

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BAZI KABA YEMLERE İLAVE EDİLEN
PROBİYOTİKLERİN *İN VİTRO* ORGANİK MADDE
SİNDİRİMİ VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

Ali GÜLER

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Faruk BOZKAYA**

**ŞANLIURFA
2016**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BAZI KABA YEMLERE İLAVE EDİLEN
PROBİYOTİKLERİN *İN VİTRO* ORGANİK MADDE
SİNDİRİMİ VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

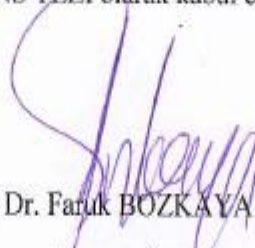
Ali GÜLER

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Faruk BOZKAYA**

**ŞANLIURFA
2016**


HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ali GÜLER'in hazırladığı "**Bazı Kaba Yemlere İlave Edilen Probiyotiklerin *İn Vitro* Organik Madde Sindirimi ve Metan Üretimi Üzerine Etkisi**" konulu çalışma, 13/07/2016 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Faruk BOZKAYA (Danışman)

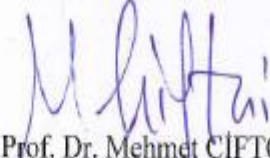
Harran Üniversitesi

BAŞKAN


Prof. Dr. Mehmet AVCI

Harran Üniversitesi

ÜYE


Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Fırat Üniversitesi

ÜYE


Prof. Dr. Mustafa DENİZ

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın planlaması ve laboratuvar çalıőmalarının yűrűtűlmesi sırasında ilgi ve desteęini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Oktay KAPLAN'a; literatűrlerin araőtırılması, tezin yazımı ve dűzenlenmesinde űzverili bir űekilde destek saęlayan danıőmanım sayın Doç. Dr. Faruk BOZKAYA'ya; laboratuvar çalıőmalarında ve çalıőmanın dięer aőamalarında bilgi ve deneyimleri ile yol gűsteren sayın Prof. Dr.Nihat DENEK ve Prof. Dr. Mehmet AVCI'ya saygı ve teőekkűrlerimi sunarım.

Hilvan İlçe Tarım Műdűrlűęűnde alıőan iő arkadaőlarıma ve űzellikle gerekli kolaylıkları gűsteren eski İlçe Tarım Műdűrűm Sayın İsmail ŐEYHANLI ve űimdi ki İlçe Tarım Műdűrűm Sayın Salih KARATAŐ'a; tez çalıőmam sırasında desteęini esirgemeyen Mehmet SAVRUNLU, Sadık Serkan AYDIN, Zeynettin ECE, Hűseyin GŬL ve Besime DAŐ'a; sabır ve anlayıőla beni teővik eden eőim Ezgi GŬLER'e ve aileme desteklerinden dolayı teőekkűr ederim.

Ali GŬLER

2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLOLAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Probiyotikler.....	3
2.2. Metan Gazının Küresel Isınmaya Etkisi.....	5
2.3. Ruminantlarda Metan Oluşumu.....	8
2.4. Ruminantlarda Metan Gazının Azaltılmasına Yönelik Çalışmalar.....	9
2.4.1 Rasyon Bileşiminin Metan Üretimi Üzerine Etkisi.....	9
2.4.1.1 Karbonhidratlarının Etkisi.....	9
2.4.1.2 Yağların Etkisi.....	10
2.4.2 Yem Katkı Maddesinin Etkisi.....	11
2.4.2.1 İyonofor Grubu Antibiyotikler.....	11
2.4.2.2 Direkt Metan İnhibitörleri.....	11
2.4.2.3 Propiyonat Üretimini Artıran Maddeler.....	12
2.4.2.4 Bitkiler ve Bitki Eksrakları.....	12
2.4.2.5 Probiyotiklerin Etkisi.....	13
2.4.3 Biyoteknolojik Çalışmaların Etkileri.....	14
2.4.3.1 İmmünizasyon.....	14
2.4.3.2 Defaunasyon.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1 .Materyal.....	15
3.1.1. Yem Materyali.....	15

3.1.2. Rumen Sıvısı	15
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Araştırmada Kullanılan Yemlerin Besin Madde İçeriklerinin Belirlenmesi.....	17
3.2.2. İn Vitro Denemenin Yürütülmesi.....	17
3.2.3. Rumen Sıvısının pH Değerinin Hesaplanması.....	19
3.2.4. Rumen Sıvısının Amonyak Azot Analizi.....	19
3.2.5. İstatiksel Analiz.....	19
4.BULGULAR	20
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ	29
7. KAYNAKLAR.....	30

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	4
Tablo 2: Probiyotik ve Antibiyotiklerin Özelliklerinin Karşılaştırılması	4
Tablo 3: Kullanılan Kaba Yemlerin Ham Besin Madde (%KM) İçerikleri	20
Tablo 4: Buğday Samanına İlave Edilen Probiyotiklerin <i>İn Vitro</i> Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi.....	22
Tablo 5: Çayır Kuru Otuna İlave Edilen Probiyotiklerin <i>İn Vitro</i> Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi.....	23
Tablo 6: Silaja İlave Edilen Probiyotiklerin <i>İn Vitro</i> Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi.....	24
Tablo 7: Yonca Kuru Otuna İlave Edilen Probiyotiklerin <i>İn Vitro</i> Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Türkiye’de 1990-2014 Yılları Arasında Toplam Sera Gazı Emisyonundaki (CO ₂ eşdeğeri) Değişim.	7
Şekil 2: Türkiye’de 1990-2014 Yılları Arasında CO ₂ Emisyonundaki Değişim.	7
Şekil 3: Türkiye’de 1990-2014 Yılları Arasında Metan Gazı Emisyonundaki (CO ₂ eşdeğeri) Değişim	8



KISALTMALAR

<C₆	:Kısa Zincirli Yağ Asitleri
>C₁₈	:Uzun Zincirli Yağ Asitleri
ADF	:Asit Detergant Fibre
C₈-C₁₆	:Orta Uzunluktaki Yağ Asitleri
CFC	:Halokarbonlar
CFCs	:Kloroflourkarbon
CH₄	:Metan
CO	:Karbonmonoksit
CO₂	:Karbondioksit
H⁺	:Hidrojen İyonu
H₂	:Hidrojen
H₂O	:Su
HK	:Ham Kül
HP	:Ham Protein
IVOMS	:İn Vitro Organik Madde Sindirilebilirliği
KT	:Kondanse Tanen
ME	:Metabolik Enerji
N₂O	:Azotoksit
NDF	:Neutral Detergant Fiber
NH₃-N	:Amonyak Azotu
O₃	:Ozon
UYA	:Uçucu Yağ Asidi

ÖZET

BAZI KABA YEMLERE İLAVE EDİLEN PROBİYOTİKLERİN *İN VİTRO* ORGANİK MADDE SİNDİRİMİ VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ali GÜLER

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma, ruminantlarda yaygın olarak kullanılan bazı kaba yemlere belirli bir seviyede katılan probiyotiklerin (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* ve *Saccharomyces boulardii*) *in vitro* ortamda metan gazına olan etkisini tespit etmek için yapılmıştır. Bu amaçla % 1 oranında probiyotik ilave edilen öğütülmüş kaba yem örnekleri rumen sıvısı içeren özel cam tüpler içerisinde 39°C'de 24 saat inkube edilmiştir. İnkubasyon sonunda oluşan toplam gaz içerisindeki metan (CH₄) gazı ve karbondioksit (CO₂) yüzdesi CH₄ ölçüm cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca her bir deneme grubundaki *in vitro* organik madde sindirilebilirliği (IVOMS), amonyak azotu miktarı (NH₃-N), metabolik enerji (ME) ve pH değerleri belirlenmiştir. Buğday samanına ilave edilen *B. lactis*'in toplam gaz hacmini, CH₄, CO₂ hacmini ve IVOMS'ni düşürdüğü, *S. boulardii*'nin ise CH₄ yüzdesini yükseltirken, CO₂ yüzdesini düşürdüğü gözlenmiştir. Çayır kuru otuna ilave edilen *L. Rhamnosus* toplam gaz miktarını, CH₄ miktarını ve IVOMS'ni yükseltirken CH₄ yüzdesini etkilememiştir. Silaj ve yonca kuru otu denemelerinde ise ilave edilen probiyotikler CH₄ ve CO₂ düzeylerini etkilememiştir. Sonuç olarak sunulan çalışmada buğday samanına katılan *B. lactis* dışındaki probiyotik mikroorganizmalar CH₄ üretimini arttırmış ya da etkilememiştir. Buğday samanına ilave edilen *B. lactis*'in CH₄ miktarını azaltması, çayır kuru otuna ilave edilen *L. rhamnosus*'un ise CH₄ miktarını arttırmasının söz konusu yemlerin IVOMS'ni etkilemesinden kaynaklandığı, bu nedenle sunulan çalışmada kullanılan probiyotiklerin CH₄ gazını azaltmak amacıyla kullanılmasının gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, kaba yem, *in vitro*, metan üretimi.

ABSTRACT

THE EFFECT OF PROBIOTICS ADDED TO SOME ROUGHAGES ON *IN VITRO* ORGANIC MATTER DIGESTIBILITY AND METHANE PRODUCTION

Ali GÜLER

Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Master Thesis

The objective of this study was to determine the effects of probiotics (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* ve *Saccharomyces boulardii*) added at a certain level to some roughages on *in vitro* methane production. Ground roughage samples added with 1% of probiotics were incubated in special glass tubes containing rumen fluid at 39 °C for 24 h. Percentages of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) in total gas produced were measured by using a methane measuring device. Additionally *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), amount of ammonia nitrogen (NH₃-N), metabolic energy (ME) and pH values were also determined. Addition of *B. lactis*' to wheat straw decreased CH₄ and CO₂ amount and IVOMD while *S. boulardii* increased the percentage of CH₄ and decreased the percentage of CO₂. Among probiotics added to grass hay *L.rhamnosus* increased total gas volume, CH₄ volume and IVOMD while it did not affect the percentage of CH₄. It was detected that addition of the probiotics to corn silage and alfa alfa roughage did not affect methane and carbondioxyde levels.

As a result, except for *B. lactis*, added to wheat straw, probiotic microorganisms used in the present study increased or did not affect *in vitro* methane production. The results suggested that decreased methane production in what straw added with *B. lactis* and increased methane production in grass hay added with *L.rhamnosus* resulted from affected IVOMD of these roughages due to addition of these probiotics and therefore use of the probiotics in this study were not necessary for reducing ruminal methane production.

Keywords: Probiotics, roughage, *in vitro*, methane production.

1. GİRİŞ

İnsanların yaşamını sürdürmesindeki en temel fonksiyon beslenmedir. Beslenmedeki en büyük pay ise et ve süt ürünleridir. Et ve süt ürünlerinin başlıca kaynağı ruminant hayvanlardır (1). Dünyada artan nüfusa karşın hayvansal üretimdeki yetersizlik beslenmede ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu sıkıntıyı ortadan kaldırmak için hayvanların hızlı bir şekilde canlı ağırlık kazanmaları ve verim düzeylerinin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Çiftlik hayvanlarının yüksek verim düzeyini sürdürebilmesi doğru bakım ve besleme uygulamalarına bağlıdır (2). Ruminantlar selülozca zengin besinleri sindirebilme yeteneğine sahiptir. Bunun başlıca sebebi sindirim sistemine yerleşmiş olan simbiyotik bir ilişki kuran mikroorganizmalardır (3). Ruminantlarda mikrobiyal sindirimin gerçekleştiği yer rumendir. Ağızla alınan yemlerin rumendeki mikrobiyal fermentasyonu sonucunda karbondioksit, amonyak ve uçucu yağ asitlerinin yanında metan gazı da oluşur (4).

