabildiği ve yapışabilirliğinin % 100 olmasından dolayı rumen sıvısındaki miktarı *F. succinogenes*'den daha fazla bildirilmekle birlikte diğer selülitik bakteriler tarafından üretilen bileşiklerle inhibe edilemediği, yem partiküllerinin pek çok çeşidine yapışma yeteneğine sahip olduğu ve polisakkaritleri enerji rezervi olarak depolama

özelliği bulunduğu için mikroflorada en baskın olan tür *F. succinogenes*'dir (Shi ve ark., 1997).

Sung ve ark. (2007) tarafından pirinç samanı ile yapılan *in-vitro* çalışma sonrası alınan rumen sıvısında bu üç predominant bakterinin bulunabilirliğinin *F. succinogenes* > *R. flavefaciens* > *R. albus* şeklinde sıralandığı bildirilmiştir. Yüzde 100 kaba yemle (üre muameleli pirinç samanı) beslemenin selüloolitik bakteriler üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada [(*F. succinogenes* 3.54x10⁹ kopya/mL), (*R. flavefaciens* 7.38x10⁷ kopya/mL) ve (*R. albus* 5.80x10⁶ kopya/mL)] özellikle de *F. succinogenes* popülasyonunun arttığı gözlenmiştir (Cherdthong ve ark., 2010). Yüzde 4 üre ve üre-mermer tozu muamelesiz/muameleli pirinç samanı ile beslemenin rumen ekolojisi, rumen selüloolitik mikroorganizmalarının miktarını [*R. albus* (3.8-31.7x10⁹) *R. flavefaciens* (0.2-13.9x10¹⁰), *F. succinogenes* (4.8-12.7x10¹¹)] arttırdığı bildirilmiştir (Vinh ve ark., 2011). Pirinç samanına Leuceaena yaprak peletlerinin (LLP) eklenmesinin *R. albus* (1.1-9.0x10⁶ kopya/mL), *F. succinogenes* (0.9-3.2x10⁹ kopya/mL), ve *R. flavefaciens* (0.8-1.5x10⁹ kopya/mL) popülasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Hung ve Wanapat, 2013).

F. succinogenes I. İstasyonda II ve III. İstasyonlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın kaynağının ham protein miktarının I. istasyonda diğer istasyonlara oranla yüksek olması olduğu söylenebilir. Rumende mikrobiyal faaliyetlerin optimum olarak gerçekleşmesi için yemlerde en az % 10 HP bulunmalıdır (Norton, 2003). Yüksek seviyeli protein kaynağının kullanımının *F. succinogens* popülasyonunda % 21 artışa neden olduğu bildirilmiştir (Goel ve ark., 2007). Kuru ot ile beslenen koyunlarda *F. succinogenes* (0.066), *R. flavefaciens* (0.013) yonca kuru otu ile beslenen koyunlarınkinden (0.064, 0.012 ve 0.038) daha yüksek bulunmuştur. Ancak *R. albus*'un kaba yem tipinden etkilenmediği bildirilmiştir (Saro ve ark., 2014). Kaba/konsantre yem oranlarındaki azalmaya bağlı olarak, *F. succinogenes* (5.1-0.8x10⁷ kopya/mL), *R. flavefaciens* (5.9-0.8x10⁶ kopya/mL) ve *R. albus* (5.1-0.5x10⁶ kopya/mL) popülasyonunda azalma tespit edilmiştir (Polyorach ve ark., 2014).

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile hesaplanan gaz üretim miktarları ve zamana bağlı olarak artışı, aynı saatlerde rumen sıvısındaki *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un miktarlarındaki artışla uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Juncus acutus'un üç istasyona göre minimum ve maksimum ham besin madde miktarları KM (% 97.68-97.99) OM (% 93.57-93.89), HK (% 4.02-4.21), HP (% 9.77-10.03), HY (% 1.46-1.48), NDF (% 73.76-73.70), ADF (% 46.08-46.58), ADL (% 12.01-12.27) ve ME (8.55-8.61 MJ/kg KM) arasında bulunmuştur. *Juncus acutus*'un kimyasal bileşenleri % HP ve % ADL değerleri hariç istasyonlar arasında önemli farklılık tespit edilmemiştir. % HP içeriği açısından I. İstasyonla II. ve III. İstasyon arasındaki farklılık ve % ADL değerleri bakımından üç istasyon arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu değerleri dikkate alarak *Juncus acutus*'u kaba yemlerle karşılaştırdığımızda özellikle buğday samanına ve çayır kuru otuna benzer profile sahip olduğu ve bu özellikleriyle alternatif bir kaba yem kaynağı olabileceği söylenebilir.

