T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LACTOBACİLLUS PLANTARUM'UN RUMEN SIVISINA İNOKÜLASYONUNUN RUMEN FERMANTASYONU, KURU MADDE VE ORGANİK MADDE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* GAZ ÜRETİM TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Veteriner Hekim Taner LEVENDOĞLU
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Taylan AKSU

VAN-2023

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LACTOBACİLLUS PLANTARUM'UN RUMEN SIVISINA İNOKÜLASYONUNUN RUMEN FERMANTASYONU, KURU MADDE VE ORGANİK MADDE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* GAZ ÜRETİM TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Veteriner Hekim Taner LEVENDOĞLU
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Taylan AKSU

VAN-2023

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TDK-2021-9719 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum *"Lactobacillus plantarum*'un rumen sıvısına inokulasyonunun rumen fermantasyonu, kuru madde ve organik madde sindirilebilirliği ve metan üretimi üzerine etkilerinin *in vitro* gaz üretim tekniği ile belirlenmesi*"* başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Taner LEVENDOĞLU
01.12.2023

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin hazırlanması süreçlerinde, sürekli ilgisi, sabrı ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Taylan AKSU' ya, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. Suphi DENİZ, Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL, Doç. Dr. Bahattin ÇAK ve Doç. Dr. Mehtap GÜNEY'e, denemelerin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen, başta Dr. Öğr. Ü. Çağrı KALE olmak üzere, Dr. Öğr. Ü. Fatma ÖZKAN, Dr. Öğr. Ü. Selçuk ALTAÇLI ve Veteriner Hekim Adem MİS'e, çalışmanın yürütülmesinde mali kaynak sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına ve doktora tez sürem boyunca destekleriyle hep yanımda olan aileme, dostlarıma ve özellikle canım oğlum BUĞRA' ya teşekkür ederim.

Taner LEVENDOĞLU-2023

ÖZET

Levendoğlu T, *Lactobacillus plantarum*'un Rumen Sıvısına İnokulasyonunun Rumen Fermantasyonu, Kuru Madde ve Organik Madde Sindirilebilirliği ve Metan Üretimi Üzerine Etkilerinin *İn Vitro* Gaz Üretim Tekniği ile Belirlenmesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van, 2023. Bu çalışmada, *Lactobacillus plantarum*'un rumen sıvısına inokulasyonu ile rumen fermantasyon parametreleri, in vitro rumen besin madde sindirilebilirliği ve rumen metan üretimine etkileri incelendi. *İn vitro* olarak yürütülmüş bu çalışmada kullanılan rumen sıvısı, kaba yem ağırlıklı beslenen 1 yaşlı rumen kanüllü erkek toklulardan sağlandı. Alınan rumen sıvısı Hohenhaim *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak ilgili parametreler bakımından test edildi. Araştırmada substrat olarak, %60 kaba (yonca) ve %40 konsantre yem içeren toplam rasyon karışımı (TMR) kullanıldı. Rumen sıvısına kırmızı yoncadan izole edilen *Lactobacillus plantarum* RC1.4, tek başına farklı dozlarda (10^6 cfu/200mg substrat, 10^8 cfu/200mg substrat, 10^{10} cfu/200mg substrat) ve canlı maya (*Saccharomyces cerevisiae*, 10^7 cfu/200mg substrat) ile kombine edilerek inokule edildi. İnkübasyonun 3., 6., 12., ve 24. saatlerinde rumen fermantasyon parametreleri (pH, amonyak, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit, toplam uçucu yağ asitleri) ile inkünasyonun 24. saatinde toplam gaz üretimi (TGÜ), metan (CH_4), *in vitro* organik madde sindirimi (İVOMS), mikrobiyal protein (MP) ve mikrobiyal protein sentezleme etkinlikleri (MPSE) incelendi. Araştırma sonucunda, *L. plantarum RC1.4'*ün 10^6cfu/200mg substrat dozunda inokulasyonunun, CH_4 üretimini önemli miktarda düşürüken, IVOMS ve mikrobiyel protein üretiminde herhangi bir iyileştirme sağlamadığı; *L. plantarum RC1.4'*ün 10^{10}cfu/200mg substrat dozunda inokulasyonunun ise CH_4 üretimini düşürürken IVOMS'yi arttırdığı, ancak mikrobiyel protein üretimini düşürdüğü; her iki *L. plantarum* yoğunluğunun maya ile kombine edilmesinin mikrobiyel protein üretiminde bir iyileştirme sağlamadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *L. plantarum RC1.4*, Rumen Sıvısı İnokulasyonu, *İn Vitro* Rumen Fermantasyonu, Metan Üretimi.

ABSTRACT

Levendoglu T, Determination of the Effects of *Lactobacillus plantarum* İnoculation into the Rumen Fluid on Ruminal Fermentation, Dry Matter and Organic Matter Digestibility and Methane Production Using *İn Vitro* Gas Production Technique, University of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Science, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Ph.D Thesis, Van, 2023. In this study, the effects of *Lactobacillus plantarum* inoculation into rumen fluid on rumen fermentation parameters, in vitro rumen nutrient digestibility and rumen methane production were examined. The rumen fluid used in this in vitro study was obtained from 1-year-old rumen cannulated rams fed mainly roughage. The collected rumen fluid was tested for relevant parameters using the Hohenheim *in vitro* gas production technique. Total ration mixture (TMR) containing 60% rough (alfalfa) and 40% concentrate feed was used as the substrate in the study. *Lactobacillus plantarum RC1.4*, isolated from red clover, was inoculated to the rumen fluid at different doses alone (10^6 cfu/200mg substrate, 10^8 cfu/200mg substrate, 10^{10} cfu/200mg substrate) and combined with live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, 10^7 cfu/200mg substrate). was inoculated. Rumen fermentation parameters (pH, ammonia, lactic acid, acetic acid, propionic acid and butyric acid, total volatile fatty acids) and, total gas production (TGU), and methane (CH_4) at the 3rd, 6th, 12th and 24th hours of incubation. In addition, *in vitro* organic matter digestion (IVOMS), microbial protein (MP) and microbial protein synthesis activities (MPSE) were examined at 24th hour of incubation**.** As a result of the experiment, it was found that the inoculation of *L. plantarum RC1.4* at a dose of 10^6cfu/200mg substrate significantly reduced CH_4 production and did not provide any improvement in IVOMS and microbial protein production; inoculation of *L. plantarum RC1.4* at a dose of 10^{10}cfu/200mg substrate decreased CH_4 production and increased IVOMS, but decreased microbial protein production; It was also determined that combining both the *L. plantarum RC1.4* dosages with yeast did not provide an improvement in microbial protein production.

Key Words: *L. plantarum RC1.4*, Rumen Fluid Inoculation, *In Vitro* Rumen Fermentation, Methane Production

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY……... II
ETİK BEYAN…… III
TEŞEKKÜR……..... IV
ÖZET…….. V
ABSTRACT……... VI
İÇİNDEKİLER…….. VII
SİMGELER VE KISALTMALAR…… IX
ŞEKİLLER LİSTESİ…….. XI
TABLOLAR LİSTESİ……... XII
1. GİRİŞ……. 1
2.GENEL BİLGİLER…… 3
2.1. Rumen Ekosistemi ve Sindirim Fizyolojisi…….. …….. 3
2.2. Ruminantlarda Metan Üretimi ve Çevresel Etkileri…… 5
2.3. Enterik Metan Üretimini Azaltma Stratejileri……. 7
2.3.1. Yem bileşiminin değiştirilmesi……. 7
2.3.2. Organik yem katkı maddeleri…… ……. 8
2.3.3. Doğrudan yedirilen mikrobiyaller(DFM'ler)/probiyotikler…….. 9
3. GEREÇ VE YÖNTEM……... 16
3.1. Gereç…… 16
3.1.1. Yem materyali……... 16
3.1.2. Lactobacillus plantarum RC1.4 ve Saccaromyces cerevisiae…… 16
3.1.3. Rumen sıvısı……... …….. 16
3.1.4. Yapay tükürük…… …….. 16
3.2. Yöntem…… 17
3.2.1. Substratın (TMR) besin madde kompozisyonlarının belirlenmesi… 17
3.2.2. İnokulasyonların yoğunluklarının belirlenmesi……. 17
3.2.3. Deneme planı……. 17
3.2.4. In vitro gaz üretim tekniğinin uygulanması…….. 19
3.2.5. İstatiksel Analizler……. 22
4. BULGULAR…….. 24