Mikrobiyal fermentasyon sonucu oluşan metan gazı rumenden atılır. Bu nedenle yemle alınan brüt enerjinin % 2-12'si metan gazı yoluyla kaybedilir (5). Metan gazı şeklinde kaybedilen enerji hayvancılık ekonomisine zarar verdiği gibi ekolojik dengeyi de olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Hayvansal üretim faaliyetleri sonucu ortaya çıkan metan gazı sera etkisiyle küresel ısınmada rol oynar (1). Rumende mikrobiyal fermentasyon sonucu oluşan ve doğaya salınan metan gazı atmosfere salınan toplam metan gazının % 15-18'ini oluşturur. Bu oran küçümsenmeyecek kadar yüksektir (6). Geçmişte bilim adamları bu oranı düşürmek amacıyla ruminant rasyonlarına iyonofor grubu antibiyotikler katmıştır. Rasyona katılan bu antibiyotikler metan gazının oranının düşürülmesinde büyük bir etken olmuştur (7). Fakat Avrupa birliğinde bulunan üye ve aday ülkelerde rasyona katılan bu antibiyotiklerin kalıntı bırakması ve direnç oluşturması sebebiyle yem katkısı olarak antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır (8). Metan gazı üretiminin azaltılması amacıyla antibiyotik kullanımının yasaklanması insan sağlığı açısından daha güvenli olan yem katkılarının kullanımını gündeme getirmiştir. Bu amaçla organik asitler, ekzojen enzimler, çeşitli bitki ekstratları, prebiyotik ve

probiyotikler kullanılabilir (9). Bununla birlikte probiyotik ve prebiyotiklerin metan gazı üretimi üzerine etkisine yönelik az sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır.

Yapılan çalışmada, ruminant rasyonlarında kullanılan bazı kaba yem kaynaklarına, ilave edilen farklı probiyotiklerin *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak metan gazı oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotikler

Probiyotikler, konakçı hayvanın bağırsağında mikroorganizma dengesini değiştirerek hayvanda faydalı etkiler oluşturan ve hayvanların yemden yararlanmalarını sağlayan, doğrudan doğruya ağızdan veya yem katkısı şeklinde verilen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanabilir (10-14).

Probiyotik olarak yaygın bir şekilde kullanılan mikroorganizmalar Tablo 1’de gösterilmiştir. Bakteriyel probiyotik yem katkısı olarak *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türleri yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Probiyotik olarak kullanılan *Streptokoklar* gram pozitif ve an aerob bakterilerdir. *Lactobacillus* türü bakteriler mide asidine dayanabilir ve sindirim kanalından geçerken canlılığını koruyabilirler (14).

Probiyotik olarak bir veya daha fazla sayıda mikroorganizma suşu içeren ticari preparatlar hazırlanmıştır (14,15). Hayvan beslemede kullanılan probiyotiklerin sahip olması gereken önemli özellikleri şu şekilde sıralanmıştır (14):

- Patojenik veya toksik olmamalıdır.
- Canlı olmalı ve yem üretimi sırasında kullanılan işlemlerde canlı kalabilmelidir.
- Uygun konsantrasyonda kullanılmalı ve verilen hayvanın bağırsak florasına uyum sağlayabilmelidir.
- Midedeki düşük pH seviyesine, bağırsaklardaki safra tuzlarına ve enzimlere karşı dayanıklı olmalıdır.
- Sindirim sisteminde aktif hale gelerek hızlı çoğalmalıdır.
- Depolamada, yem ve saha şartlarında uzun bir süre dayanabilmeli ve kullanılabilirdir.

Probiyotiklerin zararlı mikroorganizmalar üzerine olumsuz etkisi vardır. Bundan dolayı probiyotik kullanımı büyük önem kazanmaktadır. Probiyotik kullanımı ile bağırsakların duvarında koruyucu bir tabaka oluşmakta ve zararlı mikroorganizmaların çoğalmaları engellenmektedir (17).

Tablo 1: Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar (14,16)

BAKTERİLER	
Cins	Tür
<i>Bacillus</i>	<i>B. lentus, B. coagulans, B. lincheniformis, B. pumilis, subtilis</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. amylophilu, B. capillosus, B. ruminocola, B. suis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis, B bifidum</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. butyricum</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus, L. acidophilus, L. brecis, L. casei, L. fermentum, L. lactis, L. Plantarum</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus, P. cerevisiae</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. faecium, S. intermedius, S. lactis</i>
MANTARLAR	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger A. Oryzae</i>
MAYALAR	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>T. candida</i>

Tablo 2: Probiyotik ve Antibiyotiklerin Özelliklerinin Karşılaştırılması

Probiyotik	Antibiyotik
Canlı mikroorganizmalar	-Mikroorganizmaların metabolik ürünleri
-Sadece sindirim sisteminde etki gösterirler	-Hem lokal hem de sistemik etkilidir
-Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmaları dolaylı yoldan engellerler ve patojenlere sınırlı bir şekilde etki gösterirler	-Sindirim kanalında yaşayan mikroorganizmaları doğrudan engellerler
-Birkaç gün	-1 dakikadan 1 saate kadar

Antibiyotiklerin de probiyotikler gibi bağırsak üzerinde olumlu etkisi vardır. Fakat sürekli kullanılmalarından dolayı bağırsaklarda bulunan zararlı mikroorganizma şuşları

antibiyotiğe karşı direnç kazanmakta ve normal flora tahrip olduğundan bağırsağın iyileşmesi zorlanmaktadır. Antibiyotiğin bu etkisinden dolayı günümüzde probiyotiklere olan ilgi artmıştır. Çünkü probiyotikler antibiyotikler gibi kalıntı oluşturmamakla beraber hayvan florasını hızla normale döndürüp, yemden faydalanmasını sağlamaktadır. Ayrıca probiyotikler bağırsaklarda meydana gelen enfeksiyonların engellenmesinde ve kanser hastalıklarının tedavisinde büyük rol oynamaktadırlar (18).

Probiyotiklerin etkisi farklı şekillerde görülür. Bunun nedeni kullanılan probiyotik mikroorganizmanın türü, şusu, hayvana verilmiş miktarı, verildiği hayvanın türü, kondüsyonu ve çevre şartlarının farklı olmasıdır (14).

Probiyotiklerin etki şekilleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Bağırsak yüzeyine yapışma,
- Enzim aktivitesi,
- Besin elementleri için rekabet,
- Patojen bakterilerin sayısını azaltma,
- Toksin ve toksin reseptörlerine etkisi,
- Antibiyotik ilişkili diyareler üzerine etkileri,
- İmmun sistem üzerine etkileri,
- İnflamatuvar barsak hastalıklarında kullanımı

Probiyotikler ortam koşullarına karşı oldukça duyarlıdır. Bundan dolayı ortamın pH'sına, yemlerin işleme tekniklerine, depolanma koşullarına, karma yeme ile yem katkı maddeleri arasındaki etkileşimine ve yararlanılan taşıyıcının özelliğine dikkat edilmelidir (18).

2.2. Metan Gazının Küresel Isınmaya Etkisi

Yerküremizi saran atmosfer çeşitli gazları bünyesinde barındırır ve belirli katmanlardan oluşur. Atmosfer güneşten gelen kısa dalga boyuna sahip ışınların yeryüzüne ulaşmasına izin vererek dünyanın ısınmasına yardımcı olur ve canlı yaşamını mümkün kılan çevre sıcaklığını sağlar. Yerkabuğunun ısınması ile birlikte açığa çıkan uzun dalgalı ışınların çoğu atmosferin en iç katmanını oluşturan ve yerden ortalama 11 km yüksekliğe kadar ulaşan troposfer katmanındaki gazlar tarafından tutulur. Atmosferin bu özelliğine sera etkisi denir (19).

Sera etkisinin oluşumunda karbondioksit (CO₂), metan (CH₄) ve diazotoksit (N₂O) büyük bir paya sahiptir. Bu gazlar toplam sera gazlarının % 98'sini oluşturur (20). Kalan % 2'lik kısmı ise halokarbon (CFC), ozon (O₃) ve karbonmonoksit (CO) gazı oluşturur. Sera gazları içerisinde CO₂'in payı % 74'tür (20). Karbondioksit petrol, kömür, doğalgaz gibi fosil yakıtların yakılması sonucu ortaya çıkar. Atmosfere salınan toplam sera gazı hacmi içerisindeki CH₄'in payı % 16 olsa da sera etkisi CO₂'in 23 katıdır (21). Metan emisyonunun en önemli kaynağını tarımsal üretim, organik atıklar ve hayvancılık faaliyetleri oluşturur. Toplam sera gazı salınımının % 10-18'inin tarımsal üretimden kaynaklanan metan üretimi olduğu bildirilmektedir (22). Nitröz oksit (N₂O) gazının sera gazları içerisindeki payı oldukça düşük olmakla birlikte sera etkisi CO₂'in 296 katıdır. Bu gaz kimya sanayi, tarımsal faaliyetler ve hayvan yemlerinin hazırlanması sonucu oluşur. Sanayi devriminden sonra CO₂, CH₄ ve N₂O gazlarının miktarında önemli artışlar gözlemlenmiştir. Bu oran sırasıyla % 31, % 151 ve % 17 dir (23).

Hükümetlerarası İklim Değişikliği Panelinin raporuna göre Dünya'nın yüzey sıcaklığının 1990-2100 yılları arasında ortalama olarak 1.4-5.8°C artacağı öngörülmektedir. Küresel sıcaklık artışında atmosfere salınan sera gazı miktarındaki artışın önemli etkisinin olduğu belirtilmektedir (24).

