

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

**FARKLI SEVİYELERDE OKALİPTUS (*Eucalyptus  
camaldulensis*) YAPRAĞININ BAZI KABA YEMLERİN  
*İN VİTRO* METAN GAZI ÜRETİMİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eyyüp AKÇİL

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Nihat DENEK

ŞANLIURFA  
2013

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

**FARKLI SEVİYELERDE OKALİPTUS (*Eucalyptus  
camaldulensis*) YAPRAĞININ BAZI KABA YEMLERİN  
*İN VİTRO* METAN GAZI ÜRETİMİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eyyüp AKÇİL

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Nihat DENEK

Bu tez, Hr.Ü Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından HÜBAK-12184 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA  
2013

HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Eyyüp AKÇİL'in hazırladığı "Farklı Seviyelerde Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) Yaprığının Bazı Kaba Yemlerin *In Vitro* Metan Gazı Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması" konulu çalışma, 18/06/2013 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah CAN  
Harran Üniversitesi  
BAŞKAN



Prof. Dr. Nihat DENEK (Danışman)  
Harran Üniversitesi  
ÜYE



Doç. Dr. Mehmet AVCI  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

ONAY  
18.06.2013  
Prof. Dr. Nuri AKSOY  
Enstitü Müdürü

## **TEŐEKKÖR**

Yüksek lisans eğitimin ve tezimin hazırlanması süreçlerinde, sürekli ilgisi, sabrı ve desteği ile kolaylaştıran tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nihat DENEK'e ve ders hocalarım sayın Doç. Dr. Mehmet AVCI ve Yrd. Doç. Dr. Oktay KAPLAN'a, denemelerin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Adem KAMALAK ile Arş. Gör. Ali İhsan ATALAY'a, çalışmanın yürütülmesinde mali kaynak sağlayan Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına ve yüksek lisans tez sürem boyunca desteklerini esirgemeyen eşim ve kızıma teşekkür ederim.

**Eyyüp AKÇİL**

**2013**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii-iii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
RESİMLER DİZİNİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Metan Gazı ve Küresel Isınmaya Etkisi.....	2-4
2.2. Ruminantlarda Metan Gazı Üretimi.....	4-5
2.3. Ruminantlarda Metan Gazı Üretiminin Azaltılmasına Yönelik Uygulamalar.....	6
2.3.1.Rasyondaki Karbonhidratın Etkisi.....	6-7
2.3.2.Rasyondaki Yağın Etkisi.....	7-8
2.3.3.Antibiyotik, Probiyotik ve Kimyasal Maddelerin Etkisi.....	8-9
2.3.4.Bitkisel Kaynakların Etkisi.....	10-13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1.Yem Materyali.....	14
3.1.2.Rumen Sıvısı.....	14
3.2.Yöntem.....	14-15
3.2.1.Deneme Yemlerinin ve Okaliptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) Yapraklarının ham besin madde içeriklerinin belirlenmesi.....	14-15
3.2.2.İn Vitro Denemenin Yürütülmesi.....	15-16
3.2.2.1.Çözeltilerin Hazırlanması ve Gaz üretim tekniğinin uygulanması.....	16-18
3.2.2.2.İVOMS ve ME İçeriklerinin Hesaplanması.....	18
3.2.3.Rumen Sıvısında pH değerinin Saptanması.....	18

3.2.4.Rumen Sıvısında Amonyak Azotu Analizi.....	18
3.2.5.İstatistiksel Analizler.....	19-22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23-27</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>28-30</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>31-41</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 1.</b> Türkiyede yıllara göre sığır ve koyun-keçi varlığı .....	3
<b>Tablo 2.</b> Araştırmada kullanılan yem maddeleri ve Okalıptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> )'in ham besin madde (% KM) ile kondanse tanen (g/kg KM) içerikleri....	23
<b>Tablo 3.</b> Mısır silajına farklı seviyelerde Okalıptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı ilavesinin <i>in vitro</i> gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.....	24
<b>Tablo 4.</b> Yonca kuru otuna farklı seviyelerde Okalıptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı ilavesinin <i>in vitro</i> gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.....	24
<b>Tablo 5.</b> Çayır kuru otuna farklı seviyelerde Okalıptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı ilavesinin <i>in vitro</i> gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.....	27
<b>Tablo 6.</b> Buğday samanına farklı seviyelerde Okalıptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı ilavesinin <i>in vitro</i> gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.....	27

## RESİMLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Resim 1.</b> <i>In vitro</i> gaz üretim tekniğinde kullanılan 200 ml ölçekli özel şırıngalar.....	15
<b>Resim 2.</b> <i>In vitro</i> gaz üretim tekniğinde yemlerin tartımı ve şırıngaların vazelinlenmesi...	16
<b>Resim 3.</b> <i>In vitro</i> gaz üretim tekniğinde kullanılan suni tükürük karışımı.....	19
<b>Resim 4:</b> Suni tükürük-rumen sıvısı karışımına CO <sub>2</sub> gazı verilmesi ve şırıngalara konması.....	20
<b>Resim 5:</b> Şırınga pistonlarının şırıngada hava kalmayacak şekilde konumlandırılmaları ve su banyosunda inkubasyonun başlatılması.....	20
<b>Resim 6:</b> Şırıngaların periyodik olarak bilekten çalkalanılarak karıştırılması.....	21
<b>Resim 7:</b> İnkubasyonun 24. saatinde şırıngalardan üç yollu enjektör yardımı ile gazın alınması.....	21
<b>Resim 8:</b> Şırıngalardan alınan gazın bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına enjekte edilmesi.....	22
<b>Resim 9:</b> Bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına enjekte edilen numuneden elde edilen metan gazının (%) ekrandan okunması.....	22



## ÖZET

### Farklı Seviyelerde Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) Yapracağının Bazı Kaba Yemlerin *In Vitro* Metan Gazı Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Eyyüp AKÇİL

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma, ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan bazı kaba yemlere; mısır silajı, yonca kuru otu, çayır kuru otu ve buğday samanına farklı seviyelerde (kontrol, %0.5, %1.0, %1.5, %2.0 ve %2.5) ilave edilen okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağının *in vitro* metan gazı üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave edilmiş deneme yemleri *in vitro* gaz tekniği ile 24 saatlik inkubasyona bırakılmışlardır. *In vitro* gaz üretim tekniği ile 24. saatte oluşan toplam gaz miktarı bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına özel bir düzenele enjekte edilerek metan ve karbondioksit gazı düzeyleri ölçülmüştür. Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağında 17.33 g/kg KM düzeyinde kondanse tanen içeriği tespit edilmiştir. Tüm yem maddeleri için en düşük metan gazı (CH<sub>4</sub>) %2.5 düzeyinde Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir (P<0.05). Karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>) bakımından buğday samanı hariç, %2.5 düzeyinde Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi Karbondioksit gazı değerini azaltmıştır (P<0.05). Tüm yem maddeleri için %2.0 düzeyinde Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi *in vitro* 24. saat rumen sıvısı amonyak azotu değerini azaltmıştır (P<0.05).

Sonuç olarak okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarının kaba yemlere katılması *in vitro* olarak metan ve karbondioksit üretimini azaltmıştır. Ayrıca okaliptus yapraklarının hayvan performansı üzerine etkileri *in vivo* çalışmalarla incelenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Okaliptus, metan üretimi, *in vitro* gaz üretim.

## ABSTRACT

### Investigation of Different Levels Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) Leaf's Effect on *In Vitro* Methane Production of Some Roughages.

Eyyüp AKÇİL

Animal Nutrition and Nutritional Diseases,

Master Thesis

This study was carried out to investigate the effect of addition different levels of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf (control, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% and 2.5%) on the *in vitro* methane production of some roughages (maize silage, alfalfa forage, grass forage and wheat straw). Methane and carbon dioxide production of 24 h incubated roughages inside the syringes were measured with injection of produced gases into special apparatus connected to computer. Condensed tannin content of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf was determined 17.33 g/kg dry matter. The lowest methane (CH<sub>4</sub>) production was determined from the 2.5% eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf containing treatments for all experimental roughages (P<0.05). Similarly, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production was decreased with addition of 2.5% eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf for all roughages except wheat straw (P<0.05). Ammonia N value of 24 h incubated samples of all roughage was decreased with usage of 2% of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf (P<0.05).

As a conclusion addition of the eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) leaf to roughages decreased the methane and carbon dioxide productions with use of *in vitro* procedure. Furthermore effect of eucalyptus leaf on animal performance should be examined with *in vivo* studies.

**Keywords:** Eucalyptus, methane production, *in vitro* gas production.

# 1. GİRİŞ

İnsanların çeşitli fizyolojik ihtiyaçları arasında beslenme ihtiyacı kuşkusuz en önde gelmektedir. Dünya nüfusunun hızlı artışına bağlı olarak bu ihtiyaç daha da önem taşımakta ve küresel ekonomideki payı gün geçtikçe artmaktadır. İnsanlar en azından et ve süt gereksinimlerini karşılamak için ot yiyen hayvanlara bağımlıdırlar. İnsanların öncelikli hayvansal kaynaklı besin maddelerinden et ve süt gereksinimlerinin elde edilmesinde kullanılan yem maddeleri büyük oranda selüloz içermektedirler. Hayvan yemlerinin yapısında bulunan selülozun sindirilmesi ise ancak sindirim sisteminde bulunan ve konakçısı olan hayvanla simbiyotik bir yaşam sürdüren mikroorganizmalar vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Sindirim sisteminde faaliyet gösteren mikroorganizmaların yem maddelerini sindirerek; uçucu yağ asitleri, karbondioksit, metan ve amonyağa dönüştürmektedirler.

Metan gazı küresel ısınmayı etkileyen gazlardan biri olup, yemlerin rumende anaerobik fermentasyonu sırasında oluşmaktadır. Rumende ortaya çıkan ve çevreye atılan metan gazı atmosfere salınan toplam metan gazının %15-18'i olarak kabul edilmektedir. Metan üretiminin çevreye olan etkisinin yanı sıra yemlerle alınan ve rumende metabolize edilen yem enerjisinin yaklaşık %2-12 arasında kaybına sebep olmaktadır. Geçmişte bu olumsuzluğun önlenmesi amacıyla ruminant rasyonlarına iyonofor grubu antibiyotiklerin katılması pratikte uygulanmaktaydı. Ancak Avrupa Birliğine üye ve aday ülkelerde, yemlere katılan antibiyotiklerden kaynaklanan kalıntıların insan sağlığı üzerine yapabileceği olumsuzluklar dikkate alınarak 2006 yılından itibaren yemlere antibiyotik katılması yasaklanmıştır. Bu durumu göz önünde bulunduran araştırmacılar rumen kaynaklı metan gazının çevreye verdiği zararı azaltmak ve yem enerjisinde şekillenen kaybı önlemek amacıyla bitkisel kaynaklı katkıları üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Bu yönde birçok bitkisel katkı ve bunlardan elde edilen esansiyel yağlar kullanılmasına karşın okaliptus bitkisinin yaprağı ve bu yapraklardan elde edilen yağlar ilgili yapılmış çalışma sayısı yok denecek kadar azdır.

Bu çalışma kapsamında, ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan bazı kaba yemlere farklı seviyelerde ilave edilen okaliptus yaprağının *in vitro* metan üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Metan Gazı ve Küresel Isınmaya Etkisi

Dünya üzerinde yaşayan canlılar tarafından atmosfere doğrudan yada dolaylı olarak salınan gazların sera etkisi yaratması sonucunda dünya yüzeyindeki sıcaklığın artmasına küresel ısınma denmektedir. Atmosferde bulunan gazlar yeryüzündeki ısının bir kısmını tutarak yeryüzünün ısı kaybını engellerler. Böylece atmosferin ısıyı tutma özelliği sayesinde yeryüzündeki su kaynaklarının sıcaklığı dengede kalarak bu kaynakların donmasının önüne geçilmiş olur. Böylece atmosferin ısıtma ve yalıtma etkisine sera etkisi adı verilmektedir. Sera gazları (karbondioksit, metan, diazot monoksit ve kloroflorokarbon) doğal olarak doğada bulunurlar. Doğal olarak üretilen bu gazların zararlı etkileri bulunmamakla birlikte aksine atmosferde normal sınırlar içerisinde bulduklarında yeryüzünden uzaklaşan ısının tutulmasına ve dünyada yaşamın devamlılığına olanak sağlayan atmosferik şartların oluşmasına yarar sağlarlar. Ancak son yıllarda artan hava kirliliğine bağlı olarak atmosferdeki karbondioksit ve metan miktarı hızlı bir artış göstermiştir. Bu gazların ısı tutma özelliklerinin yüksek olması sonucunda atmosfer ısısındaki yükselmeye bağlı olarak küresel ısınma ve bunun neticesinde ise buzulların erimesi ve okyanusların yükselmesi gibi ciddi sonuçlar doğuracak iklim değişimlerinden korkulmaktadır (49). Yeryüzünde 19. yüzyılın ortalarından günümüze kadar olan süre içerisinde küresel ortalama hava sıcaklığı 0.5 °C artmış, araştırmalara 2100 yılına gelindiğinde bu artış değerinin 1.8-3.9 °C'ye ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Bunun sonucunda da buzulların önemli ölçüde eriyeceği, denizlerdeki su seviyesinin artacağı, önemli iklimsel değişimlere bağlı olarak kuraklıkların yaşanabileceği tahmin edilmektedir.