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……... 37
KAYNAKLAR……... 51
ÖZGEÇMİŞ…… 66
EKLER……... 67
Ek 1. Etik Kurul raporu……... 67
Ek 2. Tez Orjinallik raporu…….. 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA : Asetik Asit

AA/PA : Asetik Asit/ Propiyonik Asit

ADF : Asit Deterjan Fiber

BA : Bütirik Asit

cfu : Koloni Oluşturan Birimler

CH_4 : Metan

CO_2 : Karbondioksit

DFM : Doğrudan Beslenen Mikrobiyaller

GSD : Gerçek Sindirilme Derecesi

GSKM : Gerçek Sindirilebilir Kuru Madde

H^+ : Hidrojen İyonu

H_2 : Hidrojen

HK : Ham Kül

HP : Ham Protein

HS : Ham Selüloz

HY : Ham Yağ

IVOMS : İn Vitro Organik Madde Sindirimi

KM : Kuru Madde

LA : Laktik Asit

LAB : Laktik Asit Bakterileri

LP1 : *Lactobacillus plantarum* 10^6 log cfu

LP2 : *Lactobacillus plantarum* 10^8 log cfu

LP3 : *Lactobacillus plantarum* 10^{10} log cfu

LP1M : *Lactobacillus plantarum* 10^6 log cfu +*Saccharomyces cerevisiae* 10^7 log cfu

LP2M : *Lactobacillus plantarum* 10^8 log cfu +*Saccharomyces cerevisiae* 10^7 log cfu

LP3M : *Lactobacillus plantarum* 10^{10} log cfu +*Saccharomyces cerevisiae* 10^7 log cfu

LUB : Laktik Asit Kullanan Bakteriler

M : *Saccharomyces cerevisiae* 10^7 log cfu

MP **:** Mikrobiyal Protein

MPSE **:** Mikrobiyal Protein Sentez Etkinliği

NDF **:** Nötral Deterjan Fiber

NH_3-N **:** Amonyak Azotu

NPN **:** Protein Niteliğinde Olmayan Azotlu Bileşikler

PA **:** Propiyonik Asit

pH **:** Potansiyel Hidrojen

SC **:** Saccharomyces cerevisiae

TF **:** Taksimat Faktörü

TGÜ **:** Total Gaz Üretimi

TUYA **:** Total Uçucu Yağ Asitleri

UYA **:** Uçucu Yağ Asitleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İn vitro gaz üretim şırıngası 18
Şekil 2. Hohenheim ünitesi su banyosu. 19
Şekil 3. Metan gazı ölçüm cihazı. 19
Şekil 4. Kaynatma ünitesi. 22
Şekil 5. İnokulasyonların 24. saatteki in vitro gaz üretimi parametreleri üzerine etkileri. 25
Şekil 6. İnokulasyonların 24. saatteki in vitro mikrobiyel protein üretim parametreleri üzerine etkileri 27
Şekil 7. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen asetik asit miktarı üzerine etkileri…… ……. 31
Şekil 8. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen propiyonik asit miktarı üzerine etkileri 32
Şekil 9. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen A/P oranı üzerine etkileri. 32
Şekil 10. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen laktik asit miktarı üzerine etkileri 33
Şekil 11. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen bütirik asit miktarı üzerine etkileri 34
Şekil 12. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen total uçucu yağ asitleri üzerine etkileri 34
Şekil 13. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen pH'sı üzerine etkileri. 35
Şekil 14. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen amonyak azotu üzerine etkileri 36

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan TMR'ın ham besin madde (% KM) içerikleri..... 24

Tablo 2. İnokulasyonların 24. saatteki *in vitro* gaz üretimi parametreleri üzerine etkileri. 24

Tablo 3. İnokulasyonların 24. saatteki *in vitro* mikrobiyel protein üretim parametreleri üzerine etkileri. 26

Tablo 4. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkileri……. 27

1. GİRİŞ

Gelecek on yılda, 9 milyar sınırına dayanacağı tahmin edilen Dünya nüfusunun (FAO, 2018) yetersiz beslenen insan sayısını daha da arttırabileceği endişesi (FAO, 2021) hayvansal üretimde hayvan sağlığını korumanın yanı sıra sınırlı yem kaynaklarının daha verimli kullanılmasını ve elde edilen hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesinin arttırılmasını da zaruri hale getirmektedir. Diğer taraftan yoğun hayvansal üretimin çevresel kirletici etkileri de bir başka önemli sorun ve sınırlandırıcı faktör olarak, hayvansal üretim stratejileri üzerinde sürdürülebilir çevreci üretim modellerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir.

Özellikle artan et ve süt üretiminde ruminantların sindirim sistemlerinde mikrobiyel fermantasyon yolu ile üretilen metan (CH_4) ve karbondioksit (CO_2) önemli birer sera gazı kaynaklarıdır (Elghandour ve ark., 2016). Metan üretimi ruminantlar için sadece enerji kaybına sebep olmayıp (sindirilen brüt enerjinin %2-12'si) aynı zamanda küresel ısınmaya sebebiyet veren temel zararlı gazlardan birisidir (IEA, 2022). Bu nedenle son yıllarda ruminant beslemede, temel amacı ruminal sindirimi iyileştirerek yemlerin hayvana yarayışlılık düzeyini arttırmak ve aynı zamanda metan üretimini azaltmak olan ekzojen enzimlerin (Kholif ve ark., 2017), uçucu yağların (Hernandez ve ark., 2017), bitki ekstraktlarının (Elghandour ve ark., 2018) ve probiyotikler veya mikrobiyal katkı maddelerinin (Elghandour ve ark., 2017) kullanımı gibi birçok strateji dikkate alınmaktadır.

Mikrobiyal yem katkı maddelerinin kullanımı, gerek hayvan performansının iyileştirilmesi gerekse rumen fermantasyonunun düzenlenerek sera gazı emisyonlarının azaltılması bakımından faydalı olabileceklerini göstermektedir (Direkvandi ve ark., 2021; Ardani ve ark., 2023). Mikrobiyel yem katkı maddelerinin esas kullanım amaçları yem verimliliğini ve performansını arttırmak, rumen ekosistemini ve biyofermantasyonunu değiştirmek, beslenme bozukluklarını önlemek (Direkvandi ve ark., 2020) ve ayrıca buzağılarda ishal insidansını azaltmaktır (Nagashima ve ark., 2010). Ancak yem katkı maddelerinin sera gazı üretimi üzerindeki etkileri daha ilgi çekicidir. Bu anlamda en yaygın olarak laktat üreten bakteriler (LAB) (*Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Streptococcus, ve Bacillus*) ve laktat kullanan bakteriler (LUB)

(*Megasphaera elsdenii, Selenomonas ruminantium ve Propionibacterium*) mikrobiyal yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Direkvandi ve ark., 2021). LAB'lar doğal olarak fermente gıdalar, tahıllar, meyveler, hayvan sindirim sistemi veya silaj gibi birçok farklı habitatta bulunur ve şekerleri veya karbonhidratları laktik aside fermente ederler. Sığırların sindirim sisteminde rumende lokalize olan LAB'lar (Bureenok ve ark., 2011; Cobos ve ark., 2011), rumen mikroorganizmaları ile etkileşime girerek mikrobiyal aktiviteyi arttırabilme, rumen yıkılabilirliğini geliştirebilme, ayrıca ruminal metan üretimini de azaltma potansiyeline sahiptirler (Weinberg, 2003). Metabolizmaları yolu ile laktik asit üreterek rumen probiyotiği görevi yapan LAB'lardan birisi de *Lactobacillus plantarumdur*.