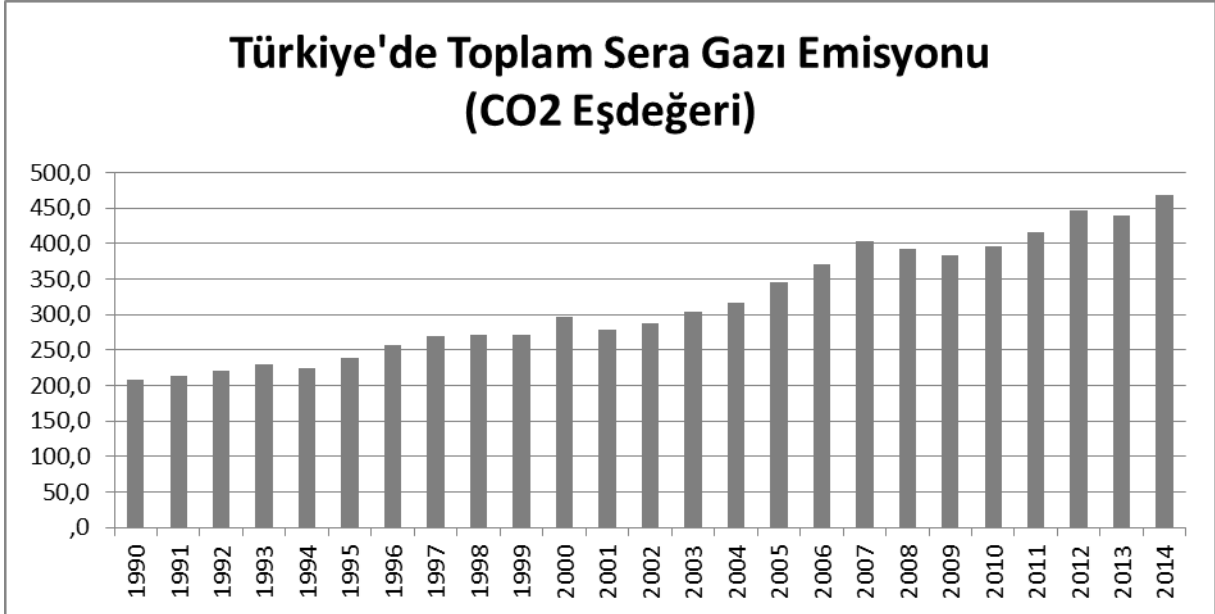
Küresel ısınmanın etkilerini azaltmak için 1997 yılında Japonya'nın Kyoto şehrinde Kyoto protokolü imzalanmıştır. Bu protokolün amacı atmosferdeki sera gazı yoğunluğunun küresel iklim değişikliğine etki etmeyecek seviyeye çekilmesidir. Kyoto protokolüne imza atan ülkeler 2008-2012 yılları arasındaki sera gazı salınımını 1990 yılına göre % 5,2 oranında azaltmakla yükümlüdürler (25).

Türkiye'de 1990-2014 yılları arasında atmosfere salınan toplam sera gazı, karbondioksit ve metan gazı miktarlarındaki değişim aşağıda gösterilen Şekil 1., Şekil 2. ve Şekil 3.'te belirtilmiştir (26).

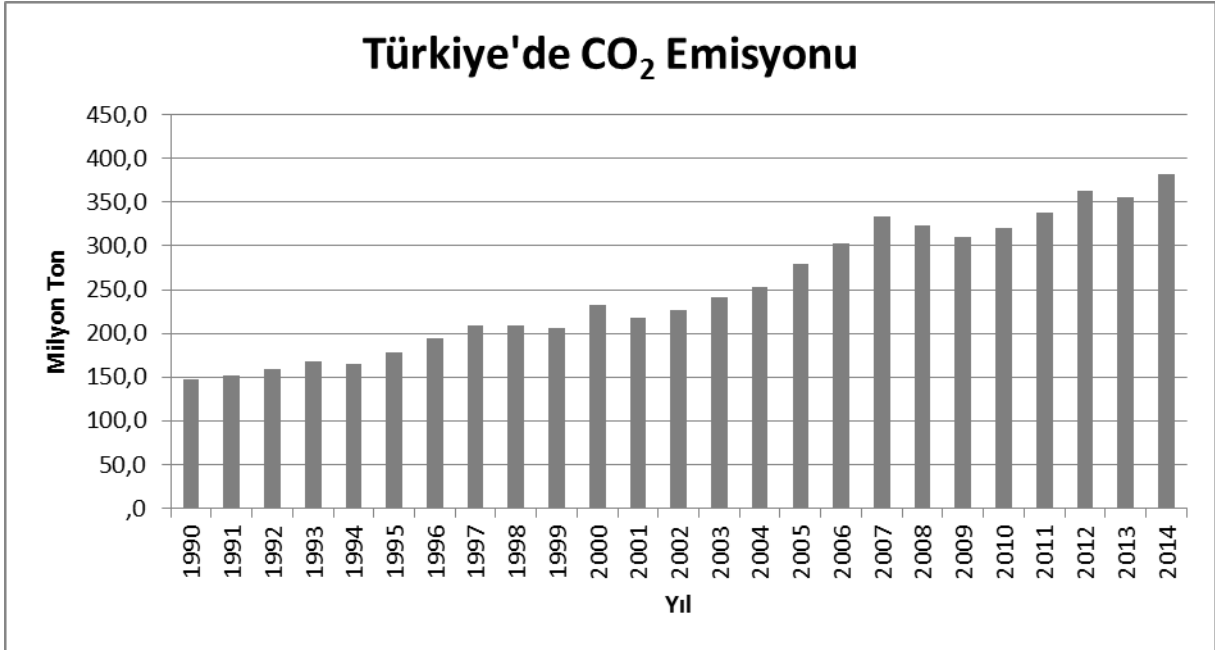
Şekil 1'de görüldüğü gibi 1990 yılından 2014 yılına kadar geçen 24 yıl içerisinde toplam sera gazı emisyonu yaklaşık % 125 oranında bir artış görülmüştür. Bu süre içerisinde karbondioksit gazı emisyonu % 160 oranında artarken metan gazı emisyonu % 30 oranında artmıştır.

Sera gazı salınımında meydana gelen artışta tarım, enerji, atık ve sanayi sektörleri önemli yere sahiptir. Bu sektörlerin metan salınımındaki etkisinin ise sırasıyla % 50.6, % 28.7, % 20.6 ve % 0.1 olduğu bildirilmektedir. Bu veriler tarım sektörünün metan

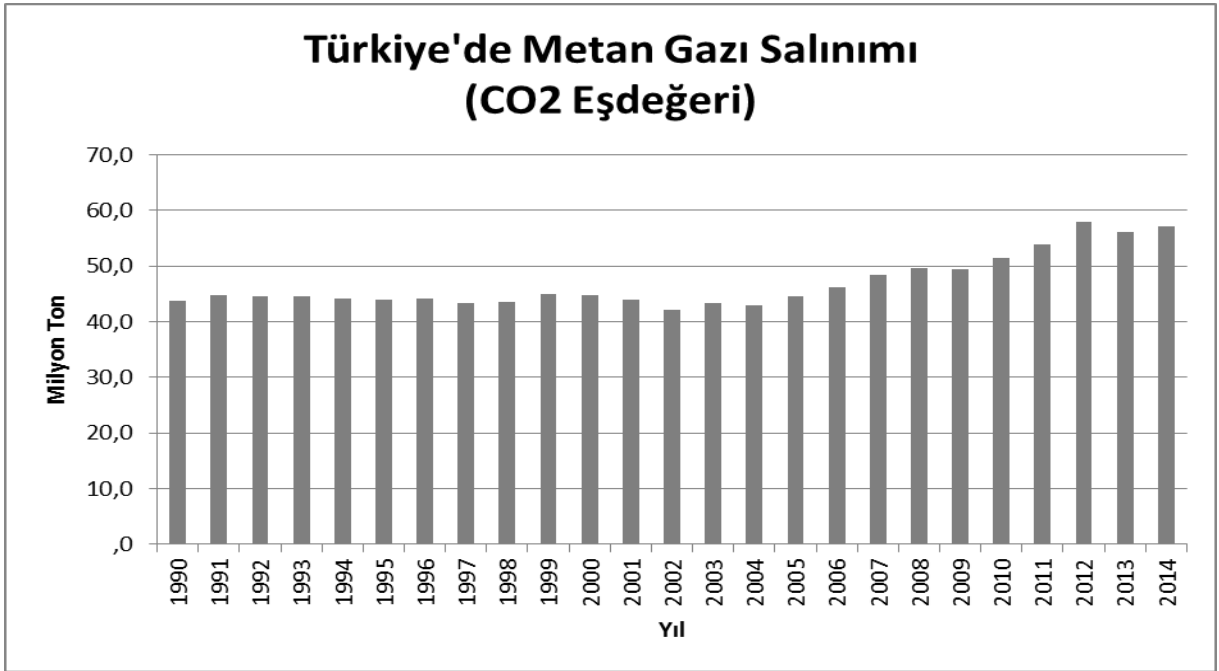
emisyonda en büyük paya sahip olduğunu göstermektedir (27). Tarım sektörü içerisinde özellikle ruminant yetiştiriciliği şeklindeki hayvansal üretim metan gazı salınımında en önemli paya sahiptir. Yetiştirilen ruminant hayvan sayısı 1950 yılından beri 4 kat artış göstermiştir (28).



Şekil 1: 1990-2014 Yılları Arasındaki Türkiye'de Meydana Gelen Toplam Sera Gazı Emisyonundaki (CO₂ eşdeğeri) Değişim (26).



Şekil 2: 1990-2014 Yılları Arasındaki Türkiye'de Meydana Gelen CO₂ Emisyonundaki Değişim (26).



Şekil 3: 1990-2014 Yılları Arasındaki Türkiye’de Meydana Gelen Metan Gazı Emisyonundaki (CO₂ Eşdeğeri) Değişim (26).

Küresel ısınmada en çok etkilenecek bölgelerden biri de Türkiye ve Akdeniz havzasıdır. Küresel ısınmanın Türkiye’ye bu denli etki etmesinden dolayı, iklim değişikliğini en aza indirmek Türkiye gibi Akdeniz havzasındaki diğer ülkeler içinde çok önemlidir (29).

2.3. Ruminantlarda Metan Oluşumu

Dünyada meydana gelen nüfus artışı insan gıdasına olan ihtiyacı da artırmıştır. Gıda üretiminde et ve süt gibi hayvansal ürünler önemli bir yere sahiptir. Bu sektörde de ruminantlar önemli bir rol oynar (2).

Ruminantlar tarafından alınan yemlerin büyük çoğunluğu rumende mikrobiyal fermentasyon ile sindirilir. Yemlenme sonucu alınan selülozca zengin kaba yemler rumende simbiyotik yaşam halinde bulunan fermentatif mikroorganizmalar tarafından sindirilir. Kaba yemlerin mikrobiyal fermentasyonu sonucu asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi uçucu yağ asitleri (UYA) açığa çıkar. Rumendeki epitelden emilen UYA hayvanın ihtiyacı olan enerjinin % 75’ini karşılarlar (4). Rumende meydana gelen sindirim sırasında UYA dışında ayrıca su, hidrojen iyonları ve CO₂ de açığa çıkar. Rumende açığa çıkan H⁺ iyonları

metanojenik bakterilerce kullanılır ve CO₂ gazı ile birleştirilerek metan gazını oluşturur. Metanın oluşma şekli bu denklem ile gösterilebilir $4(2H)+CO_2 \rightarrow CH_4+2H_2O$ (30).

Açığa çıkan metan gazı ruminantlar tarafından ructus ile dışarı salınır. Açığa çıkan metan nedeniyle enerji kaybı meydana gelir. Metan oluşumunun nedeniyle meydana gelen enerji kaybı yemle alınan brüt enerjinin % 2-12'si kadardır (5). Metan oluşumu hayvan beslenme açısından önemli bir ekonomik kayıp olması yanında küresel ısınmada etkin olan sera gazı oluşumunda da önemli bir yer tutar. Bu nedenle dünyada bilim adamları ruminantlarda meydana gelen metan gazını azaltmak için birçok çalışma yapmışlar ve bu çalışmaların çoğunda önemli veri elde etmişlerdir (1).