Türkiye, küresel ısınma ve iklim değişikliğinden en fazla etkilenebilecek bölgelerden olan Akdeniz havzasında yer almaktadır. Dolayısıyla iklim değişikliklerinin önlenmesi veya olumsuz etkilerinin azaltılması önem taşımaktadır (50). Yapılan çalışmalara göre 2071-2100 yılları arasında Türkiye genelinde 2-3 °C'lik ortalama sıcaklık artışı, Ege ve Akdeniz kıyı şeridinde yağış azalması, Karadeniz kıyısı boyunca yağış artışı öngörülmektedir (92, 93). Ayrıca Türkiye'de 1901-2000 yılları arasında her 10 yıllık periyotlarda sıcaklığın 0.2 °C artış gösterdiği, ortalama yağış miktarında ise %10'luk azalma olduğu, 2071-2100 yılları arasında ise Türkiye'nin batısında ortalama sıcaklığın 3-4 °C, doğusunda ise 4-5 °C artacağı

bildirilmektedir (3). Ülkemizde 1990 yılından itibaren hayvan sayılarının azalmasına bağlı olarak enterik metan salınımı azalmış (Tablo 1), 2009 yılı verilerine göre hayvansal kaynaklı metan emisyonu 707 bin ton olarak belirlenmiştir (119). Ancak 2010-2011 yıllarında çeşitli hibe, teşvik ve ithalat yolu ile hayvansal üretimin cazip hale getirilmesi sonucunda 2010 verilerine göre toplam sığır varlığı 11 369 800'e, koyun-keçi varlığı ise 29 382 924'e, 2011 verilerine göre ise toplam sığır varlığı 12 386 337'e, koyun-keçi varlığı ise 32 309 518'e ulaşmıştır (120, 121). Son iki yıl içerisinde ruminant popülasyonundaki artışa bağlı metan emisyonunda artış olduğu tahmin edilmekle birlikte bu konuda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

**Tablo 1.** Türkiyede yıllara göre sığır ve koyun-keçi varlığı (120, 121).

<b>Yıllar</b>	<b>Toplam Sığır Varlığı, Adet</b>	<b>Toplam Koyun-Keçi Varlığı, Adet</b>
<b>1990</b>	11 564 000	51 479 200
<b>1995</b>	11 191 138	42 902 000
<b>2000</b>	10 830 060	35 693 000
<b>2005</b>	10 564 640	31 821 790
<b>2006</b>	8 707 920	32 260 020
<b>2007</b>	11 067 210	31 748 660
<b>2008</b>	10 891 380	26 887 800
<b>2009</b>	10 756 320	26 877 800
<b>2010</b>	11 369 800	29 382 924
<b>2011</b>	12 386 337	32 309 518

Küresel ısınmanın ortaya çıkardığı ve çıkaracağı olumsuz etkileri azaltmak amacıyla “Kyoto Protokolü” adı altında bir antlaşma hayata geçirilmiştir. Bu antlaşmada, atmosferdeki sera gazı yoğunluğunun, iklime ve tehlikeli etki yapmayacak seviyelerde dengede kalmasını sağlanması hedeflenmektedir. Kyoto Protokolünde amaç, 2008-2012 yılları arasında altı adet sera gazının beş yıllık ortalama salınım değerlerini azaltmaktır. Kyoto Protokolünü kabul eden ülkeler 1990 yılına göre sera gazı salınımlarını %5.2 azaltmakla yükümlüdürler. Türkiye 30 Mayıs 2008’de Kyoto Protokolünü imzalayacağını açıklamış, Ülkemizin Kyoto Protokolüne katılmasının uygun bulunduğuna ilişkin kanun tasarısı 5 Şubat 2009 tarihinde TBMM Genel Kurulunda kabul edilerek yasalaşmıştır (4).

Sera gazı etkisi gösteren metan gazı, diğer gazlardan daha fazla yalıtkanlık yaratan bir gazdır. Metanın küresel ısınma potansiyeli karbondioksit göre 23 kat daha fazla olduğundan küresel ısınma ve sera gazı etkisinin konu alındığı çalışmalarda metan özel bir öneme sahip olmuştur (98, 113). Atmosferdeki metan gazı artışı 1750 yılından bu yana %151’lik artış göstererek 1060 ppm’e ulaşmıştır. Metan miktarındaki bu artışın sanayi ve tarımdaki gelişmelere bağlı olduğu bildirilmekle birlikte metan miktarındaki artışın %29’unun doğal

faktörlerden (volkanik patlamalar ve güneşteki fırtınalar), %71'inin ise insanların çeşitli faaliyetlerinden (tarım, hayvancılık, madencilik, çöplerin depolanması vs.) kaynaklandığı bildirilmektedir (136). Son yıllarda küresel atmosferik metan gazında ortaya çıkan belirgin artışın en önemli nedenlerinden birisi de artan dünya nüfusuna bağlı olarak, hayvancılığın da sayısal olarak artmasıdır. Dünya hayvancılığı 1950 yılından bu yana dört kat artış göstermiştir (123). Ruminantların ruminal metan gazı üretimleri sebebiyle, hayvansal kaynaklı metan üretiminden öncelikli olarak ruminantlar sorumludurlar. Birleşmiş milletler gıda ve tarım örgütü (FAO)'nun verilerine göre dünya üzerinde 56 milyar kasaplık hayvan bulunduğunu, bu değer 2050 yılı itibarıyla iki katına çıkacağını (31, 113) ve küresel ısınma üzerine etkili olan faktörlerden birisinin de ruminant hayvan popülasyonu olduğu düşünülmektedir (122).

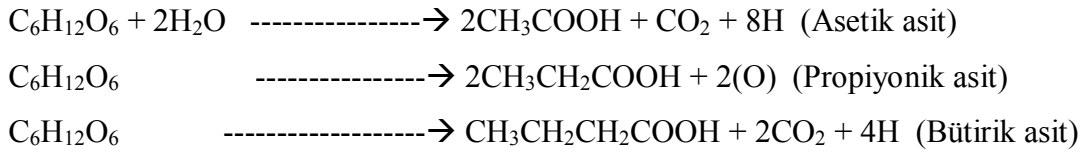
## 1.2. Ruminantlarda Metan Gazı Üretimi

Güncel verilere göre yıllık küresel metan salınımının %19'u (86 milyon ton) hayvancılık faaliyetlerinden kaynaklandığı, bu değer ise %95-97'sinin ruminant türü hayvanların ürettikleri (57, 113); geriye kalan %3-5'in ise tek mideli hayvanlar tarafından üretildiği (23) kabul edilmektedir. Ruminantlar metan gazını rumen ve barsaklarındaki fermantasyon faaliyetleri neticesinde üretirler, ancak toplam metan üretiminin %90'ı rumende üretilmektedir (59).

Rumendeki mikrobiyal popülasyon değerlendirildiğinde, mililitre rumen sıvısında  $10^{10}$  düzeyinde bakteri,  $10^6$  düzeyinde protozoa,  $10^3-10^7$  düzeyinde maya ve  $10^9$  düzeyinde ise metan üreten mikroorganizma bulunmaktadır (58). Metan üretiminde rol alan mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun aktivitelerini sağlayabilmeleri için rumen pH'sının 6-8 aralığında ve redox potansiyelinin ise -300 mV olması gerektiği bildirilmektedir (114). Ruminantlardan izole edilmiş önemli metanojenik bakteriler; *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* ve *Methanomicrobium mobile* olarak bildirilmektedir (53, 101, 115). Bu türler arasında toplam karışım rasyon tüketen laktasyondaki sığırların rumeninde en fazla bulunan metanojenik mikroorganizma türü *Methanobrevibacter ruminantium* olarak izole edilirken, otlayan sığırların rumeninden ise *Methanomicrobium mobile* türü izole edilmiştir (54).

Rumende anaerobik şartlarda ortaya çıkan gazlar, karbondioksit, metan, azot ve oksijenden oluşmaktadır. Toplam rumen kaynaklı gazların %90'ını karbondioksit ve metan

gazı olup, bu değerin %30-40'lık kısmını ise metan gazı oluşturmaktadır. Hayvanların bireysel bazda ürettikleri metan miktarı yıllık olarak 80-110 kg arasında olup bu değer önem taşımamaktadır (89), ancak asıl sorun dünya üzerinde sığır varlığının bir buçuk milyar civarında olması ile toplamda önemli düzeyde metan emisyonuna katkıda bulunmalarıdır (31). Rumen ortamında anaerobik şartlarda bulunan metanojenik bakteriler hidrojen iyonları ile karbondioksiti kullanarak metan gazı oluştururlar (133). Bu durum özellikle sindirimi güç, selülozca zengin kaba yemlerin tüketilmesi durumunda daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu tip yem maddelerinin tüketilmesi sonucunda rumende fermentasyon olayları sonucunda şekillenen uçucu yağ asitlerinden olan asetik asit miktarı artmaktadır. Asetik asit oluşumu sırasında ortaya çıkan hidrojen iyonu miktarı bütirik ve propiyonik asit oluşumunda ortaya çıkan hidrojen iyonu miktarında fazla olmakta (Şekil 1) ve dolayısıyla metanojenik bakterilerin gelişimleri ve faaliyetlerini sürdürebilmeleri daha kolay olmaktadır (14, 60, 90).



Açığa çıkan hidrojen, metan üreten bakterilerce  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \text{ ----} \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$  reaksiyonu ile metan gazına ( $\text{CH}_4$ ) dönüştürülür (26, 56). Metan yapısında enerji bulundurmakla birlikte, bu enerji hayvan tarafından değerlendirilemez ve büyük oranda geğirme ile dışarı atılır. Bu durum yem enerjisinin hayvan tarafından optimum düzeyde kullanılmadığı anlamına gelmektedir. Metan gazı ile yem enerjisinin %10-12'sinin değerlendirilemediği, bir başka deyişle kaybedildiği klasik bilgiler arasındadır (24). Hidrojen iyonlarının metan üreten mikroorganizmalarca kullanılması rumendeki mikrobiyal sindirimin devamlılığı açısından önem taşımaktadır, eğer rumen ortamında hidrojen iyonu konsantrasyonu yoğunluğu artar ise, glikoliz reaksiyonu esnasında indirgenen NADH'ın (Nikotinamid adenin dinükleotid) tekrar oksidasyonu mümkün olmaz (37). Böyle bir durumun şekillenmesi ile rumen metabolizması ruminant için zararlı bir yola girerek etanol ve laktik asit üretir ve sonuç olarak rumen metabolizması bozulmuş olur (80).

### **1.3. Ruminantlarda Metan Üretimini Azaltılmasına Yönelik Uygulamalar**

Rumende oluşan hidrojen iyonlarının azaltılması veya metanojenik bakterilerin kullanımından alıkonması, yemlerin enerji değerinde ortaya çıkan kayıpların azaltılmasında ve metan gazının ekolojiye verdiği zararların azaltılması önem taşımaktadır. Ruminal kaynaklı metan gazının azaltılmasında üç temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki, çiftlik yönetimi, genetik gelişmeler ve yem kalitesinin yükseltilmesi, ikincisi biyoteknolojik uygulamalar ışığında sindirim sistemindeki mikroorganizmaların modifiye edilmesi, üçüncüsü ise rasyondaki değişimler yada rasyona ilave edilecek katkı maddelerini kapsamaktadır. Bu uygulama yöntemlerinden en pratik ve uygulanabilir olanı, rasyon değişikliği veya rasyona katkı maddesi ilavesi olarak kabul görmektedir (86).

#### **1.3.1. Rasyondaki Karbonhidrat Etkisi**

Rasyonun bileşeni, özellikle rasyondaki karbonhidrat tipi rumen pH'sı ve mikroorganizma içeriği üzerine etkili olduğundan, metan gazı oluşumunda oldukça önem taşımaktadır (56). Seluloz ve Hemiseluloz'un sindirilebilirliği metan gazı üretimi ile oldukça güçlü ilişki taşımaktadır. Bu konuda yapılmış bir çalışmada (48) hemiseluloz sindirimi ile metan üretimi arasında pozitif bir ilişki tespit edilirken, seluloz sindirimi ile metan üretimi arasında negatif bir ilişki tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ise (110) rasyon içeriğindeki konsantre yem oranı ile metan üretimi arasında bir ilişki olduğunu, rasyon %30-40 oranında konsantre içerdiğinde brüt enerjinin %6-7'sinin metan gazı şeklinde kaybedildiğini, rasyon %80-90 oranında konsantre içerdiğinde ise brüt enerjinin %3-4'ünün metan gazı şeklinde kaybedildiğini bildirmektedirler. Rasyonda %75 yonca otu yerine aynı oranda konsantre yem verilen düvelerde yüksek düzeyde konsantre yem tüketen hayvanlarda metan üretiminin azaldığı, dolayısıyla metan gazına bağlı yem enerjisi kaybının düşüş gösterdiği bildirilmektedir (102). Benzer şekilde başka çalışmalarda da besinsel kompozisyonu yüksek rasyonlarla beslenen hayvanlarda, rasyonun sindirilebilirliğinin artışına bağlı olarak metan üretiminin azaldığı bildirilmektedir (21, 44, 91). Rasyondaki nişasta amilolitik bakterilerin artışına sebep olarak propiyonik asit üretimini teşvik eder, propiyonik asit oluşumunda hidrojen iyonları metan üretimi yerine propiyonik asit oluşumunda kullanılır. Bu süreçte rumen pH değerinin de düşmesine bağlı olarak düşük pH değerine duyarlı metanojenik



bakterilerin azalmasına bağlı olarak metan üretimi azalmaktadır (124). Sonuç olarak yüksek nişastalı yemlerin tüketimine bağlı olarak asetik/propiyonik asit oranı düşer ve daha az metan oluşur (81). Hücre duvarı elemanlarının sindirimine bağlı olarak rumende asetat artışı metan üretimini artırmaktadır (56). Bu durum ise asetat şekillenmesinde ortaya çıkan metil grubunun, metan üretiminde kullanılmasından kaynaklanmaktadır (33). Ayrıca kaba yemlerin öğütülmesinin ruminal metan oluşumunu azalttığını, bu azalmanın sebebinin ise öğütülen kaba yemlerin rumende kalış süresinin kısa olmasına bağlanmaktadır (56). Rasyondaki karbonhidratların yapısal yada suda kolay çözünür formda olması metan üretimini önemli düzeyde etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada ruminantların 1 kg ham selüloz tüketiminde 79 gr, 1 kg nişasta tüketiminde ise 10 gr metan gazı ürettikleri, suda çözünebilir karbonhidratların yapısal karbonhidratlara kıyasla metanogenezi azaltarak metan üretimini düşürdükleri bildirilmektedir (22). Başka çalışmalarda (51, 52) tek başına kaba yem tüketiminde metan üretiminin maksimum seviyede, kaba-konsantre yem karışımı tüketen hayvanlarda ise minimum düzeyde tespit edilmiştir.