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki gaz üretim miktarları ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile basınç P_{psi} değeri üzerinden kaydedilen ve materyal metotdaki formüller kullanılarak mL cinsinden hesaplanan ortalama gaz üretim değerlerinde 24 ve 48 saatlik P_{psi} ve $GÜ_{mL}$ bakımından bazı istasyonlar arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu saatlerde gözlemlenen istasyonlar arası gaz üretim miktarlarındaki farklılıkların, ihtiva ettikleri ADL miktarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Gaz üretiminden hesaplanan $ME_{GÜ}$ değeri bakımından II. İstasyon ile I. ve III. İstasyonlar arasında fark bulunmazken I. ve III. İstasyonlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Özellikle I. İstasyonun $ME_{GÜ}$ değeri diğer istasyonlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni olarak $ME_{GÜ}$ değerinin hesaplanmasında kullanılan HP değerinin istasyonlar arasında farklı bulunmasından kaynaklandığı, bununla beraber $GÜ$ değeri de $ME_{GÜ}$ 'nin hesaplanmasında kullanılan bir parametre olduğu için $GÜ$ 'den de etkilenebileceği söylenebilir. *Juncus acutus* gaz üretiminden hesaplanan $ME_{GÜ}$ değerleri bakımından diğer kaba yemler ile karşılaştırıldığında arpa samanı, buğday samanı ve pirinç samanına benzer bulunmuştur. Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 24 saatlik mL gaz üretim miktarından hesaplanan % SOMD bakımından I. İstasyon II. ve III. İstasyonlardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. % SOMD bakımından istasyonlar arasındaki bu fark gaz üretimiyle ilişkilendirilebilir. *Juncus acutus*'un

özellikle I. İstasyondaki HP ve gaz üretiminin diğer istasyonlara göre daha yüksek olması % SOMD'ni artırmıştır. Bununla birlikte hücre duvarı bileşenleri NDF, ADF ve ADL' nin yüksek olması mikrobiyal fermentasyonu baskılayarak % SOMD'ni düşürdüğü de söylenebilir. *Juncus acutus* sahip olduğu % 42.48-42.64 arasındaki % SOMD değeriyle buğday samanı % 46.76, arpa samanındaki % 46. 21 % SOMD'ne benzer bulunmuştur. Sindirilebilir OM'nin 0.16 katsayısı ile çarpımından hesaplanan ME_{SOMD} değerleri bakımından da I. İstasyon II. ve III. İstasyondan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05).

Kimyasal analiz (8.55-8.65 MJ/kg KM), SOMD (6.78-6.82 MJ/kg KM) ve gaz üretimi (5.05-5.26 MJ/kg KM)'den hesaplanan ME değerleri karşılaştırıldığında en yüksek ME değeri kimyasal analizle, en düşük ME değeri ise gaz üretiminden bulunmuştur. Hayvan ile ilgili parametreleri içerdiğinden SOMD' den hesaplanan ME_{SOMD} daha güvenilir olabilir.

Zamana bağlı gaz üretim değerleri bakımından istasyonlar arasında farklılıklar bulunduğu için bu değerlerden hesaplanan gaz üretim kinetikleri (b ve c) ve c parametresi kullanılarak hesaplanan T_{1/2} değeri de farklı bulunmuştur. Potansiyel gaz üretimi olarak hesaplanan b değeri bakımından istasyonlar karşılaştırıldığında; I. İstasyon ile II. ve III. İstasyonlar arasında fark gözlenmezken II. ve III. istasyonlar arasında istatistiksel farkın önemli olduğu görülmüştür. C değerinin kullanılarak hesaplandığı toplam gaz hacmini yarısını üretmek için geçen zaman üç istasyonda da istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Gaz üretim kinetikleri b, c ve T_{1/2} değerlerindeki istasyonlar arası bu farklılıkların başlıca hücre duvarı bileşeni olan ADL'den ve HP miktarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği söylenebilir.