2.4. Ruminantlarda Metan Gazının Azaltılmasına Yönelik Çalışmalar

2.4.1 Rasyon Bileşiminin Metan Üretimi Üzerine Etkisi

2.4.1.1 Karbonhidratlarının Etkisi

Rasyonda bulunan şeker ve nişasta gibi kolay sindirilebilir karbonhidratlarca zengin konsantre yemler sellülozca zengin kaba yemlere göre daha düşük düzeyde metan gazını oluşumuna neden olur. Konsantre yemlerin rumende parçalanması sonucu açığa çıkan propiyonik asit miktarı artar ve rumen pH'nın düşmesine sebep olur. Rumen pH'sının düşmesi rumendeki metanojenik bakteriler ve protozoonların ve dolayısıyla metan üretiminin azalmasına sebep olur (5). Yapılan bir çalışmada etçi sığırların rasyonuna kesif yem ilavesinin metan emisyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (31).

Rasyonda bulunan kaba yem çeşidinin de metan oluşumu üzerine etkisi vardır. Örneğin baklagil kaba yemleri buğdaygil kaba yemlerine oranla daha az metan oluşumuna neden olmaktadır. Bunun başlıca sebebi kaba yem olarak bilinen baklagillerde yapısal karbonhidratların düşük miktarda olması ve rumenden geçiş hızının yüksek olmasından dolayı propiyonat üretiminin yüksek olmasıdır. Bunlara ek olarak kaba yemin işlenmesi de (peletleme, parçalama, öğütme vs.) rumenden geçiş hızının artmasına ve kaba yemin sindiriminde azalmaya sebep olur. Böylece metan üretiminde % 20-40 düşüş meydana gelir (5).

Hindrichsen ve ark., (32) 'nın yaptıkları bir çalışmada ise lignin oranı yüksek bazı yem maddelerinin metan emisyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Bunun başlıca sebebi yem maddesinin rumen ortamında fazla sindirilmediğinden asetik asit oluşmamakta ve metan üretiminde azalma oluşmaktadır

2.4.1.2 Yağların Etkisi

Ruminant rasyonlarına ilave edilen yağ, rumende metan gazı oluşumunu azaltmaktadır (33). Bitkisel kaynaklı uzun zincirli yağ asitleri metan gazını önemli bir şekilde baskılar (34). Yapılan bir çalışmada sekiz ve onaltı karbonlu yağ asitlerinin ruminatlarda metan gazının azaltılmasında etkili olduğu ve bunun yağın doymamışlık düzeyiyle doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (35).

Rasyondaki doymamış yağların metan gazı oluşumunu azaltmasının sebebi olarak rumen ortamında bulunan hidrojen (H_2) miktarının azalması gösterilmektedir (36). Yapılan bir çalışmada ise orta uzunluktaki yağ asitlerinin (C_8-C_{16}) in vitro ortamdaki metan gazı oluşumunu kısa zincirli ($<C_6$) ve uzun zincirli ($>C_{18}$) yağ asitlerine göre daha fazla azalttığı bildirilmiştir (33).

Bununla birlikte rasyonda bulunan bitkisel yağ oranı yükseldiğinde metan gazı oluşumunun yanı sıra verimlilik ve kârlılıkta azaltmaktadır (37). Rasyon kuru maddesinin % 8'inden fazla yağ katılması rasyonun sindirilebilirliği ve NDF (Neutral Detergent Fiber) sindirilebilirliğini azaltmakta ve rumende asetik asit seviyesini düşürmektedir (36). Bu nedenle rasyona katılan yağ miktarı rasyonun sindirilebilirliğini etkilemeyecek düzeyde olmalıdır.

Rasyona katılan yağ miktarı kuru madde esasına göre % 8'in altında olduğunda kuru madde tüketimi ve sindirilebilirlik olumsuz bir şekilde etkilenmezken ve rasyondaki yağ seviyesinin her % 1 artışında tüketilen kilogram kuru madde başına üretilen metan gazı miktarında % 0,1 oranında azalma meydana gelmektedir (37).

2.4.2 Yem Katkı Maddesinin Etkisi

2.4.2.1 İyonofor Grubu Antibiyotikler

İyonofor grubu antibiyotikler rumende bulunan protozoalar ve gram pozitif bakterilerin enerji dengelerini etkileyerek ölümlerine yol açar. Böylece rumen florasını gram pozitiften gram negatife çevirerek propiyonik asit miktarında artışa sebep olur ve metan emisyonunda azalma meydana gelir (7). İyonofor antibiyotikler içinde en çok araştırılan ve kullanılan monensindir (38).

Yapılan bir çalışmada ruminatlara verilen monensinin metan gazını % 9 düşürdüğü gözlenmiştir. Fakat bakterilerde meydana gelen antibiyotik direnci nedeniyle görülen bu etkinin kısa süreli olduğu anlaşılmıştır (36). Monensin dışında başka iyonofor antibiyotikler de bulunur. Bunlar lasolisid, lizosellin, tetronasin, salinomisin, narasin ve laidomisindir (38).

Rasyonla alınan antibiyotiklerin hayvan vücudunda kalıntılar bırakması ve mikroorganizmaların antibiyotiğe karşı direnç kazanmasından dolayı kamuoyunda ve sağlık sektöründe endişelere yol açmıştır. Bunun için Avrupa Birliği 01.01.2006 tarihinde aldığı karar ile üye ülkelerde antibiyotiklerin hayvan beslemede kullanımını yasaklamıştır (8).

2.4.2.2 Direkt Metan İnhibitörleri

Kimyasallar ile doğrudan metanı indirgemek amaçlanmaktadır. Bilinen direkt metan inhibitörleri kloroform, kloralhidrat, aminokloral, trikloroasetamid, trikloroetiladipat, bromoklorometan, alfa-siklodekstrin, 2-bromoetan sülfonik asit ve 9,10-antrakuinon gibi halojenize metan analoglarıdır (39). Yapılan çalışmalarda kloroformun *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda metanı baskıladığı gösterilmiş olmakla birlikte pratikte kullanım alanını bulunmamaktadır (40). Kloroformdan elde edilen kloral hidrat koyunlarda çalışma amaçlı kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Başta metanı baskıladığı görülse de zamanla koyun karaciğerinde hasara yol açtığı gözlemlenmiştir (41). Aminokloral direkt metan inhibitörleri içinde en güvenli olanı olsa da zaman içinde metanojen bakteriler tarafından geliştirilen direnç nedeniyle etkileri azalmaktadır. Benzer bir durum trikloroasetamid ve bromoklorometan için de geçerlidir (42). Metan oluşumunu azaltmak açısından diğer inhibitörlere göre en iyi sonucu veren bileşiğin doğrudan metanojen bakterilere etki eden 2-

bromoetan sülfonik asit olduğu bildirilmiştir (43, 44). Sonuç olarak direkt metan inhibitörleri pratikte kullanımları zor olduğu kadar hayvan sağlığına da olumsuz etki göstermektedir. Diğer taraftan metanojen bakterilerin inhibitörlere karşı direnç kazanması bu tür inhibitörlerin uzun süre kullanımını sınırlandırmaktadır (1).

2.4.2.3 Propiyonat Üretimini Artıran Maddeler

Bu gruptaki maddelerin etki tarzları iyonoforlara benzer. Bunlar ortamdaki H⁺ iyonlarını kullanarak metan gazı üretiminin azalmasına sebep olur. Bu maddeler malat, fumarat ve akrilat olup propiyonik asitin ön maddeleridir (45). Yapılan çalışmalarda ruminant rasyonlarına ilave edilen fumarik asit, malik asit ve tuzlarının rumende propiyonik asit oranını arttırdığı ve metan üretimini azalttığı gözlemlenmiştir (46). Fumarik asit ve malik asit ile ilgili çalışmalar özellikle *in vitro* ortamda yapılmıştır. Yemlere fumarik asit ilavesinin *in vitro* metan üretimini % 5-11 düzeyinde azalttığı bildirilmiş olmakla birlikte *in vivo* ortamdaki etkileri tam olarak ortaya konulmamıştır (38). Castillo ve ark. (47) besi sığırların rasyonlarına fumarik ve malik asit ilave ederek, fumarat kullanan bakteriler ile metan üreten bakteriler H⁺ iyonları için rekabet ettiği için metan gazı üretiminde azalma olduğunu tespit etmiştir. Ancak McGinn ve ark., (36) rasyona katılan fumarik asitin metan gazı üzerine azaltıcı etkisinin olmadığını savunmuştur.

2.4.2.4 Bitkiler ve Bitki Ekstraktları

Rasyonlara yem katkı maddesinin yerine kullanılan antibiyotiklerin yasaklanmasıyla çoğu ülkede antibiyotiklere alternatif olarak doğal verim artırıcı olan bitkiler ve bitki ekstraktları kullanılmaya başlanmıştır (48). Kamra ve ark., (49) saponin, tanin ve esansiyel yağ gibi bitki ikincil bileşenlerinin metan üretimini baskıladığını ortaya çıkarmışlardır. Bu baskılamada en büyük faktör ikincil komponentlerde bulunan tanin ve saponinin önemli bir etkisinin olduğu anlaşılmıştır.

Yoğun tanen içeren bitkilerin koyun ve sığırlarda rumendeki metan üretimini azalttığı gözlemlenmiştir (49-51). Tanenin metan üretimi üzerine olan etkisinin ya doğrudan ya da selüloz sindirimi üzerindeki dolaylı etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (52). Yapılan bir çalışmada koyun rasyonlarına kuru madde miktarına göre % 2.5 oranında ilave edilen akasya taneninin metan gazı üretimini % 13 düzeyinde azalttığı tespit edilmiştir (53).

Saponinden zengin bitkilerin de rumen benzeri *in vitro* ortamlarda ve *in vivo* ortamda metan gazını azalttığı gözlemlenmiştir (54, 55). Kesin etki şekli bilinmemekle beraber saponinler rumendeki protozoa aktivitesini azaltmaktadır (56, 57). Ayrıca rumen metanojenlerine doğrudan etki edebilmektedir (58). Rumendeki metanojenlerin % 25'i protozoa ile ilişkilidir (59). Rumendeki protozoonların endoplazmik vezüküllerinde yaşayan metanojenler protozoonların metabolizma ürünü olan H⁺ iyonlarını kullanarak metan gazı üretmektedirler (60). Hess ve ark., (55) saponinden zengin *Sapindus saponaria* ilave edilen rumen benzeri *in vitro* ortamda metan üretiminin % 16 civarında düştüğünü tespit etmişlerdir. Ancak *in vivo* ortamda bu düzeyde bir etkinin görülmesinin zor olduğu belirtilmiştir. Akçıl ve Denek (61) bazı kaba yemlere farklı düzeylerde ilave edilen okaliptus yapraklarının *in vitro* ortamda metan üzerine olan etkisini araştırmışlar ve okaliptüs yaprağı ilavesinin kullanılan kaba yem kaynağı ve okaliptüs yaprağı düzeyine bağlı olarak metan gazı üretimini % 10 ila % 53 oranında azalttığını göstermişlerdir. İlave edilen okaliptüs yaprağı seviyesi arttıkça metan gazı üzerine azaltıcı etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Yonca kuru otuna ilave edilen kekik, nane ve portakal yağları gibi eterik yağların da *in vitro* metan ve karbondioksit üretimini önemli düzeyde düşürdüğü bildirilmiştir (62).

Bitkisel ekstraktlarının metan üretimini azaltıcı etkileri bulunmakla birlikte bu ekstraktlar sıklıkla anti nutrisyonel faktörler içerebilir, hatta bazı durumlarda zehirli olabilir (63, 64). Bitki ekstraktları içerisindeki anti mikrobiyel aktiviteye sahip maddeler bu ekstraktların ilaç kategorisinde değerlendirilmesine neden olabilir ve yasal olarak kullanılmasını sınırlandırabilir (63).