L. plantarum kültürlerinin *in vitro* rumen inokulasyonunun propiyonik asit üretimini arttırırken asetik asit üretimini azaltarak metan birikimini azaltabileceği bildirilmiştir (Astuti ve ark., 2018). *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya katkı maddeleri ise hücre duvarlarındaki B vitaminleri (Callaway ve Martin 1997), amino asitler (Chaucheyras ve ark., 1996) ve malik asit (Dawson ve Girard 1997) gibi besin maddeleri yoluyla rumen mikroorganizmalarının artan besin gereksinimlerinin sağlanmasına ve rumen pH'sında bir denge sağlanmasına katkı sağlarlar (Beauchemin ve ark. 2006). Diğer taraftan asetojenik bakterilerin gelişimine ve H_2 değerlendirme potansiyellerinin artmasına da katkı sağlarlar. Maya ürünlerinin özellikle H_2 değerlendirme potansiyelini arttırarak CH_4 üretimini azalttığı bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 2017; Adegbeye ve ark., 2019). Mikrobiyal yem katkı maddelerinin *in vitro* rumen probiyotiği potansiyeli üzerinde özellikle kullanılan inokulant yoğunluğu ve inkubasyon sürelerinin önemli etkileri olduğu da görülmektedir (Astuti ve ark., 2018; Doyle ve ark., 2018). Bu nedenle, mevcut araştırmada kırmızı yoncadan izole edilen *L. plantarum RC1.4'ün* farklı dozlarının tek başına veya *S. cerevisea* ile kombine edilerek *in vitro* rumen sıvısı inokulantı olarak kaba yem ağırlıklı rasyonlarda kullanılmasının rumen fermantasyon parametreleri ile mikrobiyel protein sentez etkinlikleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Rumen Ekosistemi ve Sindirim Fizyolojisi

Ruminantların mide-bağırsak sistemi, konakçı hayvanın (ruminant) genel sağlığı ve sindirim fizyolojisine doğrudan veya dolaylı olarak etki eden çok çeşitli mikrobiyal türlere ev sahipliği yapmaktadır (Stover ve ark., 2016). Ana fermentasyon odası olarak rumen, yemlerin mikroorganizmalar tarafından parçalanması, fermantasyonu ve başka ürünlere dönüştürülmesinin gerçekleştirildiği karmaşık ve dinamik bir biyolojik sistemdir (McSweeney ve Mackie, 2012; Abrao ve ark., 2014). Bu sistem, mikroorganizmalar için anaerobik bir ortam; 38 ila 41 °C arasında sabit bir sıcaklık ve 5.5 ila 6.9 aralığında potansiyel hidrojen (pH) sağlar (Dehority, 2003). Rumen mikroorganizmaları fermantasyon etkinlikleri bakımından bakteriler, arkealer (metanojenler) ve eucarya (protozoa ve mantarlar) olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılırlar.

Rumen bakterilerinin 200'den fazla türü vardır ve bunların popülasyon aralığı gram başına 10^{10}-10^{11}'dir. Rumendeki anaerobik mantarların popülasyon aralığı 10^{3}-10^{6}/g; rumen metanojenleri 10^{7}-10^{9}/g ; bakteriyofaj ve siliat protozoalar ise sırası ile 10^{7}-10^{9}/g ve 10^{4}- 10^{6}/g'dır (Wanapat, 2000; Kumar ve ark., 2009; Choudhury ve ark., 2015).

Yem parçacıklarıyla ilişkili bakterilerin toplam mikrobiyal popülasyonun yaklaşık %50 ila %75'ini oluşturması bakterilerin bitki lifi yıkımlanmasında en aktif popülasyon olduğunu göstermektedir (Minato ve ark., 1966). Anaerobik mantarlar, yem parçacıklarının lignoselülolitik bileşenlerini bozar ve rumen mikrobiyal biyokütlesinin en düşük oranını (sadece yaklaşık %20) oluştururlar (Rezaeian ve ark., 2004). Rumen protozoaları, rumen pH'sını düşüren asitlerin üretimini yavaşlatarak (Vibhute ve ark., 2011), rumen fermantasyonunu iyileştirir ve lif sindirimi ile fermantasyon profilinin değişiminde önemli bir rol oynar. Mikrobiyal enzimler, fermantasyonla yemin bileşimini önemli ölçüde değiştirir. Fermantasyon, ruminantın kendi enzimleri tarafından değil, rumendeki simbiyotik mikroorganizmalar tarafından enzimatik olarak yapılır. Bu olgu, geviş getiren hayvanlara doğada en çok bulunan, diğer memeliler ve insanların sindiremediği veya az sindirebildiği selüloz, hemiselüloz, ve pektin gibi besinlerden yararlanma avantajı sağlar (Öztürk, 2007). Ruminal fermantasyon sürecinde yağ, selüloz,

hemiselüloz, pektin, nişasta ve çözünür şekerler, mikrobiyal yıkılım işlemleri ile mikoorganizmalar tarafından UYA'lara dönüştürülür. Sonuç olarak yemin yapısal elemanları rumende UYA'lara, karbondioksite ve hidrojene dönüşür (Ellis ve ark., 2008). UYA'lar hayvanın enerji ihtiyacının yaklaşık %80'inin sağlanması için gereklidir. Rumende sentezlenen UYA'lar kabaca asetik asit (%45-70), propiyonik asit (%15-40), bütirik asit (%5-20) ve protein parçalanmasından elde edilen izo-asitlerden (%2-5) oluşur (Kamra ve ark., 2010; Demirtaş ve Pişkin, 2013). Ruminantlar için en kritik uçucu yağ asitleri asetik ve propiyonik asitlerdir. Asetik asit, hücreler tarafından doğrudan enerji kaynağı olarak kullanılır ve süt yağı oluşturmak üzere uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülür. Propiyonik asit karaciğerde glikoz sentezinde kullanılır. Bütirik asit ise temel olarak rumen epitelinin enerji ihtiyacını sağlar. Rumende formik asit, laktik asit, CO_2, etanol ve amonyak gibi başka ürünler de oluşmaktadır. Mikroorganizmalar yemle alınan ham proteini amino asitlere, peptitlere, az miktarda uçucu yağ asitlerine ve amonyağa dönüştürür (Stern ve ark., 1994). Mikroorganizmalar büyüme için protein yapıcı bileşiklerin sentezlenmesinde, nitrojen kaynağı olarak önemli miktarda amonyak kullanır. Amonyağın bir kısmı da rumenden emilir ve karaciğerde üreye dönüştürülür. Rumende bulunan mikroorganizma varlığı, yemlerdeki makro molekülleri parçalayan enzimleri sentezlerler (Cotta, 1988; Cobellis ve ark., 2016). Bu fermentatif süreçte, ruminant için temel enerji kaynağı olan kısa zincirli uçucu yağ asitleri ve protein kaynağı olan mikrobiyal ham protein üretilir. Bu şekilde rumen mikroorganizmalara hayatta kalma ve büyüme için uygun ortam sağlar (Czerkawski, 1986; Clark ve ark., 2005).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve NAD^+, $NADP^+$ ve FAD^+ indirgenerek tutulan hidrojen, bu kofaktörlerin yeniden oksidasyonu ile rumene salınır, böylece fermantasyonun sürekliliği sağlanır. Ancak rumendeki hidrojen yoğunluğu yüksek olduğunda NADH, NADPH ve FADH'nin yeniden oksidasyonunun baskılanması nedeniyle uçucu yağ asitlerinin sentezi etkilenir (McAllister ve Newbold, 2008). Metanojenler, metan üretiminde rumende bulunan hidrojen ve CO_2'yi kullanır. Metanogenesis, rumen fermantasyon sürecinin devamını sağlamak için rumendeki hidrojeni ortadan kaldırmanın en etkili yoludur (Tseten ve ark., 2022) ve gastrointestinal sistemdeki metanojenler anaerobik fermantasyonun bir yan ürünü olarak metan üretirler (Demirtaş ve Pişkin, 2013). Metanın tamamı geğirmeyle dışarı atılır. Yemin brüt enerjisinin yaklaşık %12'si bu yolla kaybolur (Johnson ve Johnson, 1995). Ancak metan