F. succinogenes, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'un, *Juncus acutus*'un 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerdeki inkübasyonlarından alınan rumen sıvılarındaki bulunabilirlik düzeyleri ve artış miktarları değerlendirildiğinde *F. succinogenes*>*R. flavefaciens*>*R. albus* şeklinde sıralandığı görülmüştür. Bu sıralama literatür bulgularıyla uyum içerisindedir.

Üç farklı istasyondan toplanan *Juncus acutus*'un 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ANKOM^{RF} gaz üretim sistemi ile hesaplanan gaz üretim miktarları ve zamana

bağlı olarak artışı, aynı saatlerde rumen sıvısındaki *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* ve *R. albus* 'un miktarlarındaki artışla uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak *Juncus acutus* 'un % HP değeri tahıl samanlarından yüksek, düşük kaliteli kuru yonca ve kuru çayır otuna yakın bulundu. Rumen selülitik bakterileri FS, RF ve RA'nın miktarlarında artışa neden olan *Juncus acutus* 'un % SOMD, ME_{GÜ} ve ME_{SOMD} değerleri açısından tahıl samanlarına, % HP yönünden ise orta kaliteli kaba yemlere alternatif bir kaba yem kaynağı olabileceği belirlenmiştir.

Türkiye'de 23 sulak alandan ortalama 85.537 ton *Juncus acutus* üretme potansiyeli vardır. İki bin dört yılı itibarı ile bir saman balyası 12 TL'den satılmaktadır. *Juncus acutus* tahıl samanına alternatif bir kaba yem olarak kullanılırsa sadece Kızılırmak Deltasından elde edilecek 3.719 ton *Juncus acutus* ' dan 2.231.400,000 TL' lik katma değer sağlanabilir.

Juncus acutus 'un farklı mevsimlerde hasatının ve antinutrisyonel faktörlerinin gaz üretim parametrelerine etkisinin araştırılması uygun olacaktır.

ANKOM_{RF} gaz üretim sistemi ile gaz üretimi psi basınç olarak kaydedilmektedir. ME ve SOMD hesaplamalarını yapmada psi basınç değerleri kullanan eşitliklerin geliştirilmesi uygun olacaktır. Çünkü şırınga kullanılarak yapılan gaz ölçümlerinde 200 mg örnek kullanılmakta ve eşitlikler ona göre geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz E, Hatipoğlu R, Altınok S, Sancak C, Tan A, Uraz D. Yem bitkileri üretimi ve sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ankara, 3-7 Ocak 2005.
- Aghajanzadeh-Golshani A, Maheri-Sis N, Mirzaei-Aghsaghali A, Baradara-Hasanzadeh. Comparison of nutritional value of tomato pomace and brewer's grain for ruminants using *in vitro* gas production technique. Asian J. Anim. Vet. Adv. 2010; 5 (1):43-51.
- Akçıl E, Denek N. Farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağının bazı kaba yemlerin *in vitro* metan gazı üretimi üzerine etkisinin araştırılması. Harran Üniv. Vet. Fak. Derg. 2013; 2(2):75-81.
- Akinfemi A, Adesanya AO, Aya VE. Use of an *in vitro* gas production technique to evaluate some nigerian feedstuffs. American-Eurasian J. Sci. Res. 2009; 4(4):240-245.
- Alataş MS, Umucalılar HD. Rumenin mikrobiyal ekosistemindeki bakteriler ve rolleri. Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg. 2011; 6(1):71-83.
- Altınayar G. Su yabancı otları. T.C. Bayındırlık ve İskan Bak. Dev. Su İşleri Genel Müd. İşletme ve Bakım Dairesi Başkanlığı, Ankara.1988.
- Anon (2011). Türkiye'de kaba yem açığı % 60'ın üzerinde. [http://www.dünyagida.com.tr/haber .php?nid:3222](http://www.dünyagida.com.tr/haber.php?nid:3222).2012
- Anon (2012a). Samana muhtaç türkiye.[http://blog.milliyet.com.tr/samana-muhtac-edilen turkiye/Blog/?BlogNo=374432](http://blog.milliyet.com.tr/samana-muhtac-edilen-turkiye/Blog/?BlogNo=374432). 2012.
- Anon (2012b). Saman fiyatı yüzde 400 arttı
<http://www.cnnturk.com/2012/ekonomi/genel/08/227saman.fiyati.yuzde.400.artti/673821.0/index.html>., 2012
- Anon (2013a). Sulak alanlar. TC Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü. Hassas Alanlar Dairesi Başkanlığı, Sulak Alanlar Bölge Müdürlüğü.1. Baskı. 2013;1-160.
- Anon (2013b). Bitkisel Üretim İstatistikleri, Yem Bitkileri Üretimi. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu. 2013.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.2006.
- Avcı M, Denek N, Kaplan O. Çelikhane Doğal bitki florasında bulunan geven (*astragalus gummiera*) bitkisinin besin madde değerinin belirlenmesi. Harran Üniv. Vet. Fak. Derg. 2012; 1(1):44-46.