2.4.2.5 Probiyotiklerin Etkisi

Probiyotikler hayvanın yemlerine katıldığında mide-bağırsak florasını düzenleyip, hayvanın sağlığı üzerinde yararlı etki gösteren canlı mikrobiyel katkı maddeleri olarak tanımlanır (15). Probiyotiklerin rasyona katılımıyla birlikte rumende propiyonik asit miktarının artması ve H⁺ iyonları miktarının azalmasına bağlı olarak metan üretiminde % 4-31 oranında düşüş meydana geldiği bildirilmiştir (65). Yapılan çalışmalarda mayaların (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus oryzae*) metan gazını baskıladığı (38, 66). Asetojenik ve metanojenik bakterilerin bulunduğu kültüre canlı maya ilave edilmesiyle asetojenik bakterilerin hidrojenotrofik metabolizmasınının 5 kat arttığı ve bundan dolayı asetik

asit miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada asetojenik ve metanojenik bakterileri içeren karışık kültüre canlı maya ilave edilmediği zaman metanojenik bakterilerin öncelikli olarak hidrojeni kullandığı ve metan ürettiği tespit edilmiştir (67).

Metanı azaltacak olan diğer bir probiyotik türü ise indirgeyici asetogenesis etkisi olan bakterilerdir. Bunlar bağırsaklarda bulunan hidrojen iyonlarını ve karbondioksiti indirgeyerek asetik asit üretirler. Böylece metanojen bakterilerin kullandığı H⁺ iyonlarını indirgemiş olup metan gazını azaltıcı etki gösterebilirler. Ancak rumen ortamında metanojen bakterilere göre sayıları az olduğundan olumlu ve istikrarlı sonuçlar alınamamıştır (38).

2.4.3 Biyoteknolojik Çalışmaların Etkileri

2.4.3.1 İmmünizasyon

Metanojenik bakterilerden izole edilen antijen ile üretilen aşilar ile Rumen protozoonlarına karşı hazırlanan immunojenik preparatlar ruminal metan üretimini % 20 oranında azaltabilmektedir (68). Metan üretimini azaltan bu uygulamanın aynı zamanda canlı ağırlık artışını da yükselttiği bildirilmiştir (69).

2.4.3.2 Defaunasyon

Rumende yaşayan protozoonlar rumende oluşan metan gazı miktarının % 37'sinden sorumludur. Rumende protozoonların bulunmaması durumunda metan oluşumu rasyondan rasyona değişmekle birlikte % 13 oranında azalmaktadır. Defaunasyon sonucu metan gazı oluşumunda meydana gelen azalmanın sebebi olarak kuru madde sindiriminde azalma, metanojen bakteri sayısında azalma, uçucu yağ asiti kompozisyonunda meydana gelen değişiklik ve rumendeki kısmi oksijen basıncındaki azalma gösterilmektedir (70).

Metanojenik bakteriler rumende protozoonların yakınında ya da protozoonların endoplazmik retikulumlarında yaşarlar. Böylece protozoon metabolizmasında açığa çıkan hidrojen iyonlarını tüketerek CH₄ gazını üretirler (71, 72).

Yapılan bir çalışmada defaunasyon işlemi ile metan gazının % 9-61 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Ancak defaunasyon işlemi sindirilebilirliği negatif etkilediği için ve uygun şartlarda kullanımı zor olduğu için pratikte kullanımı uygun olmayan işlemdir (73).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 .Materyal

3.1.1. Yem Materyali

Araştırmada kullanılan yem materyallerinden yonca ve çayır kuru otları Türkiye Jokey Kulübü Şanlıurfa Pansiyon Harasından, mısır silajı ve buğday samanı Harran Üniversitesi Hayvancılık Araştırma Ünitesinden temin edilmiştir. Araştırmada probiyotik olarak *Saccharomyces boulardii* (Reflor) *Lactobacillus rhamnosus* (Kaleidon 30) *Bifidobacterium lactis* (Maflor) içeren ticari preparatlar kullanılmıştır.

3.1.2. Rumen Sıvısı

Rumen sıvısı mezbahada yeni kesilmiş hayvanlardan elde edilmiştir. Elde edilen rumen sıvısı önceden içersinde sıcak su ve CO₂ bulunan termosla hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler

Resazurin Çözeltisi:

Resazurin: 1mg/ ml

Mikromineral Czeltisi:

MnCl ₂ (4H ₂ O)	: 505 mM
CaCl ₂ (2H ₂ O)	: 897 mM
CoCl ₂ (6H ₂ O)	: 42 mM
FeCl ₃ (6 H ₂ O)	: 296 mM

Makromineral Czeltisi:

KH ₂ PO ₄	: 46 mM
Na ₂ HPO ₄	: 40 mM
MgSO ₄ (7H ₂ O)	: 2,4 mM
pH:	6,8

Tampon (Buffer) Czeltisi:

KH ₂ PO ₄	: 46 mM
Na ₂ HPO ₄	: 40 mM
MgSO ₄ (7H ₂ O)	: 2,4 mM
pH:	6,8

İndirgeme (Redksiyon) Czeltisi:

NaOH	: 0,04 N
Na ₂ S (7H ₂ O)	: 28 mM

Suni Tkrk Czeltisi

Yukarıda belirtilen Şekilde hazırlanan czeltiler Woulf ŐiŐesine aşağıda belirtilen miktar ve sıraya gre hazırlanmıştır. Elde edilen bu czelti rumen sıvısı alınmadan nce hazırlanmış olup, su banyosunda CO₂ gazı altında 39°C de manyetik bir karıŐtırıcı ile rumen sıvısının ilavesine kadar hazır halde bekletilmiŐtir.

Saf su	: 474.50 ml
Resazurin çözeltisi	: 1.22 ml
Mikromineral çözeltisi	: 0.12 ml
Makromineral çözeltisi	: 237.23 ml
İndirgeme (redüksiyon) çözeltisi	: 49.44 ml
Tampon (buffer) çözeltisi	: 237.23 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırmada Kullanılan Yemlerin Besin Madde İçeriklerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan yem materyalleri laboratuvar değirmeninde 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür. Kullanılan kaba yemlerin asit deterjan fiber (ADF) ve nötral deterjan fiber (NDF) analizleri Van Soest ve ark. (74) tarafından bildirilen yöntemle, kuru madde, ham protein ve ham kül içeriği analizleri ise AOAC'ye göre yapılmıştır.

3.2.2. İn Vitro Denemenin Yürütülmesi

Her bir yem örneğine ağırlık olarak % 0,1 düzeyinde probiyotik katılmıştır. İşlemler her bir yem maddesi ve her bir probiyotik katkı için dört paralel olacak şekilde yürütülmüştür. İçerisine yem maddesi ve probiyotik katılmamış olan rumen sıvısı kör grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu ve kör gruplarıyla beraber toplam 67 adet örnek oluşturulmuştur.

3.2.2.1.Çözeltilerin Hazırlanması ve Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması

Araştırmada kullanılan *in vitro* gaz üretim tekniği ile 24 saat inkubasyona bırakılan probiyotik karışimli yemle rumen sıvısının etkileşimden açığa çıkan gaz miktarına dayanılarak yem maddelerinin metabolik enerji (ME) içeriği ve *in vitro* organik madde sindirebilirliği hesaplanmıştır.

Rumen Sıvısının Alınması ve İnkubasyonu

Kullanılan gaz üretim tekniği Menke ve Steingass (75) tarafından bildirilen yöntemle yapılmıştır. Rumen sıvısı, kaba parçacıklardan ayrılması için dört kat olacak şekilde katlanmış olan tülbent bezinden CO₂ gazı altında süzölmüştür. Süzölmüş 500 ml rumen sıvısı daha önce hazırlanmış olan 1000 ml suni tükürük çözeltisine ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışıma dışarıdan ince bir hortum vasıtasıyla CO₂ gazı verilerek karışımın rengi mor renkten şeffaf renge dönüşüncüye kadar yaklaşık 15 dakika muamele edilmiştir. Daha önceden yem konulan ve inkubasyon dolabında 39°C de bekletilen özel cam şırıngalara 30 ml rumen sıvısı ilave edilmiştir. Rumen sıvısının ilavesinden sonra şırınganın hava kabarcıkları ortamdan uzaklaştırılmış ve uç kısmında bulunan kısıkaç sıkıştırılmıştır. Elde edilen ilk hacimler okunup kaydedildikten sonra şırıngalar 39°C'de sabit olan özel yapım banyosuna yerleştirilmiştir. Su banyosunda 39°C'de 24 saat bekletilen cam şırıngalar 24. saatin sonunda gaz oluşum değerleri kaydedilmiş, CH₄ ve CO₂ gazı ölçümleri için ise üç yollu şırınga sistemi kullanılarak şırıngalarda oluşan gazlar alınmıştır. Alınan gazlar metan gazı ölçüm cihazına (Sensors Analysentechnik GmbH&Co. KG, Berlin, Germany) enjekte edilerek, bilgisayarda metan gazı değeri yüzde olarak (%) okunmuştur. Kullanılmış olduğumuz gaz üretim tekniğinde her bir örnek için 4 tekerrür olacak şekilde çalışılmıştır. Ölçüm sonunda cam şırıngalarda kalan Rumen sıvısı ve yem karışımı 4 kat tülbent bezinden süzöldükten sonra pH değerleri okunmuştur. Elde edilen örnekler daha sonra yapılacak amonyak azotu (NH₃-N) analizlerinde kullanılmak için derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2.2. In-Vitro Organik Madde Sindirimi (İVOMS) ve Metabolik Enerji (ME) İçeriklerinin Hesaplanması

Elde edilen gaz miktarları belirlendikten sonra aşağıdaki eşitlikler kullanılarak İVOMS ve ME değerleri hesaplanmıştır.

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

$$\text{ME (MJ / kg KM)} = 2.20 + 0.136\text{GÜ} + 0.057\text{HP}$$

$$\text{GÜ} = 24 \text{ saatlik fermentasyon sonucu açığa çıkan gaz miktarı (ml).}$$

$$\text{HP} = \text{Yemin ham protein içeriği (\%, KM).}$$

HK = Yemin ham kül içeriği (% , KM).

3.2.3. Rumen Sıvısının pH Değerinin Hesaplanması

Rumen sıvısı çift kat bezden süzöldükten sonra sıcaklığı değişmeden elektronik bir pH metre (Hanna, Fransa) ile hemen ölçümü yapılmıştır.

3.2.4. Rumen Sıvısının Amonyak Azot Analizi

Rumen sıvısının amonyak azot analizi Markham distilasyon yöntemi ile yapılmıştır

3.2.5. İstatiksel Analiz

Çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar SPSS paket programının GLM prosedüründe değerlendirilmiştir. Analizde kaba yem çeşidi ve probiyotik katkı sabit etki olarak alınmıştır. Gruplar arası farklılığın önem düzeyi Duncan testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS (11.2) paket programından faydalanılmıştır.

4.BULGULAR

Çalışmada kullanılan kaba yemlerin ham besin madde içerikleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Tablodan çıkan sonuçlara göre ham besin kaynaklarından ham proteinin değeri yüksek, ADF, NDF ve selüloz değerlerinin ise normal sınırlar aralığında olduğu görülmüştür.