### **1.3.2. Rasyondaki Yağın Etkisi**

Enerji kaynağı besin maddelerinden en önemlisi olan yağlar da ruminal metan üretimini önemli ölçüde azaltabilmektedirler. Rasyona yağ ilavesi ile metan üretimindeki azalmanın sebepleri; hidrojen iyonlarının doymamış yağ asitlerinin doyurulmasında kullanılması, yağların selüloz sindirimini olumsuz yönde etkileyerek asetat/propiyonat oranının azalması ve son olarak metanojenik mikroorganizmalar ile simbiyotik ilişki içinde olan protozoaların sayılarındaki azalma olarak düşünülmektedir (19, 24, 56, 76, 86). Yapılan çalışmalarda rasyona %1 düzeyinde ilave edilen yağın, metanogenesisi süt sığırlarında %2.2; koyunlarda ise %5.6 düzeyinde azalttığı bildirilmektedir (8, 30, 74). Avrupa Birliği metanogenesisi azaltmada rasyona yağ ilavesinin antibiyotik kullanımına göre en iyi alternatif olduğunu tavsiye etmektedir (11, 82). Kısa zincirli yağ asitlerine kıyasla orta zincirli yağ asitleri (C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>) metanogenesisi azaltmada daha etkin olmaktadır. Bunlardan özellikle laurik asit (C<sub>12</sub>) ve miristik asit (C<sub>14</sub>) mikroorganizmaların metan üretimine katılımlarını önemli düzeyde düşürmektedirler (28, 68). Laurik asit ve miristik asitlerce zengin Hindistan cevizi yağının koyun rasyonlarına %7 ilavesi ile rumen sıvısındaki protozoa sayısının %97 düzeyinde azaldığı (67), benzer bir sonuç *in vitro* şartlarda rumen sıvısına 2 g/L düzeyinde ilave edilen Hindistan cevizi yağının soya yağına kıyasla protozoa popülasyonunu sınırlandırdığı bildirilmektedir (137). Bitkisel kaynaklı ham yağın yağ asidi profili doymamış

yağ asidi yönünde olup bunlar oleik, linoleik ve linolenik yağ asitleridir. Doymamış yağ asitleri de gerek dolaylı olarak biyohidrojenizasyon yolu ile hidrojen iyonlarını kullanarak ve gerekse bakteri ve protozoa popülasyonuna direkt etki göstererek metan üretimini azaltırlar. Bu konuda yapılan bir çalışmada (116) %5 düzeyinde kolza, ayçiçeği yağı ve keten tohumu yağı ilavesinin rumen protozoa sayılarında oluşturduğu azalma sırasıyla %19, %31 ve %35 olarak tespit edilmiş, metan üretimini ise sırasıyla %27, %35 ve %50 düzeyinde azaltmışlardır. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada linolenik asidin özellikle 3 tip selülotik bakteri (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*) türüne karşı hücre bütünlüğünü bozarak toksik etki gösterdikleri belirlenmiştir (69). Rumen ortamında selülotik bakteri popülasyonu ile metan üretimi arasındaki ilişki göz önünde bulundurulduğunda, doymamış yağ asitlerinin metan üretimini azaltma etkileri anlaşılmaktadır. Besi sığırlarında yapılan bir çalışmada (76) rasyona günlük 400 gr veya kuru madde tüketiminin %5 düzeyinde ayçiçeği ilavesinin olumsuz bir etki oluşturmaksızın metan üretimini %22 düzeyinde azalttığı, ancak kuru madde sindiriminin %9, NDF sindiriminin ise %23 azaldığı bildirilmiştir.

### **1.3.3. Antibiyotik, Probiyotik ve Kimyasal Maddelerin Etkileri**

İyonofor grubu antibiyotikler (monensin, salinomisin vb.) uzun yıllardan beri gerek performansı arttırmak ve gerekse ruminal metan üretimini azaltmak amacıyla ruminant rasyonlarında kullanılmaktaydı. Monensinin hayvan besleme alanında kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç İdaresince (Food and Drug Administration) verilen izin ile 1971 yılında resmi olarak kullanılmaya başlanmıştır (77). İyonofor grubu antibiyotikler, büyük çoğunlukla gram pozitif olan selülotik bakteriler ile protozoaları dolaylı olarak baskılayarak rumen florasını gram negatif yönde değiştirerek propiyonik asit oluşumunda artışa, ortamda hidrojen iyonlarının azalmasına bağlı olarak da metan üretiminde azalmaya sebep olmaktadır (46, 85, 103). Yapılan çalışmalarda (76, 125) monensinin metan üretimini %9-25 oranında azalttığı, ancak bu etkisinin kısa süreli olduğu, bunun sebebinin ise ilk onaltı günden sonra metan üreten bakterilerin monensine karşı direnç kazandıkları yönündedir (55). Poliyeter iyonofor antibiyotik grubunda yer alan salinomycinin ruminal metan üretimini durdurduğu, ancak bu tip iyonofor antibiyotiklerin rumenden emilerek et ve süte geçebileceği bildirilmektedir (128). İyonofor grubu antibiyotiklerin peptidlerin ve aminoasitlerin rumende yıkımlanmalarını azaltarak rumen amonyak seviyesini düşürdükleri (47), böylece alt sindirim organlarına geçen protein miktarını arttırarak orada sindirilmelerini sağladıkları, sonuç olarak

yemden yararlanma oranını arttırdıkları belirtilmektedir (77). Ancak Avrupa Birliğine üye ve aday ülkelerde, yemlere katılan antibiyotiklerden kaynaklanan kalıntıların insan sağlığı üzerine yapabileceği olumsuzluklar (111) dikkate alınarak 2006 yılından itibaren yemlere antibiyotik katılması yasaklanmıştır.

Probiyotikler hayvanların rasyonlarına katılan ve sindirim sistemi florasını düzenleyen canlı mikrobiyal yem katkı maddeleridir (35). Günümüzde ruminant besleme alanında *Saccharomyces cerevisia* canlı maya kültürü ile *Aspergillus oryzae* fermentasyon ekstraktı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (84, 94). Ruminantlarda yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizma olarak etkinliği belirlenmiş bazı türler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Genel olarak, *Lactobacillus*, *Bacteriodes*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus* ve *Bifidobacterium spp* bakterileri ile *Aspergillus spp* mantarları ve *Saccharomyces cerevisiae* mayalarıdır (29, 61). Yapılan bir çalışmada (109), probiyotik uygulaması ile rumende propiyonik asit miktarının arttığı, metan üretiminde ihtiyaç olan hidrojen ve formik asit üretiminin azalmasına bağlı olarak, metan üretiminde %4-31 arasında azalma olduğu bildirilmektedir. Yem katkı maddeleri ile mantarların kullanılmasıyla metan üretiminin azalması, etki şekilleri tam olarak açıklanamasa da, rumende laktat kullanan bakterilerin artışına ve laktat kullanan bakterilerin laktik asiti propiyonik asite dönüştürmelerine (8, 43, 132) bağlanmaktadır.

Organik asitlerin rasyonlara eklenmesi, rumende hidrojen iyonlarının azaltılması ile propiyonik asit üretiminin artış gösterdiği, metan üretiminin ve metan üretime bağlı olarak enerji israfının önlenemediği yönünde çalışmalar mevcuttur. Metan üretimini azaltmak amacıyla, halojenize metan analogları, lumazine, propiyonik asit, kloroform, kloralhidrat, aminokloral, trikloroasetamid, trikloroetiladipat, bromoklorometan, ve alfa-siklodekstrin gibi organik asitler kullanılmaktadır (75, 125). Bu organik asitlerin pratikte kullanımlarının kolay olmadığı, ayrıca zaman içerisinde metan üreten bakterilerin bu kimyasallara karşı direnç kazandıkları, hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkiler yapabileceği bildirilmektedir (83). Rasyona malat ve fumarat ilavesinin, fumarat kullanan bakterilerin metan üreten bakterilerle hidrojen iyonu için rekabet ettiklerini, böylece metan üretiminin azaltılmasında organik asit kullanımının etkili olabileceğini bildirmektedirler (19). Başka bir çalışmada ise (7, 76) günlük 80-175 gr verilen fumarik asitin holstein ve angus sığırlarında metan üretimi üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığını bildirmişleridir. Rumende kloroforma dönüştürülen kloralhidratın, metan üretimini azalttığı, ancak uzun süreli kullanımında karaciğer tahribatına bağlı olarak ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (64).

### 1.3.4. Bitkisel Kaynakların Etkileri

Bitkisel kaynaklar veya bunlardan elde edilen etkin maddelerle tedavi çok eskilere dayanmaktadır. Milattan 2600 yıl önce Mezopotamya'da geleneksel tıp uygulamaları bitkiler ile yapılmaktaydı (87). Bitkiler, hayvansal üretimin öncelikli ve vazgeçilmez kaynakları olup, bazılarının içeriklerinde bulunan antinutrisyonel faktörlerden dolayı kullanımlarına kuşku ile yaklaşmıştır. Son otuz yıla kadar batı toplumlarında bitkilerin besleyici değerlerinin dışında, performans artırıcı ve antimikrobiyal etkileri üzerinde ciddi olarak durulmamıştır. Her ne kadar dünya nüfusunun %80'i bitkisel kaynaklı maddelerin tedavi edici yada performans artırıcı etkilerini kabul etmiş olsa da, batılı toplumlar bu kaynakların etkilerinin gerçek dışı olduğunu kabul etmişlerdir (32). Ancak son 5-8 yıldır bitkisel kaynaklı etkin maddelere karşı tutum değişmeye başlamış olup, bitki ve bitki ekstraktlarına olan ilgi artarak bu kaynakların tedavi edici ve performans artırıcı özellikleri üzerinde durulmaktadır (40). Günümüzde bitki ve bitki ekstraktlarının performans ve antimikrobiyal etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu bu kaynakların yem tüketimi ve performans üzerine etkilerini konu almakta olup, fonksiyonları ve etki mekanizmaları üzerinde fazlaca durulmuştur. Bitkisel kaynaklı etkin metabolitlerin rumen metan gazını azaltmaları, direkt metan üreten mikroorganizmaları etkisiz hale getirerek yada metan üretimi için ihtiyaç duyulan hidrojen iyonu üretimini inhibe ederek şekillenmektedir (12).

Son zamanlarda bazı bitkilerin yapılarında bulunan esansiyel yağ, tanen ve saponin metabolitlerinin metan üretimi üzerine etkilerinin konu alındığı birçok çalışma yapılmaktadır. Temel olarak bitkilerin yapısında bulunan esansiyel yağ, tanen ve saponin gibi metabolitlerin antimikrobiyal yada rumen fermentasyonu üzerine etkilerini birçok faktör değiştirebilmektedir. Bunlar; bitki türü, metabolitlerinin aktivitesi ve yoğunluğu, iklim, hasat zamanı, coğrafik faktörler, kurutma durumu, depolama, paketleme vb. faktörlerdir (131).