- Ayan AK. Kızılırmak Deltasında doğal kaynak kullanımı. Kızılırmak Deltası Raporu. 2007.
- Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. FEMS Microbiol. Lett. 2010; 305(1): 49-57.
- Beuvink J, Kogut J. Modeling gas roduction kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. J.Anim Sci.1993; 71:1041-1046.
- Beuvink J, Spoelstra S. İnteractions between substrate, fermentaion end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganism *in-vitro*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; 37: 505-509.
- Bidlack JE, Buxton DR.Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. Canadian J. of Plant Sci. 1992; 72(3): 809-818.
- Blummel M, Karsli A, Russell JR. İnfluenceof diet on growth yields of rumen micro-organisms *in-vitro* and *in-vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. Br. J. Nutr. 2003; 90: 625-634.
- Blummel M, Ørskov ER. Comparison of *in-vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting of food intake in cattle. Anim. Feed Sci. Tech. 1993; 40: 109-119.
- Boguhn J, Neumann D, Helm A, Strobel E, Tebbe CC, Dänicke S, Rodehutschord M. Effects of concentrate proportion in the diet with or without fusarium toxin-contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro*. Arch. Anim. Nutr. 2010; 64 (6): 467-483.
- Boğa M, Güven İ, Atalay Aİ, Kaya E. Effect of Varieties on potential nutritive value of pistachio hulls. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 2013; 19: 699-703.
- Canbolat Ö. Bazı esansiyel yağların *in vitro* sindirim, rumen fermantasyonu ve metan gazı üretimi üzerine etkileri. Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 2012a; 2(1):91-98.
- Canbolat Ö. potential nutritive value of field binweed (*Convoivuius arvensis l*) hay harvested at three different maturity stages. Kafkas Univ. Vet. Fak Derg. 2012b; 18 (2): 331-335.
- Canbolat Ö. Determination of potential nutritive value of exotic tree leaves in Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2012c;18 (3): 419-423.
- Canbolat Ö. Bazı buğdaygil kaba yemlerinin *in-vitro* gaz üretimi, sindirilebilir organik madde, nispi yem değeri ve metabolik enerji içeriklerinin karşılaştırılması. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2012d;18 (4): 571-577.

- Canbolat Ö. Farklı olgunlaşma dönemlerinin kolza otunun (*Brassica napus* L.) potansiyel besleme değeri üzerine etkisi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 2013; 60: 145-150.
- Canbolat Ö, Kara H, Filya İ. Bazı baklagil kaba yemlerinin *in-vitro* gaz üretimi, metabolik enerji, organik madde sindirimi ve mikrobiyal protein üretimlerinin karşılaştırılması. U. Ü. Ziraat Fak. Derg. 2013; 27 (2): 71-81.
- Canbolat Ö, Sincik M. Farklı olgunlaşma dönemlerinde hasat edilen kenaf çeşitlerinin (*Hibiscus cannabinus* L.) sindirim derecesi ve metabolik enerji değerlerinin *in-vitro* gaz tekniği ile belirlenmesi. 5. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Van, CD'de, 2007.
- Chaudhary PP, Sirohi SK. Kumar S. Improved extraction of quality DNA from methanogenic archaea present in rumen liquor for PCR application. Asian J. Anim. Sci. 2011; 5: 166-174.
- Chentli A, Gillman L, Bouazza L, Medjkan S. Limami AM, Le Paven MCM. Bousseboua H. Effect of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by real time PCR. İnt. J. Adv. Res. 2014; 2(2): 660-671.
- Cherdthong A, Wanapat M, Kongnum P, Pilajun R, Khejornsart P. Rumen fermentation, microbial protein synthesis and cellulolytic bacterial population of swamp buffaloes as affected by roughage to concentrate ratio. J. Anim. Vet. Adv. 2010; 9 (11): 1667-1675.
- Chesson A, Forsberg CW. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. The Rumen Microb. Ecosystem. 1997; 329-381
- Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of long-term rumen simulation technique (RUSITEC). Br. J. Nutr. 1977; 38: 271-384.
- Çetinkaya N, Özcan H, Ulutürk S, Bakioğlu T. Ankara keçilerinde rumende mikrobiyal protein sentezleme verimliliğinin 3eS-infüzyon metodu ile belirlenmesi. Lalahan Hay. Arş. Enst. Derg. 1998; 38(2): 41-47.
- Çetinkaya N. Proteince Zengin Yemlerin By-pass Protein Değerleri. Yem Magazin Der. 1996; 7:7-10.
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Mol. Biol. Rep. 2008; 35: 265-274.
- Denman SE, McSweeney CS. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol. Ecol. 2006; 58:572-582.
- Dhanao MS, France J, Siddons RC, Lopez S, Buchanan-Smith JG. A non-linear compartmental model to describe forage degradation kinetics during incubation in polyester bags in the Rumen. Br. J. Nutr. 1995;7: 3-15