Tablo 3: Kullanılan Kaba Yemlerin Ham Besin Madde (% KM) İçerikleri

Kaba Yemler	KM	HK	ADF	NDF	HP
Buğday Samanı	95.06	10.11	51.01	79.05	4.84
Çayır Kuru Otu	96.53	8.21	40.97	70.46	6.69
Yonca Kuru Otu	94.46	10.38	31.92	40.24	18.56
Mısır Silajı	93.19	4.91	29.59	54.26	6.52

Çalışmada kullanılan buğday samanına ilave edilen probiyotiklerin *in vitro* gaz üretimi ve diğer parametreler üzerine etkileri Tablo 4'de sunulmuştur. Buğday samanında toplam gaz miktarı, CH₄ miktarı, CH₄ yüzdesi, CO₂ miktarı, CO₂ yüzdesi, İVOMS ve ME değerleri açısından uygulama grupları arasında (Kontrol, *L. rhamnosus*, *B. lactis* ve *S. boulardi*) istatistiksel olarak önemli farklılık gözlenilmiştir (P<0.05). Amonyak azotu, pH değerleri açısından gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur (P>0.05). Buğday samanında 24 saat sonunda oluşan toplam gaz hacmi (ml/ g KM) bakımından en yüksek değer *L. rhamnosus*, en düşük değer ise *B. lactis* grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu ile *B. lactis* grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). *In vitro* CH₄ üretimi açısından (ml/ g KM) probiyotik grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel fark bulunmazken (P>0.05) *L. rhamnosus* ve *B. lactis* grupları arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0.05). Buğday samanında IVOMS ve ME bakımından en yüksek değer *L. rhamnosus*, en düşük değer ise *B. lactis* grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu ile *B. lactis* grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli iken (P<0.05) *L. rhamnosus* grubu ile kontrol grubu arasındaki

fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Çayır kuru otuna ilave edilen probiyotiklerin *in vitro* gaz üretimi ve diğer parametreler üzerine etkileri Tablo 5’de sunulmuştur. Çayır kuru otunda toplam gaz miktarı, CH₄ miktarı, CO₂ miktarı, pH, İVOMS ve ME değerleri açısından uygulama grupları arasında (Kontrol, *L. rhamnosus*, *B. lactis* ve *S. boulandii*) istatistiksel olarak önemli farklılık gözlenmiştir ($P<0.05$). CH₄ yüzdesi, CO₂ yüzdesi, amonyak azotu değerleri açısından gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Toplam gaz miktarı, CH₄ miktarı, CO₂ miktarı, pH, İVOMS ve ME değerleri bakımından *L. rhamnosus* grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Bu parametreler açısından *L. rhamnosus* grubunun değerleri kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. En yüksek pH değeri *S. boulandii* grubunda gözlenmiştir. *S. boulandii* grubu ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunurken ($P<0.05$), *S. boulandii* grubu ile *L. rhamnosus* ve *B. lactis* grupları arasındaki değer önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Çayır kuru otunda İVOMS ve ME bakımından en yüksek değer *L. rhamnosus*, en düşük değer ise kontrol grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu ile *L. rhamnosus* grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli iken ($P<0.05$) *B. lactis* ve *S. boulandii* grupları ile kontrol grubu arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$).

Çalışmada kullanılan silaja ilave edilen probiyotiklerin *in vitro* gaz üretimi ve diğer parametreler üzerine etkileri Tablo 6’da sunulmuştur. Silajda sadece pH değeri açısından uygulama grupları arasında (Kontrol, *L. rhamnosus*, *B. lactis* ve *S. boulandii*) istatistiksel olarak önemli farklılık gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Toplam gaz miktarı, CH₄ miktarı, CH₄ yüzdesi, CO₂ miktarı, CO₂ yüzdesi, amonyak azot, İVOMS ve ME değerleri açısından uygulama grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Silaj grubunda 24 saat sonunda en düşük pH değeri *L. rhamnosus* grubunda oluşmuştur. Kontrol grubu ile *L. rhamnosus* arasındaki istatistiksel fark önemli bulunurken ($P<0.05$), *B. lactis* ve *S. Boulandii* grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$).

Çalışmada kullanılan yonca kuru otuna ilave edilen probiyotiklerin *in vitro* gaz üretimi ve diğer parametreler üzerine etkileri Tablo 7’de sunulmuştur. Yonca kuru otunda toplam gaz miktarı, CH₄ miktarı, CH₄ yüzdesi, CO₂ miktarı, CO₂ yüzdesi, pH, amonyak azot, İVOMS ve ME değerleri açısından uygulama grupları arasında (Kontrol, *L. rhamnosus*, *B. lactis* ve *S. boulandii*) istatistiksel olarak farklılık önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$)

Tablo 4: Buğday Samanına İlave Edilen Probiyotiklerin *In Vitro* Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi (ortalama±SE)

	Kontrol	L. rhamnosus	B. lactis	S. boulardii
Gaz Hacmi (ml/ g KM)	155.89 ±6.40 ^a	162.30 ±1.67037 ^a	135.89 ±3.91477 ^b	152.29 ±3.08256 ^a
CH ₄ (%)	15.90 ±0.07 ^a	16.80 ±0.46368 ^{ab}	16.57 ±0.13150 ^{ab}	17.57 ±0.43084 ^b
CH ₄ Hacmi (ml/ g KM)	13.23 ±0.94 ^{ab}	15.49 ±0.75974 ^a	10.8125 ±0.71355 ^b	15.0600 ±0.75625 ^a
CO ₂ (%)	84.10 ±0.07 ^a	83.2000 ±0.46368 ^{ab}	83.4250 ±0.13150 ^{ab}	82.4250 ±0.43084 ^b
CO ₂ Hacmi (ml/ g KM)	83.72 ±4.66 ^a	86.8425 ±1.55981 ^a	65.4025 ±3.41099 ^b	77.6475 ±2.81392 ^a
pH	6.88 ±0.02	6.8750 ±0.01936	6.8850 ±0.01190	6.8725 ±0.01250
NH ₃ -N (mg/dl)	21.120 ±4.06	21.053 ±3.14395	21.067 ±4.76841	22.160 ±6.27800
İVOMS (% KM)	45.01 ±1.14 ^a	46.1500 ±0.29572 ^a	41.4500 ±0.69495 ^b	44.3675 ±0.54790 ^a
ME (MJ/ kg KM)	6.68 ±0.17 ^a	6.8575 ±0.04516 ^a	6.1375 ±0.10578 ^b	6.5850 ±0.08510 ^a

Tablo 5: Çayır Kuru Otuna İlave Edilen Probiyotiklerin *İn Vitro* Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi (ortalama±SE)

	Kontrol	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. boulardii</i>
Gaz Hacmi (ml/ g KM)	175.26 ±6.12 ^b	201.35 ±7.26173 ^a	189.39 ±4.57340 ^{ab}	185.08 ±7.03585 ^{ab}
CH ₄ (%)	17.02 ±0.165	17.3500 ±0.08660	17.3250 ±0.10308	17.3750 ±0.14930
CH ₄ Hacmi (ml/ g KM)	17.86 ±0.79 ^b	22.8250 ±1.34579 ^a	20.6925 ±0.67354 ^{ab}	20.1350 ±1.07963 ^{ab}
CO ₂ (%)	82.98 ±0.17	82.6500 ±0.08660	82.6750 ±0.10308	82.6250 ±0.14930
CO ₂ Hacmi (ml/ g KM)	96.51 ±5.22136 ^b	116.80 ±6.02928 ^a	107.02 ±3.91329 ^{ab}	103.80 ±5.98868 ^{ab}
pH	6.8300 ±0.00913 ^b	6.8600 ±0.02041 ^{ab}	6.8500 ±0.00408 ^{ab}	6.8775 ±0.01702 ^a
NH ₃ -N (mg/dl)	22.160 ±4.40606	22.560 ±5.46016	22.067 ±8.13333	22.787 ±4.90079
İVOMS (% KM)	49.6850 ±1.08581 ^b	54.3275 ±1.29159 ^a	52.1975 ±0.81365 ^{ab}	51.4325 ±1.25099 ^{ab}
ME (MJ/ kg KM)	7.4775 ±0.16630 ^b	8.1850 ±0.19653 ^a	7.8600 ±0.12457 ^{ab}	7.7425 ±0.19128 ^{ab}

Tablo 6: Silaja İlave Edilen Probiyotiklerin *İn Vitro* Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi (ortalama±SE)

	Kontrol	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. boulardii</i>
Gaz Hacmi (ml/ g KM)	215.92 ±8.81509	222.89 ±2.28448	217.35 ±4.85.514	223.78 ±5.66180
CH ₄ (%)	16.5500 ±0.51397	16.6750 ±0.13769	17.0000 ±0.14142	16.8000 ±0.20412
CH ₄ Hacmi (ml/ g KM)	23.8850 ±2.39208	25.3100 ±0.42121	24.9925 ±0.99913	25.7300 ±1.31315
CO ₂ (%)	83.4500 ±0.51397	83.3250 ±0.13769	83.0000 ±0.14142	83.2000 ±0.20412
CO ₂ Hacmi (ml/ g KM)	131.07 ±6.52114	137.20 ±2.00489	131.37 ±3.60507	137.44 ±4.02681
pH	6.8175 ±0.01109 ^a	6.7725 ±0.00854 ^b	6.7975 ±0.01601 ^{ab}	6.8250 ±0.00645 ^a
NH ₃ -N (mg/dl)	21.0133 ±12.8920	21.2133 ±6.69461	21.2000 ±1.05830	20.5067 ±4.89535
İVOMS (% KM)	56.7300 ±1.56867	57.9700 ±0.40778	56.9825 ±0.86368	58.1300 ±1.00596
ME (MJ/ kg KM)	8.5850 ±0.24154	8.7725 ±0.06156	8.6250 ±0.13219	8.7975 ±0.15326

Tablo 7: Yonca Kuru Otuna İlave Edilen Probiyotiklerin *İn Vitro* Gaz Oluşumu ve Diğer Değerler Üzerine Etkisi (ortalama±SE)

	Kontrol	L. rhamnosus	B. lactis	S. boulardii
Gaz Hacmi (ml/ g KM)	215.90 ±4.70321	226.96 ±2.40306	226.14 ±3.63362	215.26 ±7.20379
CH ₄ (%)	17.3750 ±0.22867	16.9000 ±0.26141	17.3250 ±0.28687	17.3750 ±0.24622
CH ₄ Hacmi (ml/ g KM)	25.3700 ±0.39130	26.2125 ±0.60461	27.1100 ±1.20442	25.2700 ±0.87265
CO ₂ (%)	82.6250 ±0.22867	83.1000 ±0.26141	82.6750 ±0.28687	82.6250 ±0.24622
CO ₂ Hacmi (ml/ g KM)	1.2882 ±4.29548	1.3890 ±2.23715	1.3741 ±2.43482	1.2843 6.64737
pH	6.8775 ±0.01031	6.8650 ±0.00289	6.8875 ±0.01109	6.8975 ±0.01250
NH ₃ -N (mg/dl)	27.3467 ±5.72402	28.0267 ±9.97419	26.9067 ±3.15242	27.6533 ±9.55080
İVOMS (% KM)	59.7200 ±0.83785	61.6875 ±0.42611	61.5425 ±0.64719	59.6050 ±1.28147
ME (MJ/ kg KM)	9.3025 ±0.12874	9.6050 ±0.06357	9.5825 ±0.09986	9.2825 ±0.19691

5. TARTIŞMA

Yemlerin sindirilebilirlik düzeylerinin, amonyak ve metan gazı üretiminin belirlenmesinde ve enerji düzeyinin tahmin edilmesinde *in vitro* yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (76-79). Metan düzeyinin azaltılmasına yönelik araştırmalarda kullanılan *in vitro* fermentasyon yönteminin pahalı olmayan bir yöntem olduğu ancak detaylı araştırmalar için *in vivo* yöntemlerin kullanılması gerektiği bildirilmektedir (79). Gaz üretimi tek başına *in vitro* gerçek sindirilebilirlik için zayıf bir göstergedir. Fakat ham protein ve selüloz olmayan karbonhidrat ve yağ düzeylerinin tahmin denklemlerine dahil edilmesi gaz üretimine dayanılarak *in vitro* gerçek sindirilebilirlik tahminlerini iyileştirmektedir. Selüloz olmayan karbonhidrat düzeyi ile gaz üretimi arasında güçlü pozitif bir korrelasyon bulunmaktadır. Ulaşılabilir ham protein düzeyi ile gaz üretimi arasında ise negatif bir ilişki bulunmaktadır (80). Sindirilme derecesi yüksek yem maddeleri açısından *in vitro* yöntemle elde edilen değerlerin *in vivo* yöntemler ile elde edilen değerlerden daha düşük iken, kaba yemler için bulunan değerlerin ise *in vivo* yöntemlerle elde edilen değerlere benzer olduğu bildirilmiştir (80).