Tanenler polifenolik bileşikler olup, molekül ağırlıkları ve diğer maddelerle (özellikle proteinlerle) kompleks bileşik oluşturma kapasiteleri yüksektir (6). Yapılarına göre hidrolize olabilen ve kondanse tanenler olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Hidrolize olabilen tanenlerin temel yapıları gallik asit (3,4,5-trihidroksil benzoik asit) kondanse tanenlerin ise flavonlardır (flavonların polymer ve oligomerleri). Tanenlerin antibakterial etkileri tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, muhtemelen bu etkilerini metan üretiminde rol oynayan mikroorganizmaların hücrelerindeki enzim ve proteinlerine bağlanarak bakterisid ve

bakteriostatik etki göstermektedirler (117). Tanenler ayrıca rumendeki protozoalar üzerinde dolaylı etki göstererek metan üretimi üzerine etki göstermektedirler. Tanenler, selulitik mikroorganizmalar üzerine olumsuz etki yaparak asetik asit üretimini azaltırlar, böylece metan üretimi için ihtiyaç duyulan karbondioksit ve hidrojen iyonu üretimini sınırlamaktadırlar (96, 127). Kondanse tanenler dolaylı etkileri ile selüloz sindirimini azaltarak metan üretimini düşürürken, hidrolize tanenler ise doğrudan metan üreten bakteriler ile hidrojen iyonu üretimini sağlayan mikroorganizmalar üzerine etki göstermektedirler (39). Kondanse tanen içeren bitkisel kaynakların metan üretimini azaltma yönünde birçok çalışma yapılmış (2, 134, 135) genel olarak tanenlerin yemin sindirilebilirliğini düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç tanenlerin, yemdeki protein ve şekerlerle kompleks yapı oluşturarak yemin değerlendirilmesini düşürmektedirler. Bir başka düşünce ise tanenlerin sellulaz ve ksilinaz enzimlerinin aktivitelerini azaltmalarından kaynaklanabilmektedir (104). Yapılan bir çalışmada (18) birçok bitkide bulunan tanenlerin uygun miktarda kullanıldığında rumende yıkılan protein miktarını azaltarak duodenuma geçen miktarını arttırdığını bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar rasyona kuru maddenin %0.025 düzeyinde akasya bitkisi kaynaklı tanen ilavesinin metan üretimini %13 azalttığını bildirmektedirler. Benzer şekilde (42) kaba yeme %20 düzeyinde akasya bitkisi ilavesinin metan gazı üretimini önemli düzeyde azalttığını bildirmektedirler.

Saponinler yabani ve kültür bitkilerinin birçok türünde doğal olarak oluşan glikozitlerdir. Saponin içeren bitkilerin yada bu bitki ekstraktlarının rumendeki protozoa ve bakterilerin aktivitelerini baskıladığı bilinmektedir (83). Saponinlerin protozoa yüzeyinde bulunan sterollere bağlanmak suretiyle etki gösterdikleri bildirilmektedir (34). Saponinler tıpkı tanenlerde olduğu gibi metan üretiminde ihtiyaç duyulan hidrojen iyonu oluşumunu sınırlandırarak metan üretimini azaltmaktadırlar (41). Saponinlerin antimikrobiyal etkileri ile metan üretimini azaltmaları bazı *in vitro* çalışmalarda olumlu sonuç verirken (99), bazı çalışmalarda ise mikroorganizmaların saponinlere karşı adaptasyon sağlayabileceği belirtilmektedir (129). Birçok çalışmada saponinin kaynağına bakılmaksızın, rasyonda saponin bulunması durumunda ruminal metan üretimini azalttığı bildirilmektedir (45, 88, 130).

Bitki ekstraktları antimikrobiyal özelliklere sahip olduklarından yüzyıllardan beri farklı amaçlarla (geleneksel tıp ve gıdaların korunması) kullanılmaktadır (25). Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri, yapılarındaki esansiyel yağlarda bulunan saponin, terpen, tanen ve fenilpropanoidlerden kaynaklanmaktadır (100). Esansiyel yağlar, aromatik lipofilik bileşiklerdir. Esansiyel yağların büyük çoğunluğu bakterisit ve bakteriostatik etkili olup,

bakteri, mantar, virus ve protozoalar üzerine etkilidirler (9, 17, 40). Etki mekanizmalarından ilki, hedef mikroorganizmanın hücre dışı enzimlerinin inaktive edilmesi (16), ikincisi ise hücre duvarının tahrip edilmesidir (40). Diğer etkileri ise elektron transportu, iyon değişimi, protein translokasyonu ve diğer enzimsel faaliyetler üzerine gösterdiği etkilerdir (40). Son yıllarda bitkisel kaynaklı esansiyel yağlardan özellikle, kekik, nane, sarımsak, zencefil ve defne gibi bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır. Esansiyel yağların metan üretimi üzerine etkileri, kullanılan doz ile ilişkilidir. Düşük dozlarda ruminal fermentasyon etkilenmemekle birlikte, yüksek dozlarda diğer rumen mikroorganizmaları ile birlikte hedef mikroorganizmaların da etkinliğini azaltmaktadır (9). Esansiyel yağlar, gram negatif bakterilere kıyasla gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkin antimikrobiyal etki gösterirler, ancak kekik esansiyel yağının gram negatif mikroorganizmalar üzerine de etkili olduğu bilinmektedir (10).

Okaliptus ağaçları *Myrtaceae* familyasından olup dünya üzerinde 3800 civarında çeşidi bulunmaktadır. Okaliptus ağaçları yıl boyu yeşil aksama sahip, uzun boylu ve dünyanın hemen hemen her bölgesinde yetişebilen özellik taşımaktadır (13, 66). Akdeniz bölgesinin yaygın aromatik bitkisi olarak da okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) karşımıza çıkmaktadır. Özellikle bölgeye ve ülkemizin geneline adapte olmuş türü olan *Eucalyptus camaldulensis* çok yıllık, sürekli yeşil, geniş gövde kalınlığına sahip, bol yapraklı ve uzun boylu bir ağaç olup, bu bitkiden elde edilen aromatik yağlar tıp ve eczacılık alanlarında yoğun olarak kullanılmaktadır (15, 36, 65). *Eucalyptus camaldulensis* yapraklarından elde edilen esansiyel yağların kompozisyonu incelendiğinde; spathulenol, *p*-cymene, 1,8-cineole (eucalyptol), limonene,  $\beta$ -Caryophyllene,  $\alpha$ -Terpinene, ethanone ve carvacrol yoğun biçimde tespit edilmiştir (1, 20, 27, 95). Eucalyptol (1,8-cineole)'ün *Eucalyptus camaldulensis*'den elde edilen temel aktif madde olduğu bildirilmektedir (105).

Yapılan kaynak araştırmalarında, okaliptus yaprağı yada yağı kullanılarak metan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma (38, 62, 97, 106, 107, 108) bulunmaktadır. Kumar ve ark. (62) okaliptus esansiyel yağı ile yaptıkları çalışmada, *in vitro* gaz üretim denemesinde rumen sıvısı tampon çözelti içerisine 0, 0.33, 0.66, 1.00, 1.33 ve 1.66  $\mu$ l/ml dozunda yağ kullanmışlar ve metan üretiminin %10-56 düzeyinde azaldığı, 1.00  $\mu$ l/ml rumen sıvısı seviyesinin üzerindeki seviyelerde ise *in vitro* sindirim değerinin azaldığı bildirilmiştir. Sallam ve ark. (106) ise *in vitro* gaz üretim denemesinde rumen sıvısı tampon çözelti içerisine 25, 50, 100 ve 150  $\mu$ l/ 75 ml rumen sıvısı tampon çözelti (25 ml rumen sıvısı, 50 ml tampon çözelti) ilave etmişler ve sırasıyla metan azalış oranlarını %26, %46.8, %77.3 ve %85.3 tespit etmişlerdir. Metan üretimini azaltmada düşük seviyelerde okaliptus yağının, sindirilebilirlik değerlerine olumsuz etki oluşturmaksızın kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sallam ve ark. (107), koyunlarla yaptıkları *in vivo* çalışmada günlük rasyona ilave olarak 10 ve 20 ml/gün okaliptus yağı ilave ederek yaptıkları çalışmada 10 ml/gün okaliptus yağı ilavesinin sindirim değerlerine olumsuz etki göstermeksizin metan üretimini azalttığını bildirmişlerdir. Okaliptus yaprakları ile yapılmış sınırlı çalışmalardan, Goel ve ark. (38) Mehndi (*Lawsonia inermis*) ve okaliptus yapraklarının karışımından (1:1) elde ettikleri katkının %5 düzeyinde *in vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılması ile metan üretimi ile Rumen sıvısı amonyak azotunu azalttığını bildirmektedirler. Benzer şekilde Sallam ve ark. (108) okaliptus yapraklarının metan gazının azaltılmasında potansiyel olarak kullanılabilmesi yönünde bildirimleri bulunmaktadır. Manh ve ark. (71) pirinç samanına kuru madde esasına göre %1-6 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave etmişler ve kuru maddeye %2'den yüksek düzeyde okaliptus yaprağı ilavesinin *in vitro* organik madde sindirim değerleri ile *in vitro* metan üretimini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yine Manh ve ark. (72) holstein sığırların rasyonlarına günlük 100 ve 200 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave etmişler ve rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N ve CH<sub>4</sub> değerlerini kontrole göre istatistiksel olarak düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 200 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı protozoa, toplam bakteri, proteolitik ve selulolitik bakteri düzeylerini de azalttığı belirtilmiştir. Başka bir *in vivo* çalışmada (118) hayvan başına günlük 40 ve 80 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N değerini etkilemediğini, ancak 120 gr okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin NH<sub>3</sub>-N değerini istatistiksel olarak düşürdüğünü bildirmişlerdir. Kumar ve ark. (63) yüksek (%60 buğday samanı), orta (%50 buğday samanı) ve düşük düzeyde (%40 buğday samanı) selüloz içeren rasyonlara %2 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus globules*) yaprağı ilave ederek *in vitro* çalışma yapmışlardır. Yüksek ve orta düzeyde selüloz içeren rasyonlarda CH<sub>4</sub> değerinin azaldığını, düşük düzeyde selüloz içeren rasyonda ise rakamsal bir artış olduğunu bildirmektedirler. Aynı çalışmada benzer olarak yüksek ve orta düzeyde selüloz içeren rasyonlara okaliptus (*Eucalyptus globules*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı protozoa değerini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Bu yüksek lisans çalışması, ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan bazı kaba yem kaynaklarına (mısır silajı, yonca kuru otu, çayır kuru otu ve buğday samanı) farklı seviyelerde (kontrol, %0.5, %1, %1.5, %2 ve %2.5) ilave edilen okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağının ruminal metan gazı oluşumu üzerine etkisinin *in vitro* gaz üretim tekniği ile belirlenmesini amaçlamaktadır.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Yem materyali**

Araştırmada kullanılan yem materyallerinden mısır silajı ve buğday samanı Harran Üniversitesi Hayvancılık Araştırma Ünitesinden, yonca ve çayır kuru otları ise Türkiye Jokey Kulübü Şanlıurfa Pansiyon Harasından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprakları Nisan ayı içerisinde Harran Üniversitesi Yenişehir ve Eyyubiye Kampüslerinde bulunan ağaçların yeşil yapraklarından taze olarak elde edilmiştir. Taze okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprakları gölgede kurutularak öğütülmeye hazır hale getirilmiştir.

##### **3.1.2. Rumen sıvısı**

Rumen fistüllü koçların yemlenmesi, % 60 yonca kuru otu ve % 40 yoğun yem içeren bir rasyonla Menke ve Steingass (79) tarafından önerdiği şekilde yapılmış ve hayvanların önünde sürekli taze ve temiz su bulundurulmasına özen gösterilmiştir. *In vitro* inkübasyonda kullanılan rumen sıvısı, rumen fistüllü koçlardan sabah yemlemesinden önce alınmış ve önceden içerisinde sıcak su ve CO<sub>2</sub> bulunan termos içerisinde çok hızlı bir şekilde laboratuara getirilmiştir

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Deneme yemlerinin ve okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarının ham besin madde içeriklerinin belirlenmesi**

Araştırmada, kullanılan yem materyalleri ile okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprakları 1 mm elekten geçecek şekilde laboratuvar değirmeninde öğütülerek analizlere hazır hale getirilmişlerdir. Deneme yemlerinin ve okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarının ham besin madde içerikleri (kuru madde, ham protein ve ham kül) AOAC (5)'e



göre, ADF (asit detergant fibre) ve NDF (neutral detergant fibre) analizleri ise Van Soest ve ark. (126)'a göre yapılmıştır. Deneme yemlerinin ve okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarının kondanse tanen içeriklerinin belirlenmesi Makkar ve ark. (70) tarafından bildirilen yöntemle yapılmıştır.

### 3.2.2. *In vitro* denemenin yürütülmesi

Her bir yem ham maddesine (Mısır silajı, yonca kuru otu, çayır kuru otu ve buğday samanı) katkısız (kontrol), %0.5, %1, %1.5, %2 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı karıştırılarak toplam 24 adet örnek oluşturulmuştur.



**Resim 1.** *In vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılan 200 ml ölçekli özel şırıngalar.



**Resim 2.** *In vitro* gaz üretim tekniğinde yemlerin tartımı ve şırıngaların vazelinlenmesi.

### 3.2.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması ve Gaz üretim tekniğinin uygulanması

Bu yöntemin temeli yemlerin, rumen sıvısı ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan gaz ( $\text{CO}_2$  ve  $\text{CH}_4$ ) miktarının ölçülmesine dayanır. Elde edilen sonuçlar *in vitro* organik madde sindirilebilirliği ve yem maddelerinin metabolik enerji (ME) içeriğinin hesaplanmasında kullanılabilir.

#### **Çözeltilerin hazırlanması:**

##### **Makromineral çözeltisi:**

5.7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

6.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.6 g  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek ve yine saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH değeri 6.8 olarak ölçülmüştür.

##### **Mikromineral çözeltisi:**

13.2 g  $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$

10 g  $\text{MnCl}_2 (4\text{H}_2\text{O})$

1.0 g  $\text{CoCl}_2 (6\text{H}_2\text{O})$

8.0 g  $\text{FeCl}_3 6 \text{H}_2\text{O}$

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek ve 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**Tampon (Buffer) çözeltisi:**

39 g Na HCO<sub>3</sub>

4 g (NH<sub>4</sub>) HCO<sub>3</sub>

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek ve 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Resazurin çözeltisi:**

100 mg resazurin saf suda çözdürülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**İndirgeme (Redüksiyon) çözeltisi:**

Her çalışmada taze olarak hazırlanmıştır. 47.50 ml saf suya 2 ml 1 N NaOH ilave edilerek, üzerine 285 mg Na<sub>2</sub>S (7H<sub>2</sub>O) eklenerek karışım çözdürülmüştür.