- Durak Z. Adana Sofulu düzensiz çöp depolama alanında oluşan çöp sızıntı sularının bitki yetiştirilmesinde kullanılması. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı. Adana. Yüksek Lisans Tezi. 2005; 45-46.
- El Shaer HM. Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East Region Small Ruminant Res. 2010; 91: 3–12.
- Fisher MM, Triplett EW. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65:4630-4636.
- France J, Dhanoa MS, Theodorou MK, Lister SJ, Davies DR, İsaç D. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in-vitro* degradation of ruminant feeds. J. Theor. Biol. 1993; 163:99-111.
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez S ve Bannink A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in-vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. Br. J. Nutr. 2000b; 83 :143-150.
- France J, Theodorou MK, Lowman RS, Beever DE. Feed evaluation for animal production. In: Theodorou MK, France J(Eds.) Feeding System and Feed evaluation models. CAB International, Wallingford, 2000a.
- France J, Thornley JHM. Mathematical models in agriculture: A quantitative approach to problems in agriculture and related sciences. Butterworths (London and Boston) 102-297-860 Last edited on 2002/02/27 17:55:48 US/Mountain.1984; xi-335.
- Getachew G, Robinson PH, DePeters EJ, Taylor SJ. Relationships between chemical composition, drymatter degradation and *in-vitro* gas production of several ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Tech. 2004; 111: 57-71.
- Ghasemi S, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasebi AM, Behgar M, Ghovvati S. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. Small Ruminant Res. 2012; 104: 94-98.
- Goel G, Makkar HPS, Becker K. Microbial communities using real time PCR and fermentation parameters *in-vitro* as affected by a natural and a synthetic anti-methanogenic agent. Microb. Ecol. Health D. 2007; 19: 27.
- Graeme T, Attwood GT, Klieve AV, Ouwerkerk D, Patel BKC. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64: 1796-1804.
- Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques FMA, Latinga EA. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in-vitro* fermentation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol.1996; 64:77-89.