Sunulan çalışmada toplam gaz miktarı buğday samanında en düşük ($155,89 \pm 4,40$ ml/g KM), yonca ($215,90 \pm 4,73$ ml/g KM) ve silajda ise ($215,92 \pm 8,81$ ml/g KM) en yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu yemlerin IVOMS değerleri ile oluşan gaz miktarı arasında yüksek düzeyde bir korrelasyon olduğunu bildiren araştırma bulguları ile uyumludur (76, 81).

Araştırmada kullanılan *B. lactis*'in tri- ve tetra sakkaritleri kullandığı bildirilmiştir. Laktat rumende propiyonik asit üretimi sırasında ara bir bileşiktir. Propiyonat üretimi ise hidrojen kullanımı açısından metan üretimi ile yarış halinde olan bir süreçtir. *Bifidobacterium* ve *lactobacillus* türleri galakto oligosakkaritleri kullanabildiğinden ve daha fazla laktat üretebileceğinden metan üretimini azaltması beklenir (82).

Sunulan çalışmada *B. lactis*in buğday samanında oluşan toplam gaz hacmini ve metan miktarını (ml/g KM) kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlenmiştir. Diğer taraftan *B. lactis* ilavesi IVOMS'ni de önemli ölçüde düşürmüştür. Bu nedenle *B. lactis* grubunda metan oluşumundaki azalma IVOMS'nin düşmesinden kaynaklanmış olabilir. Buğday samanına ilave edilen *B. lactis*'in *in vitro* sindirilebilirlik ve gaz üretimi üzerine etkisi hakkında literatür bir veriye rastlanmamıştır. Ancak Tan ve ark. (78) değişik konsantrasyonlarda kondanse tanen (KT) ilave edilmiş *Panicum maximum* bitkisi üzerinde yaptıkları araştırmada artan KT ilavesinin metan üretimini azaltırken *in vitro* kuru madde sindirimini de düşürdüğünü göstermiştir. Benzer şekilde Akçil ve Denek (61) çayır kuru otuna farklı düzeyde okaliptus yaprağı (*Eucalyptus camaldulensis*) ilave edildiğinde ilave edilen okaliptus yaprağı seviyesindeki artışa bağlı olarak oluşan metan miktarı ile birlikte IVOMS'nin düştüğünü bildirmiştir.

Rumen ya da rumen benzeri ortamların mikroflorası üzerine *B. lactis*'in etkisi konusunda yayınlanmış bir veriye rastlanmamıştır. Ancak *B. lactis* tüketiminin yaşlı insan ve ratların barsaklarındaki lactobacillus türü bakteri sayısını artırırken enterococcus türü bakterilerin *E. coli* sayısını azalttığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (83-86). *Bifidobacterium lactis*'in bağırsaklardan geçiş hızını artırması nedeniyle kabızlığa karşı kullanılabileceği bildirilmiştir (87). İnsanlarda diyet ile alınan *B. lactis*'in doğal immuniteyi teşvik ettiği gösterilmiştir (88).

Çayır kuru otuna *L. rhamnosus* ilavesi toplam gaz üretimi ve oluşan metan miktarını (ml/g KM) kontrol grubuna göre arttırdığı halde oluşan toplam gaz miktarı içerisindeki metan gazı oranını etkilememiştir. Diğer taraftan *L. rhamnosus* ilavesi IVOMS'ni de önemli ölçüde arttırmıştır. Bu nedenle *L. rhamnosus* grubunda metan oluşumundaki artma IVOMS'nin artmasından kaynaklanmış olabilir. Raju ve ark. (89) çayır otunda IVOMS ile biyokimyasal metan potansiyeli arasında orta düzeyde bir korrelasyon ($R^2= 0,41$) olduğunu bildirmiştir. *Bifidobacterium lactis* ve *Lactobacillus rhamnosus*'un kültür ortamındaki *E.coli* sayısını ve yayılma ve hücrelere tutunma yeteneğini azalttığı bildirilmiştir (83). Bu nedenle *B. lactis*'in buğday samanında IVOMS'ni azaltması ve *L. rhamnosus* ilavesinin ise çayır otunda IVOMS'ni arttırması bu bakterilerin *in vitro* ortamdaki mikroflora kompozisyonunu değiştirmesinden kaynaklanabilir.

Sunulan çalışmada kullanılan kaba yemlere *S. boulardii* ilavesinin buğday samanında toplam gaz hacmini, metan miktarını (ml/g KM) ve IVOMS'ni etkilemediği ancak toplam gaz

içerisindeki metan yüzdesini arttırdığı gözlenmiştir. Mutsvangwa ve ark (66) rasyona *S. cereviciae* ilavesinin *in vitro* metan üretimini 12 saat inkubasyon sonunda önemli ölçüde azaltırken 24 saat inkubasyonun *in vitro* metan üretimini etkilemediğini bildirmiştir. Opsi ve ark. (90) karışık ruminant rasyonlarına canlı maya (*S. cereviciae*) katılmasının toplam gaz üretimini, metan oluşumunu ve İVOMS'ni arttırdığını bildirmiştir.

Lynch ve Martin (91) yaptıkları çalışmada 48 saat inkubasyon sonunda canlı maya katılmasının yoncada metan üretimini % 20 oranında azalttığını bildirmiştir. Bununla birlikte farklı maya suşlarıyla yapılan *in vivo* (92) ve *in vitro* (93) çalışmalar farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Newbold ve ark (94) farklı *S. cereviciae* suşlarının rumendeki bakteri kompozisyonunu farklı düzeylerde etkilediğini ve selülitik bakteri sayısını arttırdığını bildirmiştir.

In vitro çalışmalar metanojenlerin varlığında bile kuzu rumeninden izole edilen asetojenik bakterilerin gelişimi, hidrojen kullanımı ve asetat üretimi üzerine canlı mayanın olumlu etkilerini göstermiştir. Fakat bu etkiler *in vivo* olarak gösterilmemiştir. Benzer şekilde sığır rasyonlarına maya ilavesinin alınan enerjiye orantılandığında metan üretimini etkilemediği bildirilmiştir (95). Opsi ve ark (90) mayanın etkisinin görülebilmesi için belirli bir adaptasyonun gerektiğini ve mayanın rumen fermentasyonu üzerine etkisinin yemin bileşimine bağlı olduğunu vurgulamıştır.

6. SONUÇ

Sonuç olarak *B. lactis* ilavesinin buğday samanında *in vitro* gaz oluşumu, metan oluşumu ve IVOMS'ni azalttığı, *L. rhamnosus* ilavesinin ise çayır kuru otunda *in vitro* gaz oluşumu, metan oluşumu ve IVOMS'ni arttırdığı tespit edilmiştir. Kaba yemlere ilave edilen *S. bouardii*'nin ise buğday samanında *in vitro* gaz oluşumu, metan oluşumu ve IVOMS'ni etkilemediği halde toplam gaz içerisindeki metan yüzdesini arttırdığı tespit edilmiştir. Probiyotikler hayvan yemlerine katıldığında hayvan sağlığı üzerinde olumlu etkiler meydana getirmektedir (96). Sunulan çalışmada her bir kaba yem kaynağının kuru madde miktarının % 0,1'i kadar probiyotik katılmıştır. Metan gazı üretiminin azaltılması amacıyla kullanılan katkı maddelerinin ya da uygulanan yöntemlerin aynı zamanda ekonomik olarak da sürdürülebilir olması gereklidir. Sunulan çalışmada buğday samanına katılan *B. lactis* dışındaki probiyotik mikroorganizmalar metan gazı üretimini arttırmış ya da etkilememiştir. Bu nedenle sunulan çalışmada kullanılan probiyotiklerin metan gazını azaltmak amacıyla kullanılmasının gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte *L. rhamnosus* ilavesi çayır kuru otunda IVOMS'ni arttırdığından *L. rhamnosus* ilavesinin *in vivo* şartlarda yemden yararlanmayı arttırıp arttırmayacağı konusunun araştırılması gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Öztürk H. Küresel ısınmada ruminantların rolü. Veteriner Hekimler Derneği Derg., 2007; 78(1): 17-22.
2. Meral Y, Biricik H. Ruminantlarda metan emisyonunu azaltmak için kullanılan besleme yöntemleri. VII. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı), 2013; 26-27.
3. Kocaoğlu Güçlü B, Kara K. Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 2.organik asit, yağ asiti, adorbun. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.,2010; 7(1): 43-52.
4. Faverdin P. The effect of nutrients on feed intake in ruminants. Proceedings of the Nutrition Society, 1999; 58(03): 523-531.
5. Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. Journal of animal science, 1995; 73(8): 2483-2492.
6. IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change) 2001. Climate change 2001. The scientific basis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
7. Russell JB, Strobel HJ. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 1989; 55(1): 1.
8. OJEU 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Official Journal of European Union. Page L268/36 in OJEU of 18/10/2003
9. Kaya A, Kaya H, Çelebi Ş. Ruminant Hayvanlarda Metan Üretimini Azaltmaya Yönelik Çalışmalar/Studies to Reduce The Production of Methane from Ruminant. Journal of the Faculty of Agriculture, 2012; 43(2).
10. Crawford JS. "Probiotics" in Animal Nutrition. Proceeding 1979 Arkansas Nutrition Conference Usa. 1979; 45-55.
11. Jernigan MA, Miles RD, Arafa AS. Probiotics in Poultry Nutrition. A -World's Science, 1985; 41(2): 99-107.
12. Fuller R. Basis And Efficacy Of Probiotics. World's Poultry Science. 1988; 44: 69-70.
13. Kahraman R, Alp M, Kocabağlı N, Irmak G, Şenel HS. The effects of fastrack and Sodium Bicarbonate on performance of broilers. Tr. J.Of Veterinary and Animal Sciences, 1996; 20: 383-386.
14. Yalçın S, Çiftçi İ, Önal AG, Yılmaz A. Tuyem " 3. Uluslararası Yem Kongresi Ve Yem Sergisi". 1996; 30-33.
15. Fuller R. A Review. Probiotics İn Man And Animals. J.Appl. Bact., 1989; 66: 365-378.
16. Coşkun T. Pro-, pre-ve sinbiyotikler. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 2006; 49: 128-148.