üretimi, rumenden hidrojenin uzaklaştırılması ve rumende mikrobiyel fermantasyonun devamlılığı bakımından gereklidir (Membrive, 2016). Çünkü; rumende yüksek hidrojen iyonu konsantrasyonunda, glikoliz reaksiyonu sırasında indirgenen NADH (nikotinamid adenin dinükleotid)'nin yeniden yükseltgenmesi gerçekleşmemekte; böylelikle metabolizma, ruminantlar için zararlı olabilecek istenilmeyen bir yola sürüklenerek etanol ve laktik asit üretimi yönüne kaymaktadır (Breves ve ark., 2000). Bu da subakut rumen asidozisine neden olabilmektedir. Rumendeki metan oluşumunu, hayvanın tükettiği rasyon, hayvanın türü, rumen içeriğinin geçiş hızı, rumen uçucu yağ asidi profili ve rumen sıvısı pH'sı doğrudan etkiler (Doreau ve ark., 2011).

2.2. Ruminantlarda Metan Üretimi ve Çevresel Etkileri

Rumen fermentasyonu sonucu açığa çıkan H_2 ve CO_2, metanojenik mikroorganizmalarca (bakteri, archaea, protozoon); $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4+2H_2O$, indirgenme reaksiyonuna uğratılarak metan gazı oluşumuna yönlendirilmektedir. Rumendeki hidrojenin tüketilmesi esasına dayanan bu mekanizmada, hidrojen tüketimi yoluyla metanojenler tarafından üretilen ve rumen ekosisteminin normal fonksiyonunu destekleyen ruminal metan, sera gazlarının önemli bir kaynağıdır. Diğer taraftan asetojenler tarafından üretilen indirgeyici asetojenez, asetat üretimi için hidrojeni bertaraf edebilen olası bir diğer alternatif havuzdur (Li ve ark., 2020).

Ruminant kaynaklı enterik metan, esas olarak hidrojenotrofik arkaeler (metanojenler) tarafından CO_2'nin hidrojen (H_2) tarafından indirgenmesi yoluyla üretilir. H_2'nin sürekli uzaklaştırılması, işkembenin normal fermentatif fonksiyonunun sürdürülmesi için çok önemlidir çünkü aşırı H_2 birikimi, NAD+'nın yenilenmesini önleyerek karbonhidrat fermantasyonunu engeller (Hungate, 1967; Wolin ve ark., 1997). Asetojenik bakteriler (asetojenler), enerji açısından daha tutumlu olan asetat üretimi için rumen ekosisteminden H_2'yi de uzaklaştıran başka bir mikroorganizma topluluğudur (Malik ve ark., 2015). Bu potansiyel bakımından rumende en aktif olan metanojenler *Methanobrevibacter*, en aktif olan asetojenler ise *Eubacteriaceae* familyasıdır (Li ve ark., 2020). Siliat protozoalar ise doğrudan metan üretmemekle birlikte özellikle hidrojenozomlarında bol miktarda H_2 üretebilmeleri, epi- veya endo-simbiyotik metanojenlerin rezervuar konağı olmaları ve metanojenleri oksijenin zararlı etkilerinden

korumaları sebebi ile metan üretiminde dolaylı rol oynarlar (Fenchel and Finlay, 2006; Belanche ve ark., 2014).

Bu metanojenik bakteriler kullandığı substrata bağlı olarak şu şekilde sınıflandırılabilir: 1. Hidrojenotropik: substrat olarak hidrojen ve format kullananlar, örn. *Metanobrevibacter ruminantium*, 2. Asetoklastik: Substrat olarak asetat kullananlar, örn. *Metanosaeta*, 3. Metilotropik: substrat olarak metil gruplarını kullananlar, örn. *Metanosarcina barkeri*. (Lakhani ve ark., 2017). Hidrojenotrofik metanogenez, CO_2'nin anaerobik ortamda bir hidrojen havuzu görevi gördüğü ve hidrojenin en etkili atıldığı ana yolaktır.

Termodinamik olarak daha uygun olan nitrat/sülfat indirgeme yolu da önemli bir hidrojen yolağı olarak kabul edilmektedir (Thauer ve ark., 2008). Ancak, rumendeki konsantrasyonu düşük olduğundan, H_2'nin çoğunluğunu metan oluşumuna yönlendiren sülfat/nitrat indirgeme yolunun elektron akış hızı daha sınırlıdır. Genel olarak, rumen fermantasyon süreci, H_2'nin mikroorganizmalar arasında türler arası transferi ve bunun hücre içi akışıyla rakip metabolik yollara aktarılmasıyla düzenlenir (Ungerfeld, 2020). Ayrıca, metanojenler ile protozoa, mantar ve bakterilerin fermantatif topluluğu arasındaki hücreler arası H_2 transferi, rumendeki H_2 seviyelerini düzenler. Çünkü eser miktarda H_2'nin hidrojenaz aktivitesini inhibe ettiği ve karbonhidrat oksidasyonunu olumsuz etkilediği rapor edilmiştir (McAllister ve Newbold, 2008; Thauer ve ark., 2008; Hook ve ark., 2010). Bu mekanizma, metan azaltıcı stratejilerin de temelini oluşturmaktadır.

Günümüzde, CO_2 ve CH_4 gibi sera gazlarının antropojenik emisyonundan kaynaklanan iklim değişikliği, dünyanın karşı karşıya olduğu önemli sorunlardandır (Jose ve ark., 2016). Hayvancılıktan kaynaklanan toplam küresel sera gazı emisyonlarının (hayvanlar, gübre, yem üretimi ve arazilerin öngörülen alanlara genişletilmesi) toplam insan kaynaklı emisyonların %14,5'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Gerber ve ark., 2013). Ruminantlardan kaynaklanan enterik CH_4, küresel antropojenik sera gazı emisyonlarının yaklaşık %6'sına katkıda bulunmaktadır (tüm hayvancılık emisyonlarının %40'ı; Gerber ve ark., 2013). Ergin bir sığırın rumeninde üretilen metan miktarının 300 litre/gün olduğu varsayıldığında, dünya çapında geviş getiren hayvanlar tarafından her yıl atmosfere yaklaşık 80 ila 115 milyon ton metan salınmaktadır (IPCC, 2001; Kaya ve ark., 2012). Metan gazının sera etkisi karbondioksitin yaklaşık 21 katı kadardır. Aynı şekilde

diazot monoksitin (N_2O) küresel ısınmaya olan etkisi karbondioksitten 310 kat daha fazladır (Köknaroğlu ve Akünal, 2010).

2.3 Enterik Metan Üretimini Azaltma Stratejileri

Özellikle son 10'lu yıllarda, ruminant kaynaklı enterik metan üretiminin azaltılmasına yönelik çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerin temel prensibi hayvansal performansı düşürmeyen, çevre ve insan sağlığını riske etmeyen ve uygulanabilir olanlarının yaygınlaştırılmasıdır (Tseten ve ark., 2022).

2.3.1. Yem bileşiminin değiştirilmesi

Yem bileşimini değiştirerek rasyon uygulamaları, enterik metan seviyelerini azaltmak için en basit ve ucuz yaklaşım olmaya devam etmektedir (Kebreab 2010; Haque, 2018). Tek başına bu strateji, beslenme müdahalesinin yöntemine veya niteliğine bağlı olarak ruminal metan emisyonlarını %70'e kadar azaltabilir (Mosler ve ark., 1998; Benchaar ve ark., 2001).