**Yöntemin uygulanması**

Analizin uygulanmasında yukarıda bildirilen şekilde hazırlanan çözeltiler, Woulf şişesine aşağıda verilen miktar ve sıra ile konmuştur.

474.50 ml saf su

0.12 ml mikro mineral çözeltisi

237.23 ml Tampon (buffer) çözeltisi

237.23 ml makro mineral çözeltisi

1.22 ml resazurin çözeltisi

49.44 ml İndirgeme (redüksiyon) çözeltisi

Bu karışım, rumen sıvısı alınmadan hemen önce hazırlanmış, CO<sub>2</sub> gazı altında 39 °C deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak rumen sıvısı ilave edilene kadar bekletilmiştir.

**Rumen sıvısının alınması ve inkübasyonu**

Sabah yemlemesinden hemen önce alınan rumen sıvısı, sıcaklığını korumak amacıyla, daha önce içinde 38-40 °C sıcak su ve CO<sub>2</sub> bulunan termos kap içerisine konularak hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen rumen sıvısının kaba partiküllerinden ayrılması için hızlı bir şekilde CO<sub>2</sub> gazı altında 4 kat tülbent bezinden süzölmüştür. Laboratuvarda hazırlanan 1000 ml karışımına (suni tükürük karışımı) 500 ml süzölmüş rumen

sıvısı ilave edilmiştir. Bu karışım içerisine ince bir hortum vasıtasıyla sürekli CO<sub>2</sub> gazı verilmiş ve bu sırada renk değişimi kontrol edilmiştir (yaklaşık 15 dakika). Daha önce yem örneği konulmuş olan ve inkubasyon dolabında 39 °C’de bekletilen özel cam şırıngalara dispenser yardımıyla 30 ml rumen sıvısı karışımından konulduktan sonra, içindeki hava kabarcıkları ortamdaki uzaklaştırılmış ve uç kısmındaki kısıp sıkıştırılmıştır. İlk hacim okunup kaydedilmiş ve şırıngalar 39 °C’de sabitlenmiş olan özel yapım su banyosuna yerleştirilmiştir. Gaz üretim tekniği Menke ve ark. (79) tarafından bildirilen yöntemine göre uygulanmıştır. İnkübasyon 39 °C de 24 saat sürdürülmüş ve 24. saat gaz oluşum değerleri kaydedilerek, metan ve CO<sub>2</sub> gazı ölçüm işlemleri için şırıngalarda oluşan gaz üç yollu şırınga sistemi ile alınmıştır. Alınan gaz metan gazı ölçüm cihazına (Sensors Analysetechnik GmbH&Co. KG, Berlin, Germany) enjekte edilerek bilgisayarda metan gazı değeri (%) okunmuştur. Gaz üretim tekniğinde her bir örnek için 4 tekrür olacak şekilde çalışılmıştır. Şırıngalarda kalan rumen sıvısı yem karışımı 4 kat tülbentten süzülerek pH değerleri okunmuş, bu örnekler amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) analizlerinin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda saklanmışlardır.

### 3.2.2.2. İVOMS ve ME içeriklerinin hesaplanması

Gaz üretim miktarları belirlendikten sonra aşağıdaki eşitlikler kullanılarak İVOMS ve ME değerleri hesaplanmıştır (78).

$$\text{İVOMS (\%)} = 14.88 + 0.889\text{GÜ} + 0.45\text{HP} + 0.065\text{HK}$$

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

**GÜ** = 24 saatlik fermantasyon sonucu açığa çıkan gaz miktarı (ml).

**HP** = Yemin ham protein içeriği (% , KM).

**HK** = Yemin ham kül içeriği (% , KM).

### 3.2.3. Rumen sıvısında pH değerinin saptanması

Çift katlı bezden süzildikten sonra derhal Hanna marka pH metre ile sıcaklık değişmeden pH ölçümleri yapılmıştır.

### 3.2.4. Rumen sıvısında amonyak azotu analizi

Rumen sıvısı amonyak analizi Markham distilasyon (73) yöntemi ile belirlenmiştir.

### 3.2.5. İstatistiksel analiz

Araştırma sonunda elde edilen veriler SPSS paket programının GLM prosedüründe değerlendirilmiştir. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır. Bu amaçla SPSS (112) paket programından yararlanılmıştır.



**Resim 3.** *In vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılan suni tükürük karışımı.



**Resim 4.** Suni tükürük-rumen sıvısı karışımına CO<sub>2</sub> gazı verilmesi ve şırıngalara konması.



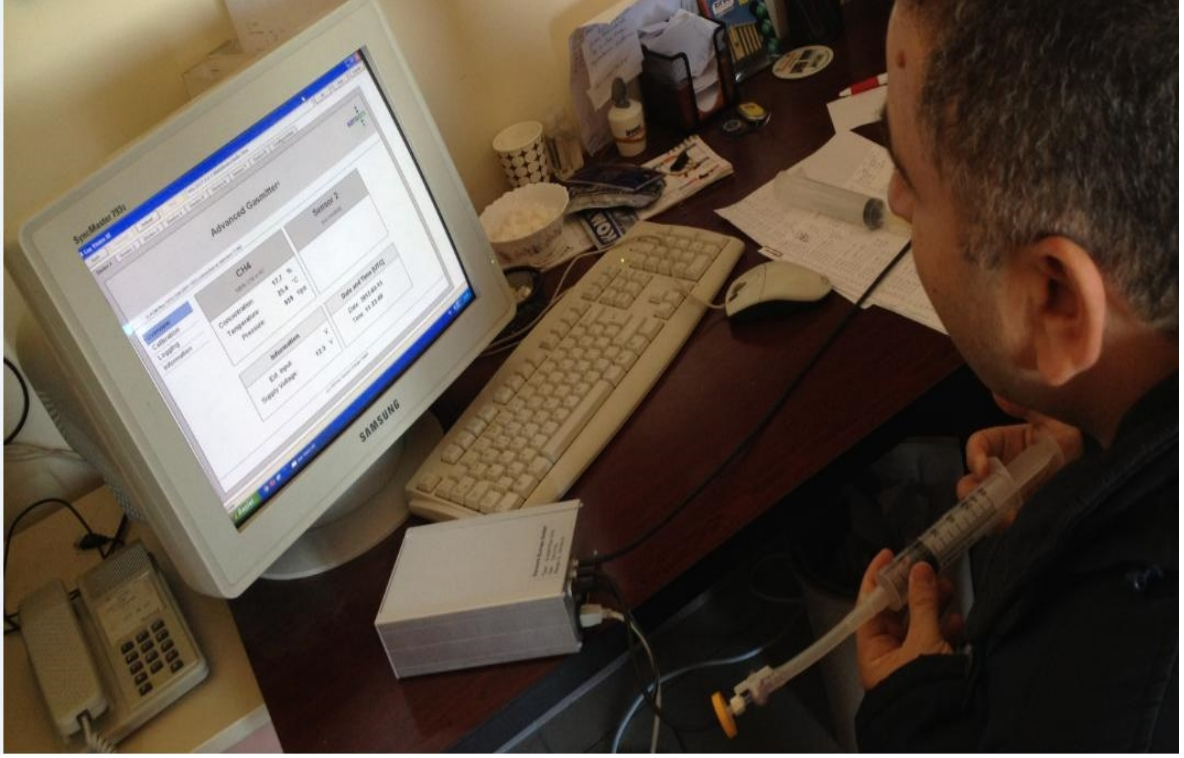
**Resim 5.** Şırınga pistonlarının şırıngada hava kalmayacak şekilde konumlandırılmaları ve su banyosunda inkubasyonun başlatılması.



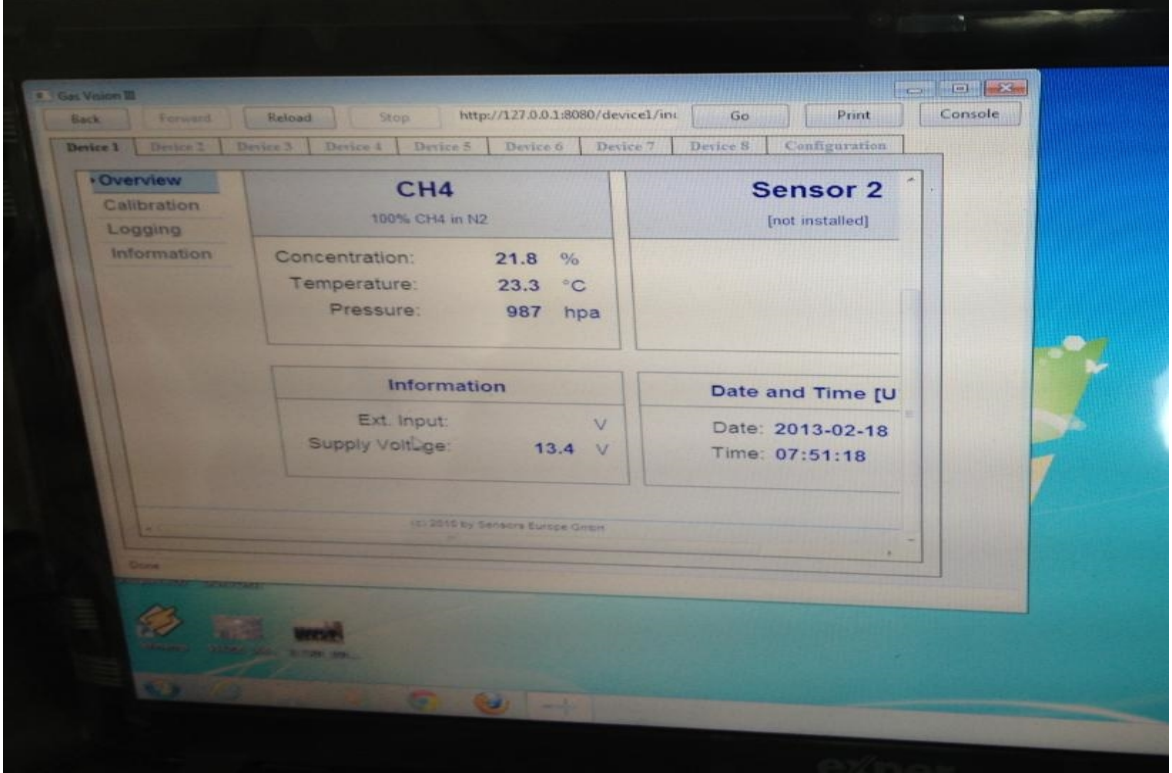
**Resim 6.** Şırıngaların periyodik olarak bilekten çalkalanılarak karıştırılması.



**Resim 7.** İnkubasyonun 24. saatinde şırıngalardan üç yollu enjektör yardımı ile gazın alınması.



Resim 8. Şırıngalardan alınan gazın bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına enjekte edilmesi.



Resim 9. Bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına enjekte edilen numuneden elde edilen metan gazının (%) ekrandan okunması



## 5. BULGULAR

Araştırmada kullanılan yem maddelerinin ham besin madde içerikleri Tablo 2’de verilmiştir. Elde edilen ham besin maddeleri aynı yem maddelerinin referans değerleri ile karşılaştırıldığında besin madde içeriklerinden özellikle ham protein değerlerinin yüksek ham selüloz ile ADF ve NDF değerlerinin ise normal sınırlar aralığında olduğu görülmüştür. Bu farklılık özellikle belirli bir vejetasyon döneminde biçilerek kurutulan yonca kuru otu ile çayır kuru otunda belirgin olarak görülmektedir. Bu durum söz konusu yem maddelerinin ideal hasat zamanında biçilip konserve edildiklerini göstermektedir.

**Tablo 2.** Araştırmada kullanılan yem maddeleri ve okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*)’in ham besin madde (% KM) ile kondanse tanen (g/kg KM) içerikleri.

Yemler	KM	HK	ADF	NDF	HP	KT
Mısır silajı	93.19	4.91	29.59	54.26	6.52	2.29
Yonca Kuru Otu	94.46	10.38	31.92	40.24	18.56	7.29
Çayır Kuru Otu	96.53	8.21	40.97	70.46	6.69	5.76
Buğday Samanı	95.06	10.11	51.01	79.05	4.84	5.27
Okaliptus Yapağı	94.87	8.37	30.17	39.64	12.65	17.33

Araştırmada kullanılan yem maddelerinden mısır silajına ait *in vitro* 24. saat gaz (CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub>) oluşumu, pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerleri Tablo 3’te verilmiştir. Mısır silajı için farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapağı ilavesinin CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub> gazı miktarı ile pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerlerinde istatistiksel farklılık oluşturmuştur (P<0.05). Metan gazı (CH<sub>4</sub>) parametresi bakımından, kontrol (55.63 ml/g KM) ile kıyaslandığında en düşük CH<sub>4</sub> gazı üretimi (29.97 ml/g KM), kuru maddeye %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir (P<0.05). En düşük karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>) da benzer şekilde %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir (P<0.05). Kuru maddeye %1, %1.5, %2 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapağı ilavesi 24. saat pH değerini istatistiksel olarak düşürmüştür (P<0.05). *In vitro* 24. saat amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) değerleri kıyaslandığında okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapağının tüm katkı seviyelerinin NH<sub>3</sub>-N değerini düşürdüğü (P<0.05) ve en düşük NH<sub>3</sub>-N

değeri (10.50 mg/dl) kuru maddeye %2.5 seviyesinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir. *In vitro* organik madde sindirim ve metabolik enerji değerleri okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave seviyesinin artışına bağlı olarak düşüş göstermiştir ( $P<0.05$ ). En düşük *In vitro* organik madde sindirim ve metabolik enerji değerleri (%66.55 ve 9.41 Mj/ kg KM) %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir.