17. Alçiçek A, Şayan Y ve Özkul H. Ruminantların beslenmesinde probiyotik kullanımında yeni gelişmeler, hayvansal üretim, 1998; 38: 32-38.
18. Sarıca Ş. Kanatlı hayvan beslemede probiyotik kullanımı. Hayvansal Üretim, 1999; 39(40): 105-112.
19. Häckel, H. Meteorologie, 4. Auflage, Ulmer, Stuttgart, 1999.
20. Duxbury JM, Harper LA, Mosier AR. Contributions of agroecosystems to global climate change, in: Harper LA, Mosier AR, Duxbury JM, Rolston DE. (Eds.), Agroecosystem Effects on Radiatively Important Trace Gases and Global Climate Change, ASA Special Publication No. 55, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1993; 1-18
21. Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, De Haan C. Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options. FAO, Food Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.afpfasso.org/afpf/vie/vie/images/FAOLivestock-Environment.pdf>, 2006 (Erişim tarihi: 03.01.2007).
22. O'Mara FP. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. Animal Feed Science and Technology, 2011; 166: 7-15.
23. Akın G. Küresel ısınma, nedenleri ve sonuçları. Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi. 2006; 46(2): 29-43
24. Anonim, 2002. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2002. Climate change and biodiversity”, IPCC Technical PaperV. <http://www.ipcc.ch/pub/tpbiodiv.pdf> (Erişim tarihi: 23.10.2015)
25. ANONİM. UN. Kyoto protocol to the United Nations framework convention on climate change, United Nations, <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>, 1998. Erişim tarihi: 28.04.2016.
26. ANONİM: TÜİK. Konularına Göre İstatistikler. Çevre İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/PreTabloArama.do>, 2016 (Erişim Tarihi 04.05.2016)
27. Aydın G, Karakurt İ, Aydiner K. Antropojenik metan emisyonlarının sektörel analizi. TÜBAV Bilim Dergisi, 2011; 4(1): 42-51.
28. Vabitsch AM. Qualitativer Vergleich von Modellen zur Bewertung von Klimaschutzmaßnahmen in Europa unter besonderer Berücksichtigung der Landwirtschaft. Doktora Tezi, Stuttgart. 2006.
29. IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change) (2007): Climate Change 2007. The Physical Scientific Basis. Website:<http://www.ipcc.ch>
30. Demeyer DI, Fiedler D, De Graeve KG. Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation in vitro. Reproduction Nutrition Development, 1996; 36(3): 233-240.
31. Oliveria SG, Berchielli TT, Pedreira MS, Primavesi O, Frighetto R, Lima MA. Effect of tannin level in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. Anim. Feed Sci. Technol, 2007; 135: 236-248.
32. Hindrichsen IK, Wettstein HR, Machmüller A, Soliva CR, Bach Knudsen KE, Madsen J, Kreuzer M. Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. Canadian journal of animal science, 2004; 84(2): 265-276.

33. Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science*, 2000; 80(3): 473-484.
34. Jouany JP. Manipulation of microbial activity in the rumen. *Archives of animal Nutrition*, 1994; 46(2): 133-153.
35. Giger-Reverdin S, Morand-Fehr P, Tran G. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock Prod. Sci.*, 2003; 82: 73–79.
36. McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, Colombatto D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of animal science*, 2004; 82(11): 3346-3356.
37. Grainger C, Beauchemin KA. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Animal feed science and technology*, 2011; 166: 308-320.
38. Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Massé D. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 2004; 84(3): 319-335.
39. Immig I. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1996; 42: 57–72
40. Clapperton JL. The effect of trichloroacetamide chloroform linseed oil given into the rumen of sheep on some of the end products of rumen digestion, *Brit. J. Nutr.* 1974; 32 : 155–161.
41. Lanigan GW, Payne AL, Peterson JE. Antimethanogenic drugs and heliotropium europaeum poisoning in penned sheep, *Aust. J. Agric. Res.* 1978; 29: 1281–1291.
42. Moss AR, Jouany JP, Newbold J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming, *Ann. Zootech.* 2000; 49: 231-253.
43. Martin SA, Macey JM. Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulfonic acid on rumen fermentation in vitro, *J. Anim. Sci.* 1985; 60: 544–550.
44. Sauer FD, Teather RM. Changes in oxidation-reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited, *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 1835–1840.
45. Martin SA. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *Journal of animal science*, 1998; 76(12): 3123-3132.
46. Asanuma N, Iwamoto M Hino T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 1999; 82(4): 780-787.
47. Castillo C, Benedito JL, Méndez J, Pereira V, Lopez-Alonso M, Miranda M, Hernández J. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 2004; 115(1): 101-116.
48. Yesilbag D. Fitobiyotikler. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 2007; 26(1-2): 33-39.
49. Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 2006; 1293: 156-163.
50. Woodward SL, Waghorn GC, Ulyatt MJ, Lassey KR. Early indications that methane emissions from ruminants, *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 2001; 61: 23-26.
51. Waghorn MH, Tavendale DR, Woodfield. Methanogenesis from forages fed to sheep, *Proc. N.Z. Grassl. Assoc.* 2002; 64: 167-171.

52. Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 2005; 123: 403-419.
53. Carulla JE, Kreuzer M, Machmuller A, Hess HD. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 2005; 56: 961-970.
54. Fievez V, Dragomir C, Mbanzamihiogo L, Demeyer D. Clover saponins as methane inhibitors and their effect on rumen N-utilisation efficiency as studied in vitro and in vivo. *Mededelingen Van De Faculteit Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent*, 2001; 66(4): 299-304.
55. Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR, Machmüller A. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 2003; 109(1): 79-94.
56. Navas-Camacho A, Laredo MA, Cuesta A, Ortega O, Romero M. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate ciliate protozoa from the rumen. In *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology (Germany)*. DLG. 1994.
57. Hu WL, Liu JX, Ye JA, Wu YM, Guo YQ. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 2005; 120(3): 333-339.
58. Broudiscou Y, Papon AF, Broudiscou. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes, *Anim. Feed Sci. Technol.* 2000; 87 : 263-277.
59. Newbold B, Lassalas JP, Jouany. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro, *Lett. Appl. Microbiol.* 1995; 21: 230-234.
60. Krumholz LR, Forsberg CW, Veira DM. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microbiol.* 1983; 29: 676-680.
61. Akçil 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.
62. Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ. Esansiyel yağların sindirim, rumen fermantasyonu ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkileri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 2011; 17(1): 557-565.
63. Cheeke PR. Saponins: surprising benefits of desert plants. *The Linus Pauling Institute Newsletter*, 1998; 4-5.
64. Teferedegne B. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 2000; 59: 209–214.
65. Piva G, Belladonna S, Fusconi G, Sicbaldi F. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *Journal of Dairy Science*, 1993; 76(9): 2717-2722.
66. Mutsvangwa T, Edwards IE, Topps JH, Paterson GFM. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls *Animal Production*, 1992; 55: 35-40.
67. Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995; 61(9): 3466-3467.

68. Ulyatt MJ, Lassey KR. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 2005; 9(2).
69. Baker SK, Gnanasampanthan G, Purser DB, Hoskinson RM. U.S. Patent No. 6,689,354. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2004.
70. Hegarty RS. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Crop and Pasture Science*, 1999; 50(8): 1321-1328.
71. Czerkawski, J. W. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In *Proceedings of 6th International Symposium on Ruminant Physiology*, Banff (Canada), 10-14 Sep 1984. Prentice-Hall. 1986.
72. Williams AG, Coleman GS. The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands. 1997; 73-139.
73. Iqbal MF, Cheng YF, Zhu WY, Zeshan B. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008; 24(12): 2747-2755.
74. Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 1991; 74(10): 3583-3597.
75. 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(1): 7-55.
76. Al-Masri MR. An in vitro evaluation of some unconventional ruminant feeds in terms of the organic matter digestibility, energy and microbial biomass. *Tropical animal health and production*, 2003; 35(2): 155-167.
77. Forejtová J, Lád F, Trínáctý J, Richter M, Gruber L, Doležal P, Pavelek L. Comparison of organic matter digestibility determined by in vivo and in vitro methods. *Czech Journal of Animal Science*, 2005; 50(2): 47-53.
78. Tan HY, Sieo CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD, Ho YW. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal feed science and technology*, 2011; 169(3): 185-193.
79. Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2012; 96(3): 365-375.
80. Getachew G, DePeters EJ, Robinson PH, Fadel JG. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*, 2005; 123: 547-559.
81. Blümmel M, Becker K. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *British Journal of Nutrition*, 1997; 77(05): 757-768.
82. Santoso B, Kume S, Nonaka K, Kimura K, Mizukoshi H, Gamo Y, Takahashi J. Methane emission, nutrient digestibility, energy metabolism and blood metabolites in dairy cows fed silages with and without galacto-oligosaccharides supplementation. *Asian Australasian Journal Of Animal Sciences*, 2003; 16(4): 534-540.

83. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 2001; 67(3): 207-216
84. Gopal PK, Prasad J, Gill HS. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10 TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. *Nutrition Research*, 2003; 23(10): 1313-1328.
85. Lesniewska V, Rowland I, Cani PD, Neyrinck AM, Delzenne NM, Naughton PJ. Effect on components of the intestinal microflora and plasma neuropeptide levels of feeding *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium lactis*, and inulin to adult and elderly rats. *Applied and environmental microbiology*, 2006; 72(10): 6533-6538.
86. Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *The journal of nutrition, health aging*, 2007; 11(1): 26
87. Agrawal A, Houghton LA, Morris J, Reilly B, Guyonnet D, Goupil Feuillerat N, Whorwell PJ. Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Alimentary pharmacology therapeutics*, 2009; 29(1): 104-114.
88. Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *European journal of clinical nutrition*, 2000; 54(11): 849-855.
89. Raju CS, Ward AJ, Nielsen L, Møller HB. Comparison of near infra-red spectroscopy, neutral detergent fibre assay and in-vitro organic matter digestibility assay for rapid determination of the biochemical methane potential of meadow grasses. *Bioresource technology*, 2011; 102(17): 7835-7839.
90. Opsi F, Fortina R, Tassone S, Bodas R, López S. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro ruminal fermentation of diets with different forage: concentrate ratio. *The Journal of Agricultural Science*, 2012; 150(02): 271-283.
91. Lynch HA, Martin SA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Dairy Science*, 2002; 85(10): 2603-2608
92. Mathieu F, Jouany JP, Senaud J, Bohatier J, Bertin G, Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 1996; 36(3): 271-287.
93. Lila ZA, Mohammed N, Yasui T, Kurokawa Y, Kanda S, Itabashi H. Effects of a twin strain of live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*, 2004; 82(6): 1847-1854.
94. Newbold CJ, Wallace RJ, Chen XB, McIntosh FM. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *Journal of animal science*, 1995; 73(6): 1811-1818.
95. Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 2008; 145(1): 5-26.

96. Chaucheyras-Durand F, Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 2010; 1(1): 3-9.