Artan kuru madde tüketimi, rumenden geçiş hızını arttırmakta ve yem maddelerinin rumende kalma süresini kısaltmaktadır. Dolayısıyla hem artan geçiş hızı hem de metanojenik bakterilerin rumende bulunan diğer mikroorganizmalar ile rekabet ediyor olmaları, kullanacakları substrat miktarını azaltmaktadır. Ayrıca geçiş hızının artması, rumende üretilen TUYA içerisindeki PA oranını arttırmakta ve üretilen H_2'nin propiyonat üretiminde kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Meral ve Biricik, 2013).

Yemleme sıklığının arttırılması, rumen fermantasyonunun normal işleyişi bakımından daha stabil bir ortam sağlamakta, AA/PA oranı yükselerek ruminal metan üretiminde artışa neden olmaktadır (Sutton ve ark., 1986; French ve Kennelly, 1990).

Ruminant rasyonlarına yağ ilavesi, rasyonun birim alandaki enerji yoğunluğunu arttırmak için uzun bir süredir kullanılan bir besleme stratejisidir (Hess ve ark., 2008). Ruminant rasyonlarında özellikle enerji kaynağı olarak kullanılan yağların aynı zamanda metan üretimini azalttığı belirtilmektedir (Dohme ve ark., 2000; McGinn ve ark., 2004).

Bu yağlar içerisinde özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin etkili olduğu bildirilmektedir (Giger-Reverdin ve ark., 2003; Martin ve ark., 2006).

Rasyonda lif oranının düşük olması ya da rasyonun kolay sindirilebilir liflerden oluşması metan üretimini azaltmaktadır. Lif sindiriminin hızlanması yem maddesinin rumende kalış süresini kısalttığından metan üretimini azaltıcı etki göstermektedir (Beauchemin ve ark., 2008). Bu anlamda en çok kabul gören yaklaşım, yemin türünü veya kalitesini değiştirmek veya yemdeki konsantre / kaba yem oranını ayarlamaktır. Daha yüksek fermente edilebilir karbonhidratlar, daha az sindirilmeyen lif (NDF) ve daha düşük karbonhidrat/azot içeren daha genç bitkiler, yüksek kaliteli yemi oluşturur, daha yüksek sindirilebilirlik ve geçiş hızı sağlar, bu da rumen fermantasyonunu propiyonata yönlendirebilir (Ball ve ark., 2001; Hills ve ark., 2015). Propiyonat aynı zamanda alternatif bir H_2 havuzu görevi de gördüğünden, propiyonat üretimi metanogenez için daha az H_2'nin mevcut olmasına yol açar (Beauchemin ve ark., 2009). Bununla birlikte pek çok araştırmacı, yüksek düzeydeki konsantrelerin, rumendeki laktik asit ve uçucu yağ asitleri (UYA'lar) konsantrasyonunu artırabileceğini, bunun da subakut ruminal asidoz (SARA) gibi sağlık bozukluklarına sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Owens ve ark., 1998; Ogata ve ark., 2019).

2.3.2. Organik yem katkı maddeleri

Genel olarak inorganik veya organik bileşikler veya doğrudan yedirilen probiyotiklerin yemlere katılması esasına dayanır. Bu katkı maddeleri ya metanojenleri spesifik olarak inhibe eder ya da metanojenez için substratın azalmasına yol açacak şekilde metabolik yolları değiştirir (Halmemies-Beauchet-Filleau ve ark., 2018; Haque, 2018).

İyonofor antibiyotikler (Odongo ve ark., 2007; Marques ve Cooke, 2021), metanogenezis inhibitörleri (Martinez- Fernandez ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018), organik asitler, esansiyel yağlar ve diğer bitki ekstraktları (Iqbal ve ark., 2008; Kobayashi, 2010; Toprak, 2015), makroalgler (Vijn ve ark., 2020; Roque ve ark., 2021), deniz yosunları (Maia ve ark., 2016; Min ve ark., 2021) chitosan, inulin ve maya ürünleri gibi prebiyotikler rumen bakteriyel popülasyonunu değiştirmek suretiyle metan üretimini azaltmaya katk sağlarlar (Seankamsorn ve ark., 2020; Tong ve ark., 2020).

2.3.3. Doğrudan yedirilen mikrobiyaller (DFM'ler)/probiyotikler

DFM'ler, arzu edilen rumen mikroflorasını teşvik eden ve hayvanlara yedirildiğinde faydalı etkiler sağlayan, canlı organizmaların tek veya karışık kültürü olarak tanımlanırlar (Krehbiel ve ark., 2003). Bu strateji, rumen hidrojeninin metabolik akışının metanogenez için kullanılmak yerine uçucu yağ asitleri üretimine yönlendirilmesini amaçlar. Çeşitli rumen bakterilerinin, propionogenezi, asetogenezi ve alternatif bir H_2 havuzu görevi görebilecek nitrat/nitrit veya sülfat indirgemesini teşvik ederek hidrojen temini için metanojenlerle rekabet ettiği düşünülmektedir(Ungerfeld, 2015).

Propiyonik asit bakterileri (PAB)

Propionibakteriler, toplam işkembe mikrobiyal popülasyonunun yaklaşık %4,3'ünü oluşturan doğal olarak işkembede yaşayan gram pozitif bakterilerdir. Propiyonatı süksinat ve akrilat yolu ile üretirler (Counotte ve ark., 1981; Stein ve ark., 2006). Propiyonat üretim aşamasında, piruvat propiyonata indirgenirken H_2 kullanılır. H_2, metan üretimi için sınırlayıcı bir substrat olduğundan, propiyonat oluşturan bakterilerin bu amaçla kullanılması metan üretimini azaltabilir (Jeyanathan ve ark., 2014). Metan üretiminin azaltılmasında kritik bir rol oynayabilecek çok sayıda PAB türü *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiştir. Bunlar arasında *Propionibacterium acidipropionici, P. freudenreichii, P. propionicus, P. jensenii, P. japonicas* ve *P. japonicas* yer alır (Vyas ve ark, 2014; Vyas ve ark., 2015).

Asetojenler

Metan üretimini baskılamakta kullanılan bir diğer probiyotik grubu ise indirgeyici asetogenesis etkisi bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler, özellikle barsaklarda bulunan ve burada biriken H_2 ve CO_2 indirgeyerek asetik asit üretmektedirler. Böylece metan üretimi için gerekli olan H^+ iyonlarını kullanan başka bir organizma varlığı ile metanojenler için gerekli substrat azaltılabilir. Ancak bu bakteriler rumende metanojenler ile yarışa girecek kadar fazla bulunmamaktadır ve şimdiye kadar yapılan çalışmalardan henüz olumlu ve istikrarlı sonuçlar alınamamıştır (Boadi ve ark., 2004). Yine de rumende bulunan asetojenlerin miktarını arttırmak ya da rasyona dışarıdan ilave etmek metanojenlerin

etkisinin azaltılmasında etkili olabilecek bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Joblin, 1999).

Homoasetojenler, asetat üretebilen 23 farklı bakteri türünden oluşan bir gruptur (Drake ve ark., 2008). Bu asetojenik bakteriler rumende 10^7 ila 10^8 hücre/g arasında bulunur ve şekerleri kullanarak heterotrofik olarak büyürler. Ayrıca Wood-Ljungdahl (WLP) yolu (Le Van ve ark., 1998; Ragsdale ve Pierce, 2008) bir hidrojenaz enzimi tarafından katalize edilen H_2 ve CO_2'yi (Fonty ve ark., 2007; Jeyanathan ve ark., 2014) kullanarak ototrofik olarak da gelişebilir. *Acetitomaculum ruminis, Eubacterium limosum, Blautia schinkii* ve *Blautiaproducta* gibi birçok homo-asetojen rumenden izole edilmiş ve alternatif H_2 havuzu potansiyelleri incelenmiştir. Bu *in vitro* çalışmalarda, asetojenezinin H_2'nin rumenden elimine edilmesine fayda sağlayabileceği ve metanojenezise alternatif bir yolak oluşturabileceği ileri sürmüştür (Morvan ve ark., 1996; Henderson ve ark., 2010).