- Guo TJ, Wang JQ, Bu DP, Liu KL, Wang JP, Li D, Luan SY, Huo XK. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czech J. Anim. Sci.* 2010; 55 (7): 276–285.
- Güngör T, Başalan M, Aydoğan İ. Kırıkkale yöresinde üretilen bazı kaba yemlerde besin madde miktarları ve metabolize olabilir enerji düzeylerinin belirlenmesi. *Ankara.Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2008; 55: 111-115.
- Güven İ. Effect of Species on Nutritive Value of Mulberry Leaves. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012; 18 (5): 865-869.
- Hassanat F, Benchaar C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. *J. Sci. Food. Agric.* 2013; 93(2): 332–339.
- Hung LV, Wanapat M. Effects of Leucaena leaf pellet on bacterial diversity and microbial protein synthesis in swamp buffalo fed on rice straw. *Livestock Sci.* 2013; 151:188-197.
- Kafilzadeh F, Heidary N, Bahraminejad S. Variety effect on composition, kinetics of fermentation and *in-vitro* digestibility of oat (*Avena sativa L.*) straw and its neutral detergent fibre. *South African J. Anim. Sci.* 2012; 42 (4):406-3-415.
- Kalkan H, Filya İ. Sellülaz enziminin buğday samanının besleme değeri, *in vitro* sindirimi ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkileri. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2011; 17 (4): 585-594.
- Kamalak A. Bazı kaba yemlerin gaz üretim parametreleri ve metabolik enerji içerikleri bakımından karşılaştırılması. *KSU. J. Sci. Engin.* 2005; 8(2): 116-120.
- Kamra DN. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 2005; 89: 124-135.
- Kılıç Ü. Ruminant beslemede kullanılan bazı yem hammaddelerinin *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak bazı fermentasyon ürünlerinin ve enerji içeriklerinin belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Samsun. 2005.
- Kılıç Ü, Boğa M. Protin içeriği farklı ayçiçeği tohumu küspelerinin *in-vitro* gaz üretim tekniği ve enzim tekniği sonuçları üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Türk Bilim Araştırma Vakfı.* 2009; 2(2); 231-238.
- Kim ET, Min KS, Kim CH, Moon YH, Kim SC, Lee SS. The effect of plant extracts on *in vitro* ruminal fermentation, metanogenesis and methane-related microbes in the rumen. *Asian–Australasian J. Anim. Sci.* 2013; 26(4): 517-522.
- Kirchgessener M, Kellner RJ, Roth FX. Zur Schätzung des futterwertes mittels rohfaser und der Zellwandfraktionen der detergentien-analyse. *Landwirtsch. Forsch.* 1977; 30: 245-250.

- Klieve AV, Yokoyama MT, Forster RJ, Ouwerkerk D, Bain PA, Mawhinney EL. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus spp.* of ruminal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 4248-4253.
- Koike S, Kobayashi Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus favefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 204 361-366.
- Koike S, Kobayashi Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2009; 22: 131-138.
- Kongmun P, Wanapat M, Pakdee P, Navanukraw C, Z. Yub. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livestock Sci.* 2011; 135: 84–92.
- Krause DO, Russell JB. How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* 1996; 79: 1467- 1475.
- Lettat A, Nozière P, Silberberg M, Morgavi DP, Berger C, Martin C. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. Lettat et al. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 142-154.
- Lin B, Lu Y, Wang JH, Liang Q, Liu JX. The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production *in-vitro*. *Journal of Anim. Feed Sci.* 2012; 21: 198–210.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 4516-4522.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
- Lopez C, Kononoff PJ, Miner JL. Estimating rumen microbial crude protein *in-vitro* using purine analysis or real-time PCR. Dairy research, University of Nebraska-Lincoln; Lincoln, NE, USA.(Abstract).2010.
- Lwin KO, Hayakawa M, Ban-Tokuda T, Matsui H. Real-time PCR assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Curr. Microbiol.* 2011; 62: 1147-1151.
- MacKay IM. *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. 1st Ed., Caister Academic Press. 2007; 1-454
- Makkar HPS. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Makkar HPS, McSweeney CS. (Ed.) Published by Springer. P.O Box 17,3300 AA Dordrecht, The Netherlands. 2005; 3-19.

- Mao SY, Zhang G, Zhu WY. Effect of disodium fumarate on ruminal metabolism and Rumen bacterial communities as revealed by denaturing gradient electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008;140:293-306.
- Margarida RGM, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2007; 91: 303–314.
- Martínez ED, Klieve AV, Ouwerkerk D, Swain T, Gulin LM, Turnbull K, Poppi DB. Between animal variance in ruminal bacteria and protozoal communities from dgge profiles of steers on a low quality forage diet. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 2010; 28: 63.
- Martinez-Fernandez G, Abecia L, Martin-Garcia AI, Ramos-Morales E, Hervasa G, Molina-Alcaide E, Yanez-Ruiza DR. *In-vitro- in-vivo* study on the effects of plant compounds on rumen fermentation, microbial abundances and methane emissions in goats. *Animal.* 2013;7(12):1925-1934.
- Mertens DR, Weimer PJ, Waghorn GC. Inocula differences affect *in-vitro* gas production kinetics. USA Dairy Forage Research Center, Research Summaries. 1997;53-54.
- McCracken VJ, Simpson JM, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J. Nutr.* 2001;131:1862-1870.
- McLeod MN, Minson DJ. The accuracy of the pepsin-cellulase technique for estimating the dry matter digestibility *in-vivo* of grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1978; 3: 277-287.
- Mehrez AZ, Orskov ER. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.* 1977; 88: 645-650.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci.* 1979;93: 217-222.
- Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in-vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 1988; 28:7-55.
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-sis N, Mansouri H, Razeghi ME, Safaei AR, Aghajanzadeh Golshani A, Alipoor K. Estimation of the nutritive value of tomato pomace for ruminant using *in-vitro* gas production technique. *African J. Biotech.* 2011; 10(33): 6251-6256