**Tablo 3.** Mısır silajına farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin *in vitro* gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.

Parametreler	Okaliptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı seviyesi						SEM
	Kontrol	%0.5	%1	%1.5	%2	%2.5	
CH <sub>4</sub> ml/ g KM	55.63 <sup>a</sup>	50.32 <sup>b</sup>	36.23 <sup>c</sup>	34.17 <sup>d</sup>	32.44 <sup>d</sup>	29.97 <sup>c</sup>	0.68
CO <sub>2</sub> ml/ g KM	242.30 <sup>a</sup>	219.41 <sup>b</sup>	213.31 <sup>c</sup>	196.77 <sup>d</sup>	187.05 <sup>c</sup>	184.27 <sup>c</sup>	1.95
pH	6.80 <sup>ab</sup>	6.85 <sup>a</sup>	6.60 <sup>c</sup>	6.63 <sup>bc</sup>	6.60 <sup>c</sup>	6.50 <sup>c</sup>	0.06
NH <sub>3</sub> -N, mg/dl	34.50 <sup>a</sup>	20.50 <sup>b</sup>	14.75 <sup>c</sup>	13.00 <sup>c</sup>	13.50 <sup>c</sup>	10.50 <sup>d</sup>	0.69
İVOMS, % KM	87.82 <sup>a</sup>	82.07 <sup>b</sup>	77.01 <sup>c</sup>	72.41 <sup>d</sup>	74.36 <sup>d</sup>	66.55 <sup>e</sup>	0.77
ME, MJ/ kg KM	13.75 <sup>a</sup>	11.11 <sup>b</sup>	10.51 <sup>c</sup>	9.48 <sup>e</sup>	9.89 <sup>d</sup>	9.41 <sup>e</sup>	0.06

a,b,c,d,e: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

**Tablo 4.** Yonca kuru otuna farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin *in vitro* gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.

Parametreler	Okaliptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı seviyesi						SEM
	Kontrol	%0.5	%1	%1.5	%2	%2.5	
CH <sub>4</sub> , ml/ g KM	41.13 <sup>a</sup>	37.11 <sup>b</sup>	36.94 <sup>b</sup>	31.44 <sup>c</sup>	31.62 <sup>c</sup>	29.03 <sup>c</sup>	1.16
CO <sub>2</sub> , ml/ g KM	192.20 <sup>a</sup>	165.52 <sup>d</sup>	180.03 <sup>a</sup>	175.52 <sup>bc</sup>	165.26 <sup>d</sup>	168.17 <sup>cd</sup>	2.89
pH	6.76 <sup>ab</sup>	6.79 <sup>ab</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.68 <sup>b</sup>	6.43 <sup>c</sup>	6.75 <sup>ab</sup>	0.07
NH <sub>3</sub> -N, mg/dl	19.00 <sup>b</sup>	20.67 <sup>a</sup>	17.75 <sup>bc</sup>	21.00 <sup>a</sup>	13.50 <sup>d</sup>	17.00 <sup>c</sup>	0.43
İVOMS, % KM	73.40 <sup>a</sup>	67.24 <sup>bc</sup>	68.47 <sup>b</sup>	64.96 <sup>c</sup>	73.10 <sup>a</sup>	66.33 <sup>bc</sup>	1.03
ME, MJ/ kg KM	11.54 <sup>a</sup>	10.60 <sup>b</sup>	8.79 <sup>c</sup>	10.75 <sup>b</sup>	10.44 <sup>b</sup>	10.46 <sup>b</sup>	0.11

a,b,c,d,e: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Araştırmada kullanılan yem maddelerinden yonca kuru otuna ait *in vitro* 24. saat gaz (CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub>) oluşumu, pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Yonca kuru otu için farklı seviyelerde okaliptus

(*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub> gazı miktarı ile pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerlerinde istatistiksel farklılık oluşturmuştur (P<0.05). Metan gazı (CH<sub>4</sub>) parametresi bakımından, kontrol (41.13 ml/g KM) ile kıyaslandığında en düşük CH<sub>4</sub> gazı üretimi (29.03 ml/g KM), kuru maddeye %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir (P<0.05). Ancak bu parametre bakımından %1.5; %2 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilen CH<sub>4</sub> gazı değerleri istatistiksel olarak kontrol grubundan düşük (P<0.05), kendi aralarında benzer (P<0.05) bulunmuşlardır. Karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>) parametresi bakımından kontrol grubu ile %1 okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilen değerler benzer (P>0.05) bulunurken, %0.5; %1.5; %2 ve %2.5 okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi düşük (P<0.05) bulunmuştur. Kuru maddeye %2 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi 24. saat pH değerini istatistiksel olarak düşürmüştür (P<0.05). *In vitro* 24. saat amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) değerleri kıyaslandığında okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağının %2 ve %2.5 seviyelerinin NH<sub>3</sub>-N değerini düşürdüğü (P<0.05) ve en düşük NH<sub>3</sub>-N değeri (13.50 mg/dl) kuru maddeye %2 seviyesinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir. Genel olarak *in vitro* organik madde sindirim ve metabolik enerji değerleri okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave seviyesinin artışına bağlı olarak düşüş (P<0.05) göstermiştir. En düşük *in vitro* organik madde sindirim değeri (%64.96) %1.5 düzeyinde; en düşük metabolik enerji değeri ise (8.79 MJ/kg KM) %1 okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılan yem maddelerinden çayır kuru otuna ait *in vitro* 24. saat gaz (CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub>) oluşumu, pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerleri Tablo 5’de verilmiştir. Çayır kuru otu için farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin CH<sub>4</sub> ve CO<sub>2</sub> gazı miktarı ile pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerlerinde istatistiksel farklılık oluşturmuştur (P<0.05). Metan gazı (CH<sub>4</sub>) parametresi bakımından, kontrol (30.00 ml/g KM) ile kıyaslandığında en düşük CH<sub>4</sub> gazı üretimi (15.68 ml/g KM), kuru maddeye %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir (P<0.05). Karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>) parametresi bakımından tüm katkı seviyeleri kontrol grubundan düşük (P<0.05) bulunmuş, en düşük CO<sub>2</sub> değeri ise %1 okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilen değerden elde edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24. saat pH değerleri kuru maddeye %0.5, %1 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile benzer bulunmuş (P>0.05), %1.5 ve

%2 seviyeleri ise kontrol grubundan düşük ( $P<0.05$ ) bulunmuştur. *In vitro* 24. saat amonyak azotu ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) değerleri kıyaslandığında kontrol grubu ile %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi benzer ( $P>0.05$ ) bulunurken, %0.5, %1, %1.5 ve %2 seviyelerinin  $\text{NH}_3\text{-N}$  değerini düşürdüğü ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir. *In vitro* organik madde sindirim ve metabolik enerji değerleri okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave seviyesinin artışına bağlı olarak düşüş göstermiştir ( $P<0.05$ ). En düşük *in vitro* organik madde sindirim değerleri (%54.58 ve %54.75) ve en düşük metabolik enerji değerleri (6.84 ve 6.95 MJ/kg KM) %1 ve %2.5 düzeylerinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılan yem maddelerinden buğday samanına ait *in vitro* 24. saat gaz ( $\text{CH}_4$  ve  $\text{CO}_2$ ) oluşumu, pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Buğday samanı için farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin  $\text{CH}_4$  ve  $\text{CO}_2$  gazı miktarı ile pH, amonyak azotu, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerlerinde istatistiksel farklılık oluşturmuştur ( $P<0.05$ ). Metan gazı ( $\text{CH}_4$ ) parametresi bakımından, kontrol (30.08 ml/g KM) ile kıyaslandığında en düşük  $\text{CH}_4$  gazı üretimi (14.19 ml/g KM), kuru maddeye %2 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave edilen uygulamadan elde edilmiştir ( $P<0.05$ ). Karbondioksit gazı ( $\text{CO}_2$ ) parametresi bakımından tüm katkı seviyeleri kontrol grubundan düşük ( $P<0.05$ ) bulunmuş, en düşük  $\text{CO}_2$  değeri ise %2 okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilen değerden elde edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24. saat pH değerleri kuru maddeye %1.5 ve %2 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile benzer bulunmuş ( $P>0.5$ ), %0.5, %1 ve %2.5 seviyeleri ise kontrol grubundan düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). *In vitro* 24. saat amonyak azotu ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) değerleri kıyaslandığında kontrol grubu ile %0.5, %1.5, %2 ve %2.5 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilaveleri benzer ( $P>0.05$ ) bulunurken, %1 seviyesinin  $\text{NH}_3\text{-N}$  değerini arttırdığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). *In vitro* organik madde sindirim ve metabolik enerji değerleri okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave seviyesinin artışına bağlı olarak düşüş göstermiştir ( $P<0.05$ ). En düşük *in vitro* organik madde sindirim değerleri (%50.96 ve %51.18) ve en düşük metabolik enerji değerleri (6.22 ve 6.25 MJ/kg KM) %1.5 ve %2.5 düzeylerinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesi ile elde edilmiştir.

**Tablo 5.** Çayır kuru otuna farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin *in vitro* gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.

Parametreler	Okaliptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı seviyesi						SEM
	Kontrol	%0.5	%1	%1.5	%2	%2.5	
CH <sub>4</sub> ml/ g KM	30.00 <sup>a</sup>	21.13 <sup>b</sup>	20.40 <sup>bc</sup>	19.33 <sup>cd</sup>	18.16 <sup>d</sup>	15.68 <sup>e</sup>	0.55
CO <sub>2</sub> ml/ g KM	169.40 <sup>a</sup>	140.84 <sup>b</sup>	123.67 <sup>e</sup>	132.90 <sup>cd</sup>	136.16 <sup>bc</sup>	128.59 <sup>de</sup>	2.39
pH	6.77 <sup>a</sup>	6.76 <sup>a</sup>	6.83 <sup>a</sup>	6.49 <sup>c</sup>	6.58 <sup>bc</sup>	6.68 <sup>ab</sup>	0.07
NH <sub>3</sub> -N, mg/dl	12.75 <sup>a</sup>	11.25 <sup>bc</sup>	10.50 <sup>c</sup>	11.00 <sup>c</sup>	10.75 <sup>c</sup>	12.25 <sup>ab</sup>	0.37
İVOMS, % KM	65.07 <sup>a</sup>	57.79 <sup>b</sup>	54.58 <sup>d</sup>	55.18 <sup>cd</sup>	56.63 <sup>bc</sup>	54.75 <sup>d</sup>	0.53
ME, MJ/ kg KM	8.53 <sup>a</sup>	7.24 <sup>b</sup>	6.84 <sup>c</sup>	7.18 <sup>b</sup>	7.24 <sup>b</sup>	6.95 <sup>c</sup>	0.07

a,b,c,d,e: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur (P<0.05).

**Tablo 6.** Buğday samanına farklı seviyelerde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin *in vitro* gaz oluşumu ve amonyak azotu üzerine etkisi.

Parametreler	Okaliptus ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ) yaprağı seviyesi						SEM
	Kontrol	%0.5	%1	%1.5	%2	%2.5	
CH <sub>4</sub> ml/ g KM	30.08 <sup>a</sup>	25.16 <sup>b</sup>	20.33 <sup>c</sup>	17.69 <sup>d</sup>	14.19 <sup>e</sup>	14.19 <sup>e</sup>	0.75
CO <sub>2</sub> ml/ g KM	147.13 <sup>a</sup>	128.52 <sup>b</sup>	121.46 <sup>b</sup>	104.83 <sup>c</sup>	84.49 <sup>d</sup>	107.67 <sup>c</sup>	2.72
pH	6.89 <sup>a</sup>	6.72 <sup>bc</sup>	6,59 <sup>c</sup>	6.84 <sup>ab</sup>	6.85 <sup>ab</sup>	6.64 <sup>c</sup>	0.06
NH <sub>3</sub> -N, mg/dl	12.75 <sup>b</sup>	12.00 <sup>bc</sup>	22.25 <sup>a</sup>	13.00 <sup>b</sup>	11.00 <sup>b</sup>	13.50 <sup>b</sup>	0.56
İVOMS, % KM	61.85 <sup>a</sup>	57.24 <sup>b</sup>	54.95 <sup>c</sup>	50.96 <sup>d</sup>	46.51 <sup>e</sup>	51.18 <sup>d</sup>	0.64
ME MJ/ kg KM	7.85 <sup>a</sup>	7.32 <sup>b</sup>	6.66 <sup>c</sup>	6.25 <sup>d</sup>	5.51 <sup>e</sup>	6.22 <sup>d</sup>	0.07

a,b,c,d,e: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur (P<0.05).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) bitkisi ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğunun okaliptus bitkisinin doğrudan yem katkı maddesi olarak kullanımı yerine daha çok yapraklarından elde edilen esansiyel yağlarla yapılmıştır. Kumar ve ark. (62) okaliptus esansiyel yağı ile yaptıkları çalışmada, *in vitro* gaz üretim denemesinde rumen sıvısı tampon çözelti içerisine 0, 0.33, 0.66, 1.00, 1.33 ve 1.66 µl/ml dozunda yağ kullanmışlar ve metan üretiminin %10-56 düzeyinde azaldığı, 1.00 µl/ml rumen sıvısı seviyesinin üzerindeki seviyelerde ise *in vitro* sindirim değerinin azaldığı bildirilmiştir. Sallam ve ark. (106) ise *in vitro* gaz üretim denemesinde rumen sıvısı tampon çözelti içerisine 25, 50, 100 ve 150 µl/ 75 ml rumen sıvısı tampon çözelti (25 ml rumen sıvısı, 50 ml tampon çözelti) ilave etmişler ve sırasıyla metan azalış oranlarını %26, %46.8, %77.3 ve %85.3 tespit etmişler, metan üretimini azaltmada düşük seviyelerde okaliptus yağının, sindirilebilirlik değerlerine olumsuz etki oluşturmaksızın kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Sallam ve ark. (107), koyunlarla yaptıkları *in vivo* çalışmada günlük rasyona ilave olarak 10 ve 20 ml/gün okaliptus yağı ilave ederek yaptıkları çalışmada 10 ml/gün okaliptus yağı ilavesinin sindirim değerlerine olumsuz etki göstermeksizin metan üretimini azalttığını bildirmişlerdir.