Metan oksitleyici bakteriler (MOB)

Metan okside ediciler adı altında gruplandırılan bu bakteri türleri de *in vitro* ruminal metan üretimini kısıtlamaktadır. Metan okside edici bakteriler metanı kullanarak metabolizmadan dışarı salınımını engellerler ve böylece metan ile atılan enerji sınırlandırılmış olur. Rumende de kısıtlı sayıda metan okside edici bakteri bulunmaktadır (Moss ve ark., 2000). Valdez ve ark. (1996), domuz barsağından elde ettikleri bir bakteri suşunu *in vitro* rumen ortamında inokule ettiklerinde metan üretiminin baskılandığını bildirmişlerdir. Ancak metan okside edicilerin *in vivo* etkileri henüz tam olarak araştırılmamıştır (Moss ve ark., 2000). MOB, tek karbon ve enerji kaynağı olan metan kullanarak büyüyebilen bir bakteri sınıfıdır. Mikro-oksik veya aerobik ortamlarda her yerde bulunur (Richard ve Thomas, 1996; Pandey ve ark., 2014). Bu bakteriler, metanı metanole oksitleyen metanmonooksijenaz (MMO) adı verilen özel bir enzimi kullanır (Sazinsky ve Lippard, 2015). Metanol, metanol dehidrojenaz tarafından katalize edilen formaldehit'e oksitlenir, daha sonra biyokütle sentezi için serin veya ribuloz-5-monofosfat yoluna (RuMP) asimile edilir (Dalton, 1992; Kalyuzhnaya ve ark., 2015). Ruminantlarda artan sayıda metan oksidasyonu ve MOB zenginleştirme çalışmaları olmasına rağmen; MOB'un sığırlar için potansiyel bir probiyotik olma olasılığı uluslararası bilim camiasından pek ilgi görmemiştir (Finn ve ark., 2012).

Laktik asit üreten (LAB) ve laktik asit tüketen (LUB) bakteriler

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat fermentasyonunun ana son ürünü olarak laktik asit üreten gram pozitif, aside toleranslı, fakültatif anaerobik bakterilerdir (Stiles ve Holzapfel, 1997). Birincil olarak laktik asit üreten homofermenterleri ve ayrıca asetik asit, etanol ve CO_2 gibi çeşitli diğer fermantasyon son ürünlerini üreten heterofermenterleri içerirler (Doyle ve ark., 2019). Yem maddesinin ve dokusunun gelişmesine katkılarının yanı sıra, inhibe edici bileşiklerin üretimi yoluyla aerob bakterilerin aktivasyonunu önlemede önemli bir role sahip olan LAB'lar; hayvansal gıda üretimini iyileştirmek için probiyotik olarak ve büyüme hızlandırıcı olarak kullanılan antibiyotiklere alternatif olarak da kullanılmaktadır (Vieco-Saiz ve ark., 2019).

Genel anlamda DFM olarak kullanılan bakteriler laktik asit üreten, laktik asit kullanan ve diğer mikroorganizmalar olarak sınıflandırılmaktadır (Seo ve ark., 2010; Elghandour ve ark., 2015). Bunlardan en yaygın olanları *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Streptococcus, Bacillus* ve *Propionibacterium* cinsleridir. *Megasphaera elsdenii* ve *Prevotella bryantii* gibi mikroorganizmalar da rumen fermantasyonunu iyileştirmek ve stabilize etmek için DFM olarak kullanılabilmektedir.

Bakteriyel DFM'leri oluşturan mikroorganizmalardan, laktik asit üreten bakterilerin 1- rumende devamlı ve sabit miktarda laktik asit üretimi, 2- rumen mikroorganizmalarının laktik asitin varlığına adaptasyonu, 3- laktik asit kullanan bakterilerin stimülasyonu, 4- rumen pH sının stabilizasyonu yoluyla pozitif etkiyi sağladığı ileri sürülürken (Ghorbani ve ark., 2002; Beauchemin ve ark., 2003; Raeth-Knight ve ark., 2007); laktik asit kullanan bakterilerin de 1- laktik asidin uçucu yağ asitlerine dönüştürülmesiyle (*Megasphaera elsdenii*) 2- laktik asit üretiminden çok propiyonik asit üretimiyle (*Propionibacterium spp*.), 3-hayvanlarda yemden yaralanmanın iyileştirilmesiyle, 4- metan üretiminin düşürülmesiyle olumlu etkisini gösterdiği bildirilmektedir (Hutjens, 2007). Fungal DFM lerin olumlu etki şekillerine ait ileri sürülen teoriler ise, bu mikroorganizmaların faydalı etkilerini; 1- rumende oksijen düzeyini azaltarak, 2- organik asitler ve B vitamini gibi büyüme faktörleri sentezleyerek, 3- rumende mikroorganizma sayısını ve aktivitesini artırarak, 4- uçucu yağ asitleri ve ruminal proteinler gibi fermantasyon son ürünlerinde artış sağlayarak, 5- rumende sindirilebilirlik oranında artış sağlayarak gösterdikleri bildirilmiştir (Dutta ve ark., 2009).

DFM ‘ler içerisinde laktik asit kullanan bakterilerin (LUB) laktik asit yoğunluğunu düşürdüğü ve rumen pH sını koruduğu bildirilmiştir. *Megasphaera elsdenii* laktik asit kullanan bakterilerden olup, yüksek oranda fermente olabilen nişasta, glukoz, sellobiyoz gibi maddeleri yüksek oranda içeren diyetlerle yapılan beslemede rumende laktik asit birikimini ve hızlı pH düşüşünü engellediği, ayrıca laktasyonun ilk dönemindeki hayvanlarda akut asidosisin önlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Kung ve Hession, 1995). Gastrointestinal sistemde laktik asit varlığının ortamın pH’sını düşürmesi nedeniyle birçok patojen mikroorganizmanın çoğalmasının engellendiği de ileri sürülmektedir (Karademir ve Karademir, 2003). *Lactobacillus* ve *Streptococcus spp.*’nin buzağılarda ishal vakalarındaki etki mekanizması tam olarak açıklanamamakta, ancak bağırsak duvarına yapışarak koliform kolonizasyonunu engellediği, bazı metabolitler salgılayarak *E.coli* enterotoksinlerini etkisizleştirdiği belirtilmektedir (Magacz ve ark., 2023). Ayrıca *Lactobacillus* ve *Streptococcus*’un salgıladıkları organik asitler sayesinde bağırsak pH’sını düşürerek, bakterisid etkiye sahip olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve laktoperoksidaz tiyosiyanat sistemini uyardıkları; böylece nötr ve asidik ortamda gelişim gösteremeyen *E.coli*’ lerin üremesini engelleyerek bağırsakların inflamasyonunu engelledikleri belirtilmektedir (Magacz ve ark., 2023).

Lactobacillus plantarum spp.

Rumen probiyotiği olarak etki gösteren önemli *Lactobacillus* türlerinden birisi *Lactobacillus plantarum*'dur. Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada rumen sıvısına ya da rasyona *L. plantarum* katılarak rumen fermantasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. İzüddin ve ark. (2018), rumen sıvısına *L. plantarum* eklenmesinin, rumen fermantasyon kinetiğini ve OMS'yi artırarak rumen fermantasyon oranlarını arttırdığını bildirmiştir. Philippeau ve ark. (2017), yüksek verimli süt ineklerinde bir DFM olarak kullanılan laktik asit üreten (LAB) ve laktik asit kullanan (LUB) bakterilerin karışımlarının kullanıldığı bir çalışmada, rumende pH, UYA üretimi ve laktat kullanımını arttırdığını belirlemişlerdir (Philippeau ve ark., 2017). Beauchemin ve ark. (2003), yüksek karbonhidratlı diyetlerle beslenen besi sığırlarında, yeme ilave edilen *Enterococcus faecium’un*, ruminal fermantasyon üzerinde iyonoforlara benzer etki gösterdiğini, ruminal propiyonat konsantrasyonunu ve pH'yı artırırken rumen protein yıkımını azalttığını bildirmiştir. Benzer şekilde laktik asit bakterilerinin *in vitro* rumen sıvısı

inokulasyonlarının rumen mikroflorasını ve fermantasyonunu önemli derecede etkilediği belirlenmiştir (Weinberg ve ark., 2004; Gollop ve ark., 2005).