- Mitsumori M ve Sun W. control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2008; 21(1): 144 – 154.
- Nahand MK, Nobar RSD, Maheri-Sis N, Lotfi A. Effect of polyethylene glycol (peg) on *in-vitro* gas production, metabolisable energy and organic matter digestibility of apple tree leaves as ruminant feed. *Global Veterinaria* 2010; 4(6): 587-591.
- Narvaez N, Wang Y, McAllister T. Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *andryucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 93 (10): 2517–2522.
- Norton BW. The nutritive value of tree legumes. from <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Pub/licat/Guttshel/x5556e0j.htm>, 2003;1-10.
- Onime L, Zanfi C, Agostinis C, Bulla R, Spanghero M. The use of quantitative real time polymerase chain reaction to quantify some rumen bacterial strains in an *in-vitro* rumen system. *Italian J. Anim. Sci.* 2013; 12(e58):336-370.
- Ørskov ER, McDonald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 1979; 92: 499-503.
- Oskoueian E, Abdullah N, Oskoueian A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Res. Int.* 2013; Article ID 349129:1-8.
- Özkul H, Şayan Y, Polat M, Çapçı T. Comparison of metabolizable energy values of roughages determined by regression equations using *in-vivo* and *in-vitro* parameters. *Pak. J. Biol. Sci.* 2005; 8: 696-700.
- Patra AK, Yu Z. Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations *in-vitro*. *J. Dairy Sci.* 2013; 96 (3): 1782–1792.
- Pell AN, Doane PH, Schofield P. *In vitro* digestibility and gas production. From <http://www.sbz.org.br/anais1997/simp/palest7.pdf>. 1997.
- Pers-Kamczyc E, Zmora P, Cieslak A, Szumacher-Strabel M. Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. *J. Anim. Feed Sci.* 2011; 20: 315–337.
- Polyorach S, Wanapat M, Cherdthong A. Influence of yeast fermented cassava chip protein (yefecap) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using *in vitro* gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2014; 27: 36-45.

- Rahman MM, Alam MR, Amin MR, Das NG. Comparative study of the nutritive values of the different varieties of rice straw. *Bang. J. Anim. Sci.* 2010; 39(1,2): 75-82.
- Ranilla MJ, García AIM, Alcaide EM, Carro MD. Analysis of microbial communities in Rusitec and single-flow continuous culture fermenters by PCR SSCP: Effects of basal diet. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Zaragoza: CIHEAM/FAO/NAGREF, 2009; 239 -243.*
- Rincon MT, Ding SY, McCrae SI, Martin JC, Aurilia V, Lamed R, Shoham Y, Bayer EA, Flint HJ. Novel Organization and divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *R. flavefaciens*. *J. Bacteriol.* 2003; 185(3):703-713.
- Sarnklong C, Cone JW, Pellikaan W, Hendriks WH. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2010; 23(5) : 680 – 692.
- Saro C, Ranilla MJ, Tejido ML, Carro MD. Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livestock Sci.* 2014; 160: 52-59.
- SAS. SAS istatistic software, SAS campus DRIVE. Cary NC, USA. 2007
- Schofield P. Gas production methods. In: D’Mello JPF (Ed.). *Farm animal metabolism and nutrition* CABÍ publishing, Wallingford, UK. 2000; 209-232.
- Schofield P, Pell AN. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in-vitro: A coparison involving three forages. *J.Dairy Sci.* 1995; 78: 2230-2238.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN. Kinetics of fiber digestion from *in-vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 1994; 72: 2980-2991.
- Sekhavati MH, Mesgaran MD, Nassiri MR, Mohammadabadi T, Rezaii F, Fani Maleki F. Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both *in-vitro* and *in-vivo* systems. *Mycol. Res.* 2009; 113:1146-1153.
- Sharma RK, Arora DS. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of *in-vitro* digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresour Technol.* 2010; 101(23): 9248-53.
- Shi Y, Odt CL, Weimer PJ. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63:734–742.
- Shin EC, Cho KM, Lim WJ, Hong SY, An CL, Kim YK, Choi BR, An JM, Kang JM, Kim H, Yun HD. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97: 378-383.

- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 4705-4714.
- Sing B, Tomar SK, Kundu SS. *In-vitro* gas production technique for feed evaluation.1. Baski, Karnal-132 001, Haryana, India Intech Printers & Publishers #.353, Mughal Canal Market. 2010; 1-115.
- Singh KM, Tripathi AK, Pandya PR, Parnerkar S, Rank DN, Kothari RK, Joshi CG. Use of real-time PCR technique in determination of major fibrolytic and non fibrolytic bacteria present in Indian Surti buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Pol. J. Microbiol.* 2013; 62(2): 195-200.
- Stefanon B, Pell AN, Schofield P. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and waterinsoluble fractions of alfalfa and brome hay. *J. Anim. Sci.*1996;74: 1104-1115.
- Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP. The Rumen bacteria. PN Hobson, CS Stewart (Editors). *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd Edition. Springer,1997; 49-55.
- Suharti S, Astuti DA, Wina E, Toharmat T. Rumen Microbial Population in the *In vitro* Fermentation of Different Ratios of Forage and Concentrate in the Presence of Whole Lerak (*Sapindus rarak*) Fruit Extract. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2011; 24 (8): 1086 – 1091.
- Sung HG, Kobayashi Y, Chang J, Ha A, Hwang H, Ha JK. Low ruminal ph reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2007; 20(2): 200–207.
- Szumacher-Strabel M, Cieślak A, Nowakowska A. Effect of oils rich in linoleic acid on *in vitro* rumen fermentation parameters of sheep, goats and dairy cows. *J. Anim. Feed Sci.* 2009;18: 440-452.
- Szumacher-Strabel M, Cieślak A. Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J. Anim. Feed Sci.* 2010; 19: 329-348.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 2766-2774.
- Tilley JMA, Terry RA. A two stage method for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 1963;18: 104-111.
- TUT 125. Fitting Curves and Surfaces using SAS software, TUT 125, ver.1.1. University of leeds, information system services.2007; 1-22.

- Tuyen VD, Cone JW, Baars JJP, Sonnenberg ASM, Hendriks WH. Fungal Strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for Rumen fermentation. *Bioresource Tech.* 2012; 111: 336-342.
- Van Soest PJ, Robertson JD, Lewis BA. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991; 74: 3583-3597.
- Vinh NT, Wanapat M, Khejornsart P, Kongmun P. Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in swamp buffalo fed different diets. *J. Anim.Vet. Adv.* 2011; 10(4): 406-414.
- William BA. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM.(Eds.), *forage evaluation in ruminant nutrition* CABÍ Publishing, Wallingford, UK. 2000;189-213.
- Wright AD, Auckland CH, Lynn DH. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73: 4206-4210.
- Yu ZT, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques.* 2004;36: 808-812.
- Yun Li C, Hui Zhao X, Chun Cao Y, Geng Lei Y, Juan Liu C, Xin Wang H, Hu Yao J. Effects of chitosan on *in-vitro* ruminal fermentation in diets with different forage to concentrate ratios. *J. Vet. Adv.* 2013; 12(7): 839-845.
- Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006;70: 281-289.
- Zhou YW, McSweeney CS, Wang JK, Liu JX. Effects of disodium fumarate on ruminal fermentation and microbial communities in sheep fed on high-forage diets. *Animal.* 2012; 6(5): 815–823.
- Zoetendal EG, Akkermans AL, Devos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64:3854-3859.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J. Nutr.* 2004, 134: 465-472.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Funda ERDEM

Doğum Yeri: Çanakkale

Doğum Tarihi: 10.07.1976

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Ondokuz Mayıs Lisesi	1991-1993
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	1994-1998
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	1999-2001

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü (Arş. Gör.)	2000-2001
Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarı (Samsun Hıfzıssıhha Enstitüsü)	2002-

İletişim Bilgileri:

Adres:

Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarı
Moleküler Mikrobiyoloji Lab.
Adalet Mah. Mevlana Cad. No:66
İlkadım/SAMSUN

E-posta:

fundaerdemtr@gmail.com