Okaliptus bitkisinde tanen içeriği oldukça yüksektir. Tanenler polifenolik bileşikler olup, molekül ağırlıkları ve diğer maddelerle (özellikle proteinlerle) kompleks bileşik oluşturma kapasiteleri yüksektir (6). Tanenlerin antibakterial etkileri tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, muhtemelen bu etkilerini metan üretiminde rol oynayan mikroorganizmaların hücrelerindeki enzim ve proteinlerine bağlanarak bakterisid ve bakteriostatik etki göstermektedirler (117). Tanenler ayrıca rumendeki protozoalar üzerinde dolaylı etki göstererek metan üretimi üzerine etki göstermektedirler. Tanenler selülotik mikroorganizmalar üzerine olumsuz etki yaparak asetik asit üretimini azaltırlar, böylece metan üretimi için ihtiyaç duyulan karbondioksit ve hidrojen iyonu üretimini sınırlamaktadırlar (96, 127). Kondanse tanenler dolaylı etkileri ile selüloz sindirimini azaltarak metan üretimini düşürürler (39). Kondanse tanen içeren bitkisel kaynakların metan üretimini azaltma yönünde sınırlı sayıda çalışma yapılmış (2, 134, 135) genel olarak tanenlerin yemin sindirilebilirliğini düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç tanenlerin, yemdeki protein ve şekerlerle kompleks yapı oluşturarak yemin değerlendirilmesini düşürmektedirler. Bir başka düşünce ise tanenlerin sellulaz ve ksilinaz enzimlerinin

aktivitelerini azaltmalarından kaynaklanabilmektedir (104). Yapılan bir çalışmada (18) birçok bitkide bulunan tanenlerin uygun miktarda kullanıldığında rumende yıkımlanan protein miktarını azaltarak duedonuma geçen miktarını arttırdığını bildirmektedirler. Bu çalışmada kullanılan okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarının kondanse tanen içeriği 17.33 g/kg KM olarak belirlenmiş olup bu değer bazı kaynak bildirimlerinden yüksek bulunurken (108, 118), bazı kaynak bildirimlerinden düşük bulunmuştur (105). Bu çalışmanın sonuçları bütün olarak değerlendirildiğinde tüm yem maddeleri için okaliptus seviyesinin artışına bağlı olarak bazı parametrelerde (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>-N, İVOMS ve ME) düşüşlerin (P<0.05) olduğu, ancak buğday samanı için rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N okaliptus seviyesinin artışına bağlı olarak farklılığın olmadığı (P>0.05) görülmüştür. Metan üretimini azaltmak amacıyla okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprakları kullanılarak etkilerin incelendiği çok sayıda çalışma (38, 62, 63, 97, 106, 107, 108, 118) bulunmaktadır. Bu çalışmada bazı yem maddeleri (mısır silajı, yonca kuru otu ve çayır kuru otu) için okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) seviyesinin artışına bağlı olarak rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N ve *in vitro* organik madde sindirim değerlerinin genel olarak düşük bulunmaları kullanılan okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yapraklarında bulunan yüksek kondanse tanen içeriğine bağlanabilir. Benzer şekilde Manh ve ark. (71) pirinç samanına kuru madde esasına göre %1-6 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave etmişler ve kuru maddeye %2'den yüksek düzeyde okaliptus yaprağı ilavesinin *in vitro* organik madde sindirim değerleri ile *in vitro* metan üretimini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yine Manh ve ark. (72) holstein sığırların rasyonlarına günlük 100 ve 200 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilave etmişler ve rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N ve CH<sub>4</sub> değerlerini kontrole göre istatistiksel olarak düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 200 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı protozoa, toplam bakteri, proteolitik ve selulolitik bakteri düzeylerini de azalttığı belirtilmiştir. Başka bir *in vivo* çalışmada (118) hayvan başına günlük 40 ve 80 gr öğütülmüş okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N değerini etkilemediğini, ancak 120 gr okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin NH<sub>3</sub>-N değerini istatistiksel olarak düşürdüğünü bildirmişlerdir. Goel ve ark. (38), Mehndi (*Lawsonia inermis*) ve okaliptus yapraklarının karışımından (1:1) elde ettikleri katkıdan %10 düzeyinde buğday samanına ilave ederek uyguladıkları *in vitro* gaz üretim tekniğinde katkının metan üretimi ile rumen sıvısı NH<sub>3</sub>-N değerini azalttığını bildirmektedirler. Kumar ve ark. (63) yüksek (%60 buğday samanı), orta (%50 buğday samanı) ve düşük düzeyde (%40 buğday samanı) seluloz içeren rasyonlara %2 düzeyinde okaliptus (*Eucalyptus globules*) yaprağı ilave ederek *in vitro* çalışma yapmışlardır. Yüksek ve orta düzeyde seluloz içeren

rasyonlarda CH<sub>4</sub> değerinin azaldığını, düşük düzeyde seluloz içeren rasyonda ise rakamsal bir artış olduğunu bildirmektedirler. Aynı çalışmada benzer olarak yüksek ve orta düzeyde seluloz içeren rasyonlara okaliptus (*Eucalyptus globules*) yaprağı ilavesinin rumen sıvısı protozoa değerini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen *in vitro* verilere dayanılarak, kaba yemlere okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağı ilavesinin *in vitro* metan ve karbondioksit gazı üretimini azalttığı söylenebilir. Ancak rasyonlara ilave edilecek okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*) yaprağının yem tüketimi ile hayvansal üretim ve performansa etkisinin tam olarak ortaya konabilmesi açısından *in vivo* hayvan denemelerinin de yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. African Journal of Biotechnology. 2010; 9(4):531-535.
2. Animut G, Goetsch, AL, Puchala, Patra, RAK, Sahlu T, Varel VH, and Wells J. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. Anim Feed Sci Technol. 2008; (144):212-227.
3. Anonim 2009. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Kyoto\\_Protokol%C3%BC](http://tr.wikipedia.org/wiki/Kyoto_Protokol%C3%BC). Erişim Tarihi: 10.04.2013.
4. Anonim. Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü'nün hazırladığı "Türkiye'yi ne bekliyor" raporu. Ankara, 2002.
5. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 2005, USA.
6. Barszcz M. and Skomial J. Possibilities of tannins utilization in the protection of animals and human health. Post Nauk Roln.2011; (2):95-110.
7. Beauchemin KA. and McGinn SM. Enteric methane emissions from growing beef cattle as affected by diet and level of intake. Can J Anim Sci. 2006; (86):401-408.
8. Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. Aust J Exp Agric. 2008; (48):21-27.
9. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, Beauchemin KA. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim Feed Sci Tech. 2008; (145):209-228.
10. Benchaar C, Greathead H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Anim Feed Sci Tech. 2011; (166-167):338-355.
11. Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, and Masse D. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. Can J Anim Sci. 2004; (84):319-336.
12. Bodas R, Lopez S, Fernandez M, Garcia-Gonzalez R, Rodriguez AB, Wallace RJ, Gonzalez JS. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as

- antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim Feed Sci Tech.* 2008; (145):245-258.
13. Boland DJ, Brophy JJ, House APN. *Eucalyptus Leaf Oils: Use, Chemistry, Distillation and Marketing.* Inkata Press Melbourne, 1991.
  14. Bölükbaşı F. *Fizyoloji Ders Kitabı. Rumende Sindirim Olayları.* Cilt 1, Sayfa, 224 Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Yayınları, No: 413, Ankara, 1989.
  15. Brooker MIH, Connors JR, Slee AV, Duffy S. *EUCLID: eucalyptus of southern Australia (CD Rom),* CSIRO Publishing, Collingwood, 2002.
  16. Bruel S, and Coote P. Preservative agents in foods, Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 1999; (50):1-17.
  17. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *Int J Food Microbiol.* 2004; (94):223–253.
  18. Carulla JE, Kreuzer M, Machmüller 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.
  19. Castillo C, Benedito JL, Mendez J, Pereira V, Lopez-Alonso M, Miranda M, and Hernandez J. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim Feed Sci Tech.* 2004; (115):101-116.
  20. Chalchat JC, Kundakovic T, Gorunovic MS. Essential oil from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Myrtaceae from Jerusalem. *J Essential Oil Res.* 2001; 13(2):105-107.
  21. Christopherson CT, Wright ADG, and Vorcoe PE. *In vitro* methane emission and acetic: propionic ratio are decreased when artificial stimulation of rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *J Anim Sci.* 2008; (86):384-389.
  22. Cieslak A, Potkanski A, Kowalczyk J, Szumacher-Strabel M, Czaczyk K, Gubała A, Janicki M, Szymankiewicz E. Methane production in *in vitro* studies as an effect of different additives to grass silage. *J Anim Feed Sci.* 2005; 14(1):307-310.
  23. Crutzen P, Aselmann I, Seiler W. Methane production by domestic animals, wild ruminants, and other herbivorous fauna and humans. *Tellus* 1986; (38):271.
  24. Czerkawski JW. Methane production in ruminants and its significance. *World Review of Nutrition and Dietetics* 1969; (11)240-282.
  25. Davidson PM, Naidu AS. Phyto-phenols. In: A.S. Naidu (Editor). *Natural Food Antimicrobial Systems.* CRC Press, Boca Raton, FL, 2000; 265-294.

26. Demeyer D, Fiedler D, De Graeve KG. Attempted induction of reproductive acetogenesis into the rumen fermentation *in vitro*. *Reprod Nutr Dev*. 1996; (36):233-240.
27. Dethier M, Nduwimana A, Cordier Y, Menut C, Lamaty G. Aromatic plants of tropical central Africa. XVI. Studies on essential oils of five *Eucalyptus* species grown in Burundi *J Essential Oil Res*. 1994; (6):469-473.
28. Dohme F, Machmuller A, Estermann BL, Pfister P, Wasserfallen A, Kreuzer M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters of Applied Microbiology*. 1999; (29):187-192.
29. Erasmus LJ, Botha PM, and Kistner A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J Dairy Sci*. 1992; (75):3056-3065.
30. Eugene M, Masse D, Chiquette J, Benchaar C. Short communication: Metaanalysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci*. 2008; (88):331-334.
31. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. FAO Statistical Database, FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Accessed April 23, 2008.
32. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, and Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull WHO*. 1985; (63):965-981.
33. Ferry JG. Methane from acetate. *Journal of Bacteriology*. 1992; 174 (17):5489-5495.
34. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal system: a review. *Br J Nutr*. 2002; 88(6):587-605.
35. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989; (66):365-378.
36. Ghisalberti EL. Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. *Phytochemistry*. 1996; (41):7-22.
37. Gibson GR, Macfarlane S, Macfarlane GT. Metabolic interactions involving sulphate reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol Eco*. 1993; (12):117-125.
38. Goel N, Sirohi SK, Dwivedi J, and Chaudhary PP. Efficacy of different plant part combinations as rumen fermentation modulator in wheat straw based diet evaluated *in vitro*. *Annals of Biological Research*. 2011; 2(6):91-96.
39. Goel G, Makkar HPS. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins, a status review. *Trop Anim Health Prod*. 2012; (44):729-739.

40. Greathead H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc Nutr Soc* 2003; (62):279-290.
41. Guo YQ, Liu JX, Lu Y, Zhu WY, Denman SE, and McSweeney CS. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Lett Appl Microbiol.* 2008; (47):421-426.
42. Hariadi BT, Santoso B. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J Sci Food Agric.* 2010; (90):456-461.
43. Harrison GA, Hemken RW, Dawson KA, Harmon RJ, and Barker KB. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial population. *J Dairy Sci.* 1988; (71):2967-2975.
44. Hegarty RS. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Aust J Agric Res.* 1999; (50):1299-1305.
45. Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR, Machmuller A. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim Feed Sci Tech.* 2003; (109):79-94.
46. Hino T, Takeshi K, and Kanda M. Effect of aibellin, a novel peptide antibiotic on rumen fermentation *in vitro*. *J Dairy Sci.* 1993; (76):2213-2221.
47. Hobson PN, and Stewart CS. (Eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman, Hall, 1997, London.
48. Holter JB, and Young AJ. Methane production in dry and lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1992; (75):2165-2175.
49. IPCC. *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Eds. RK. Pachauri and A. Reisinger). Geneva, Switzerland: International Panel on Climate Change (IPCC), 2007.
50. IPCC. *Fourth Assessment Report. Climate Change 2007: Synthesis Report. Summary for Policymakers*, pp. 2-5, 2007a.
51. Jalc D, Potkanski A, Szumacher-Strabel M, Kowalczyk J, Cieslak A. The effect of a high concentrate diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J Anim Feed Sci.* 2006a; 15(1):137-140.
52. Jalc D, Potkanski A, Szumacher-Strabel M, Kowalczyk J, Cieslak A. The effect of a high forage diet and different oil blends on rumen fermentation *in vitro*. *J Anim Feed Sci.*, 2006b; 15(1):141-144.