Lactobacillus plantarum 299v suşunun süte ilave edilerek buzağılara verildiği bir *in vivo* çalışmada ise, beslenme sonunda bütiratın rumen konsantrasyonunun ve mikrobiyal protein miktarının arttığı; pH, TUYA, asetat, propiyonat, asetat:propiyonat, laktat ve NH_3-N konsantrasyonlarında deneme grupları arasında fark görülmediği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2020). Marlida ve ark.'nın (2023) yapmış olduğu *in vitro* bir çalışmada fermente pirinç samanı bazlı rasyonlara eklenen *Lactobacillus plantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* kombinasyonunun *in vitro* kuru madde ve organik madde sindirimi üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra, ruminal NH_3 ve TUYA konsantrasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Kalitesiz rasyonlarla beslenen hayvanlarda mikrobiyal besin kaynaklarının yetersiz kalması sonucu mikrobiyal büyüme de yetersiz olmakta; bunun sonucunda CH_4 üretimi artmaktadır. Bu amaçla da rasyona probiyotik uygulamaları yapılmaktadır (Sarıpınar-Aksu ve Sulu, 2005).

*L. plantarum'*un enterik metan gazı üretimine etkileri ile ilgili yapılan kimi çalışmalarda, *L. plantarum* ilavesinin metan gazını azalttığı (Seo ve ark., 2010; O'Brien ve ark.,2013), kimi çalışmalarda arttırdığı (Astuti ve ark., 2018) ve kimilerinde ise metan gazı ve rumen fermantasyonu parametrelerinde istatistiki olarak herhangi bir farklılık oluşturmadığı (Ellis ve ark., 2016) bildirilmiştir.

Canlı Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)

Canlı maya, mikrobiyal floranın özellikle de fibrolitik bakterilerin etkinliğini iyileştirerek daha dengeli bir rumen ortamı sağlaması nedeni ile geviş getiren hayvanların beslenmesinde en yaygın kullanılan probiyotiklerden biridir. Maya hücreleri sindirim sistemi boyunca canlılığını koruyabilmektedirler. Rumen pH'sının stabilitesi yoluyla rumen metabolizmasını iyileştiren, selülolitik bakteri popülasyonunu arttıran, substrat için laktat üreten bakterilerle rekabet eden ve işkembede bulunan oksijeni bağlayarak anaerobiyozu destekleyen maya (S. cerevisiae), laktik asit bakterilerinin büyümesini

teşvik etmek için organik asitler ve vitaminler sağlar (Marden ve ark.,2008; Chiquette, 2009; Vibhute ve ark.,2011; Khan ve ark., 2016).

Birçok çalışmada (Chaucheyras ve ark., 1995; Newbold ve ark., 1998; Öztürk ve ark., 2015), rasyona maya ilavesinin propiyonik asit sentezini arttırdığı, rumen protozoon sayısını azalttığı böylelikle rumen metan üretimini azalttığı bildirilmektedir. Lila ve ark.'nın (2004) yaptığı bir başka araştırmada, rasyona maya ilavesi ile asetojen bakterilerin asetik asit sentezini hızlandırarak ortamda bulunan metabolik H_2 tüketimini arttırdığı, böylelikle metan üretiminin baskılandığını bildirilmiştir. Rasyona maya ilavesi potansiyel hidrojen yoğunluğunu da daha kararlı kılmaktadır. Böylece yüksek oranda konsantre yem tüketiminin sebep olabileceği sub-akut ruminal asidoz riski de azaltılabilmektedir (Öztürk ve Gür, 2021). Probiyotikler ayrıca, metan üretiminin azaltılmasında oldukça etkili yöntem olan rasyona nitrat eklenmesi esnasında açığa çıkan toksik nitritin detoksifikasyonunda da önemli rol oynar (Latham ve ark., 2018). Rasyona probiyotik maya eklenmesinin metan üretiminin azaltılmasına yönelik önemli bir etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (McGinn ve ark., 2004).

Chaucheyras ve ark. (1995), *Saccharomyces cerevisiae*'nin rumen bakterilerinden *Streptococcus bovis* ve *Megasphaera elsdenii* ile birlikte laktik asit metabolizması üzerine olan etkilerini araştırdıkları bir *in vitro* çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* 'nin büyüme faktörü sağlama yeteneğinde olduğunu ve bunun sonucu olarak selülolitik ve laktik asit kullanan bakterilerin (*Megasphaera elsdenii*) rumen popülasyonunu stimüle ettiğini bildirmişlerdir.

Ruminant beslemesinde *Saccharomyces cerevisiae* canlı maya kültürü ve *Aspergillus oryzae* fermantasyon ekstraktının rumen metabolizmasını iyileştirme amacıyla kullanıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre mayalar (*Saccharomyces Cerevisae ve Aspergillus oryzae*) metan üretimini baskılamaktadır (Boadi ve ark., 2004). Mayaların metan üretimini baskılamadaki etki mekanizmaları tam olarak ortaya konamamış olsa da rumen ortamındaki bakteri tiplerini etkilediği düşünülmektedir (McGinn ve ark., 2004). Carro ve ark. (1992), *in vitro* ortamda rumen içeriğine maya ilavesi ile metan üretiminin azaldığını ve bu etkinin, rumen protozoa sayısı ve asetat: propiyonat oranının azalması ile olabileceğini bildirmişlerdir. *İn vivo* yapılan bir başka çalışmada ise yeme canlı

Saccharomyces cerevisiae ilavesiyle toplam uçucu yağ asidi üretimi değişmezken A/P oranında belirgin bir azalma tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Yem materyali

Araştırmada substrat olarak, %60 kaba (yonca) ve %40 konsantre yem içeren toplam rasyon karışımı (TMR) kullanıldı. Yonca kuru otu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, toklu besi yemi ise piyasadan temin edildi.

3.1.2. *Lactobacillus plantarum* RC1.4 ve *Saccharomyces cerevisiae*

Araştırmada rumen sıvısı inokülantı olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum RC1.4* suşu, kırmızı yonca (*Trifolium pratense*) yapraklarından izole ve identifiye edildi (Aksu ve ark.,2021). Canlı maya (*Saccharomyces cerevisiae*) preparatı ise piyasadan temin edildi.

3.1.3. Rumen sıvısı

Hohenheim *in vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılan rumen sıvısı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan, yaklaşık 52±1.46 kg canlı ağırlıkta Akkaraman ırkı 3 adet rumen kanullü tokludan temin edildi. Toklular rumen sıvısı alımından bir ay önce başlayan, %60 yonca ve %40 toklu besi yemi karışımı ile beslendi. Toklulardan alınan rumen sıvıları (hayvan başına yaklaşık 700 ml), sıcaklığını ve bakteri yoğunluğunu sabit tutmak amacıyla, içerisinde 38-40°C sıcak su ve CO_2 bulunan termos yardımıyla hızlı bir şekilde *in vitro* testlerin yapılacağı laboratuvara getirildi.

3.1.4. Yapay tükürük

İn vitro inkübasyonda kullanılmak üzere hazırlanan yapay tükürük karışımı aşağıdaki çözeltiler ile hazırlandı.

Makro mineral çözeltisi: 2.85 g Na_2HPO_4, 3.1 g KH_2PO_4, 0.3 g $MgSO_4.7H_2O$ 500 ml ölçekli mezür içerisinde saf su ile çözdürülüp 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti pH'sı 6.8 olacak şekilde ayarlandı.

Mikro mineral çözeltisi: 1.32 g $CaCl_2.2H_2O$, 1 g $MnCl_2.4H_2O$, 0.1 g $CoCl_2.6H_2O$, 0.8 g $FeCl_3.6H_2O$ 10 ml ölçekli mezür içerisinde saf su ile çözdürülüp 10 ml'ye tamamlandı.