53. Janssen PH, Kirs M. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol.* 2008; (74):3619-3625.
54. Jarvis GN, Strompl C, Burgess DM, Skillman LC, Moore ER, Joblin KN. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr Microbiol.* 2000; (40):327-332.
55. Johnson KA, Huyler M, Westberg HH, Lamb BK, and Zimmerman P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environ Sci Technol.* 1994; (28):359-362.
56. Johnson KA, and Johnson DE. Methane emission from cattle. *J Anim Sci.* 1995; (73): 483-2492.
57. Johnson DE, and Ward GM. Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess.* 1996; (42):133-141.
58. Kamra DN. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 2005; (89):124-135.
59. Khalil MAK. Atmospheric methane: an introduction. In: Khalil, M. (Ed.), *Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment*. Springer-Verlag, New York, NY, 2000;1-8.
60. Kohn RA, and Boston RC. The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. Page 11 in *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. (Ed. JP. McNamara, J. France, and DE. Beever) CAB International, 2000, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
61. Krehbiel CR, Rust SR, Zhang G, and Gilliland SE. Bacterial direct-fed Microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J Anim Sci.* 2003; (81):120-132.
62. Kumar R, Kamra DN, Agrawal N, Chaudhary LC. Effect of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim Nutr Feed Technol.* 2009; (9):237-243.
63. Kumar SS, Navneet G, Mehta M, Mohini M, Pandey P, Shete S, and Brisketu K. Efficacy of garlic, eucalyptus and neem powders on rumen modulation, methanogenesis and gas production kinetics in wheat straw based diet evaluated *in vitro*. *Wayamba Journal of Animal Science.* 2012; 4(2):331-339.
64. Lanigan GW, Payne AL, and Peterson JE. Antimethanogenic drugs and Heliotropium europaeum poisoning in penned sheep. *Australian Journal of Agricultural Research.* 1978; (29):1281-1291.

65. Leung AY, Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. 2nd Edition. John Willey & Sons. 1996; 232-233.
66. Mabberly DJ. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, UK.
67. Machmüller A, and Kreuzer M. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can J Anim Sci.* 1999; (79):65-72.
68. Machmüller A, Soliva CR, Kreuzer M. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition.* 2003; (90):529-540.
69. Maia MRG, 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.
70. Makkar HPS, Blummel M, and Becker K. Formation of complex between Polyvinylpyrrolidones or polyethylene glycol and tannins and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* technique. *Br J Nutr.* 1995; (73):897-913.
71. Manh NS, Hung LV, Long NT, Don NV, and Huyen NT. Effects of eucalyptus (*E. Camaldulensis*) leaf powder (ELP) on rumen fermentation, feed digestibility and methane production in ruminants by using *in vitro* gas production technique. Proceedings of International Conference Livestock-Based Farming Systems, Renewable Resources and the Environment. (Ed. R. Preston and S. Southavong) 6-9 June 2012, 2012a, Dalat, Vietnam.
72. Manh NS, Wanapat M, Uriyapongson S, Khejornsart P, and Chanthakhoun V. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *African Journal of Agricultural Research.* 2012b; 7(14):2142-2148.
73. Markham R. Distillation apparatus suitable for microkjeldahl analysis. *Biochem. J.* 1942; (36):790.
74. Martin C, Morgavi DP, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal.* 2010; (4):351-365.
75. Mathers JC, and Miller EL. Some effects of chloral hydrate on rumen fermentation and digestion in sheep. *J Agr Sci.* 1982; (99):215-224.
76. McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, and Colombatto D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J Anim Sci.* 2004; (82):3346-3356.

77. McGuffey RK, Richardson LF, and Wilkinson JD. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *J Dairy Sci.* 2001; (84):194-203.
78. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, and Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal of Agricultural Science.* 1979; (93):217-222.
79. 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.
80. Miller TL. The ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: Englehardt, (Eds. WV. Leonhard-Marek, S. Breves, G. Giesecke), *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.* Ferdinand Enke Verlag, Berlin, 1995; 317-331.
81. Mills JAN, Dijkstra J, Bannick A, Camel SB, Krehreab E, and France JA. Mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation and application. *J Anim Sci.* 2001; (79):1584-1597.
82. Monteny GJ, Bannink A, Chadwick D. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agric Ecosyst Environ.* 2006; (112):163-170.
83. Moss AR, Jounay JP, and Newbold CJ. Methane production by ruminants: It's contribution to global warming. *Ann Zootech.* 2000; (49):231-253.
84. Newbold CJ, Frumholtz PP, and Wallace RJ. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. *J Agric Sci Camb.* 1992; (119):423-427.
85. Newbold CJ, Lassalas B, and Jouany JP. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl Microbiol.* 1995; (21):230-234.
86. Newbold CJ, Lopez S, Nelson N, Oudo JO, Wallace RJ, Moss AR. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 2005; (94):27-35.
87. Newman DJ, Cragg GM, and Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Natl Prod Rep.* 2000; (17):215-234.
88. Ningrat RWS, Garnsworthy PC, Newbold CJ. Saponin fractions in *Sapindus rarak*: effects on rumen microbes. *Reprod Nutr Dev.* 2002; 42 (Suppl.1):82 (Abstr.).

89. O'Mara F. Greenhouse gas production from dairying: reducing methane production. *Advances in Dairy Technology* 2004; (16):295-309.
90. Offner A, and Sauvant D. Thermodynamic modelling of ruminal fermentations. *Anim Res.* 2006; (55):343-365.
91. Oliveira SG, Berchielli TT, Pedreira MS, Primavesi O, Frighetto R, Lima MA. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; (135):236-248.
92. Onol B, and Semazzi FHM. Regionalization of Climate Change Simulations Over the Eastern Mediterranean. *Journal of Climate.* 2009; (22):1944-1961.
93. Önal B, Semazzi F, Ünal YS, Dalfes HN. Regional Climatic Impacts of Global Warming over the Eastern Mediterranean, Proceedings of the International Conference on Climate Change and Middle East; Past, Present and Future, 20-23 November 2007, İstanbul.
94. Öztürk H. *In vitro* Studien zum Einfluss von Topinamburmehl und *Saccharomyces boulardii* auf den mikrobiellen Vormagenstoffwechsel. Diss, Tierärztliche Hochschule Hannover, PhD Thesis, 2003; 12-40.
95. Pagula FP, Baser KHC, Kurkcuoglu M. Essential oil composition of *E. camaldulensis* Dehn. from Mozambique. *J Essential Oil Res.* 2000; (12):333-335.
96. Patra AK, and Saxena J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009b; (96):363-375.
97. Patra AK. Effects of Essential Oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2011; 1-13.
98. Paustian K, Antle M, Sheehan J, Eldor P. Agriculture's Role in Greenhouse Gas Mitigation. Washington, DC: Pew Center on Global Climate Change; 2006.
99. Pen B, Sar C, Mwenya B, Kuwaki K, Morikawa R, and Takahashi J. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and ethane emission. *Anim Feed Sci Technol.* 2006; (129):175-186.
100. Piacente S, Pizza C, and Oleszek W. Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roetzl: Chemistry and bioactivity. *Phytochem Rev.* 2005; (4):177-190.
101. Rea S, Bowman JP, Popovski S, Pimm C, Wright AD. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. Nov, methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; (57):450-456.



- 102.Reynolds CK, Tyrrell HF, and Reynolds PJ. Effects of diet forage-to-concentrate ration and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production, *J Nutr.* 1991a; (121):994-1003.
- 103.Russell JB and Strobel HJ. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1989; (55):1-6.
- 104.Salawu MB, Acamoic T, Stewart CS, and Roothaert RL. Composition and degradability of different fractions of Calliandra leaves, pods and seeds. *Anim Feed Sci Technol.* 1999; (77):181-199.
- 105.Salem AZ, Robinson PH, El-Adawya MM, Hassan AA. *In vitro* fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; (138):318-330.
- 106.Sallam SMA, Bueno ICS, Brigide P, Godoy PB, Vitti DMSS, and Abdalla AL. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Options Mediterraneennes - Nutritional and foraging ecology of sheep and goats.* 2009a; (85)267-272.
- 107.Sallam SMA, Nasser MEA, Araujo RC, Abdalla AL. Methane emission *in vivo* by sheep consuming diet with different levels of eucalyptus essential oil. 2009b; 210-211 in *Proc. FAO/IAEA Int. Symp. on sustainable improvement of animal production and health, Vienna, Austria.*
- 108.Sallam SMA, Bueno ICS, Nasser MEA, and Abdalla AL. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus Citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. *Italian Journal of Animal Science.* 2010; (9):299-303.
- 109.Sarıpınar D, ve Sulu N, Ruminantlarda probiyotiklerin kullanımı ve rumene etkileri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2005; 11(1):93-98.
- 110.Sauvant D, and Giger-Reverdin P. Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH<sub>4</sub> production in ruminants. In: *Energy and protein Metabolism and Nutrition* (Ed. I. Ortigues-Marty). Wageningen Academic Publishers, 2007; 561-562, Wageningen, The Netherlands.
- 111.Scientific Steering Committee of the European Commission Directorate XXIV. Report on Antibiotic Resistance, May 28, 1999, Brussels, Belgium.
- 112.SPSS, Inc. Statistical package for the social sciences (SPSS/PC+). 1991, Chicago, IL.
- 113.Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006; 82-114.

114. Stewart CS, Bryant MP. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem (Ed. PN. Hobson) Elsevier Applied Science, London, New York, 1988; 21-75.
115. Stewart CS, Flint HJ, and Bryant MP. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem (Ed. PN. Hobson and CS. Stewart). 1997; 10-72. Blackie Academic and Professional Publishers, London.
116. Szumacher-Strabel M, Martin SA, Potkanski A, Cieslak A, Kowalczyk J. Changes in fermentation processes as the effect of vegetable oil supplementation in *in vitro* studies. Journal of Animal Feed Science. 2004; 13(1): 215-218
117. Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. Methane production from *in vitro* rumen incubation with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Anim Feed Sci Technol. 2005; (123-124):403-419.
118. Thao NT, and Wanapat M. Effect of eucalyptus leaf meal supplementation on feed intake ruminal ecology and microbial protein synthesis of swamp buffaloes. Khon Kaen Agr J. 2013; 41(1):75-79.
119. TÜİK. Ulusal seragazı emisyon envanteri raporu 1990-2009. Yayın no:3607, Ankara, 2009.
120. TÜİK. 2011 Yılı Hayvancılık Verileri. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr). Erişim:10.04.2013
121. TÜİK. 2012 Yılı Hayvancılık Verileri. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr). Erişim:10.04.2013
122. USDA. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. 2011. Official USDA Food Plans: Cost of Food at Home at Four Levels, U.S. Average, December 2010.
123. Vabitsch A. Qualitativer Vergleich von Modellen zur Bewertung von Klimaschutzmaßnahmen in Europa unter besonderer Berücksichtigung der Landwirtschaft, Diss. 2006, Hohenheim.
124. Van Kessler JAS, and Russell JB. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiol Ecol. 1996; (20):205-210.
125. Van Nevel CJ, Demeyer DI. Control of rumen methanogenesis Environment. Monitor Assess. 1996; (42):73-97.
126. Van Soest PJ, Robertson JB, and Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci. 1991; (74): 3583-3597.

127. Waghorn GC. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Anim Feed Sci Technol.* 2008; (147):116-139.
128. Wakita M, Masuda T, and Hoshino S. Effects of Salinomycin on the gas production by sheep rumen contents *in vitro*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 1986; (56):243-251.
129. Wallace RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society, 2004; (63):621-629.*
130. Wang CJ, Wang SP, Zhou H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Anim Feed Sci Technol.* 2009; (148):157-166.
131. Wenk C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Aust. J Anim Sci.* 2003; 16(2):282-289.
132. Williams PE, Tait CA, Innes GM, and Newbold CJ. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J Anim Sci.* 1991; (69):3016-3026.
133. Wolin MJ, Miller TL, and Stewart CS. Microbemicrobe interactions In: *The Rumen Microbial Ecosystem.* 2nd ed. (Ed. PJ. Hobson and CS. Stewart), 1997; 467-491. Blackie Acad. Profess. London.
134. Woodward SL, Waghorn GC, Ulyatt MJ, Lassey KR. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production,* 2001; (61):23-26.
135. Woodward SL, Waghorn GC, Lassey KR, Laboyrie PG. Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 2002; (62):227-230.
136. Wuebbles DJ, and Hayhoe K. Atmospheric methane and global change, *Earth-Science Reviews.* 2002; (57):177-210.
137. Yabuuchi Y, Matsushita Y, Otsuka H, Fukamachi K, Kobayashi Y. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. *Anim Sci J.* 2006; (77):300-307.