Tampon çözelti: 17.5 g $NaHCO_3$ ve 2 g $(NH_4)HCO_3$ 500 ml ölçekli mezür içerisinde saf su ile çözdürülüp 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti pH'sı 8.1 olacak şekilde ayarlandı.

Resazurin çözeltisi: 100 mg resazurin 100 ml ölçekli mezür içerisinde saf suda çözdürülüp 100 ml'ye tamamlandı.

Redüksiyon çözeltisi: 95 ml saf suya 4 ml 1 N NaOH ve 570 mg $Na_2S.7H_2O$ ilave edildi. Bu çözelti rumen sıvısı alınmadan önce hazırlanıp; hemen kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Substratın (TMR) besin madde kompozisyonlarının belirlenmesi

Araştırmada kullanılan yem materyalleri 1 mm elekten geçecek şekilde laboratuvar değirmeninde öğütülerek analizlere hazır hale getirildi. Deneme yemlerinin kuru madde, ham protein, ham kül ve eter ekstraktı analizleri AOAC'a (2005) göre, Asit Detergant Fibre (ADF) ve Neutral Detergant Fibre (NDF) analizleri ise Van Soest ve ark.'na (1991) göre yapıldı.

3.2.2. İnokulasyonların yoğunluklarının belirlenmesi

Araştırmada kullanılan 3 farklı yoğunluktaki *L. plantarum* ile canlı maya (*S. cerevisiae*) inokülasyon sıvıları, International Standart (Iso 6887-1) first edition 1999-02-15 yöntemine göre belirlendi.

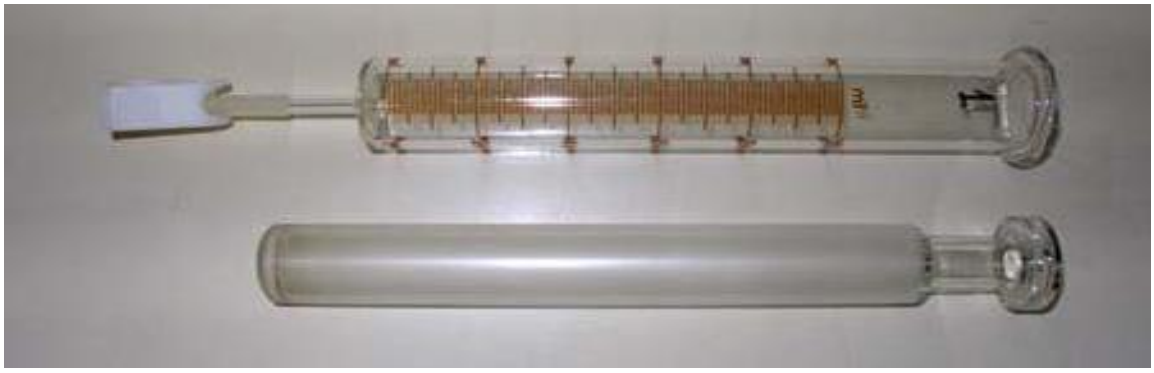
3.2.3. Deneme planı

Araştırmanın deneme grupları, substrata yoncadan izole edilen *Lactobacillus plantarum RC1.4* tek başına farklı dozlarda (10^6 cfu/200mg substrat, 10^8 cfu/200mg

substrat, 10^{10} cfu/200mg substrat) ve/veya canlı maya (*Saccharomyces cerevisiae*, 10^{7} cfu/200mg substrat) ile kombine edilerek;

1-K(kontrol, inokulantsız), 2-LP1 (10^{6} cfu/200mg substrat), 3-LP2 (10^{8} cfu/200mg substrat), 4-LP3 (10^{10} cfu/200mg substrat), 5- M (*Saccharomyces cerevisiae*, 10^{7} cfu/200mg substrat), 6-LP1M (10^{6} cfu/200mg substrat + *Saccharomyces cerevisiae*, 10^{7} cfu/200mg substrat), 7-LP2M (10^{8} cfu/200mg substrat + *Saccharomyces cerevisiae*, 10^{7} cfu/200mg substrat), 8-LP3M (10^{10} cfu/200mg substrat + *Saccharomyces cerevisiae*, 10^{7} cfu/200mg substrat) şeklinde oluşturuldu.

Her bir deneme grubu; 24. saat toplam gaz üretimi (TGÜ), metan (CH_4) ve *in vitro* organik madde sindirimi (IVOMS) ile rumen fermantasyon parametrelerinin (pH, amonyak, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve toplam uçucu yağ asitleri) belirlenebilmesi için 4 tekrarlı (8×4×4) ve mikrobiyal protein miktarı ve mikrobiyal protein sentezleme etkinliğinin belirlenebilmesi için ise 4 tekrarlı olacak şekilde (8×4) tasarlandı. Rumen fermantasyon parametreleri ayrıca ara inkübasyonlarda da (3, 6 ve 12) belirlendi. Oluşturulan deneme setinde 12 adet de kör örnekler için olmak üzere toplamda 172 adet *in vitro* gaz üretim şırıngası (Model: Fortuna, 100 ml:1, 40 mm capillary tube, boro, amber grad, Poulten & Graf GmbH Wertheim / Germany) kullanıldı.



Şekil 1. *İn vitro* gaz üretim şırıngası (Model: Fortuna, 100 ml:1, 40 mm capillary tube, boro, amber grad, Poulten & Graf GmbH Wertheim / Germany).

3.2.4. *In vitro* gaz üretim tekniğinin uygulanması

Rumen fermantasyon parametreleri (pH, amonyak, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit) ile 24. saat toplam gaz üretimi, metan gazı üretimi ve *in vitro* organik madde sindiriminin belirlenmesi:

Gaz üretim şırıngalarına 200 mg (0.2 g) substrat (TMR) tartılarak konuldu. Daha sonra, yukarıda belirtilen çözeltiler, aşağıda verilen miktar ve sıra ile Woulf şişesine aktarıldı (2000ml).

948 ml saf su, 474 ml makro mineral çözeltisi, 0.24 ml mikro mineral çözeltisi, 2.44 ml resazurin çözeltisi, 474 ml tampon çözeltisi, 95 ml redüksiyon çözeltisi.

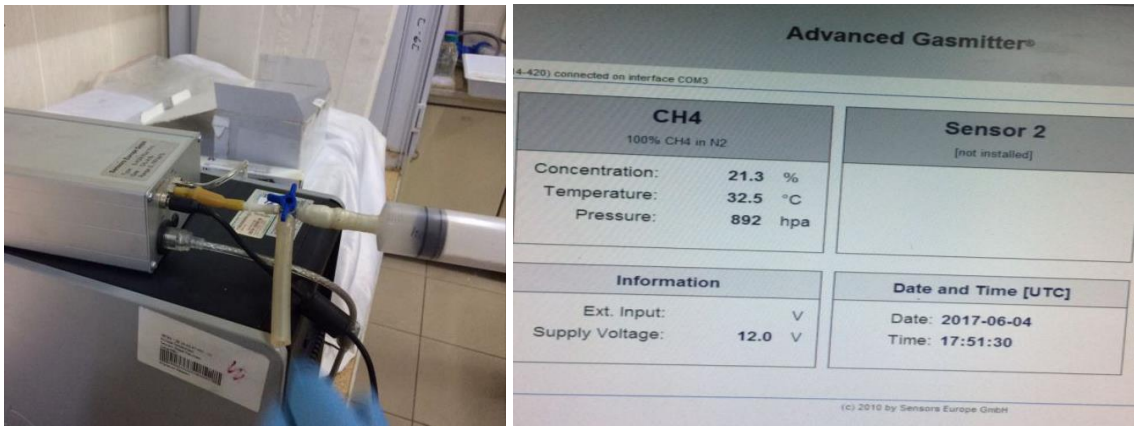
Bu karışım, rumen sıvısı alınmadan hemen önce hazırlanıp (Williams, 1981), CO_2 gazı altında 39 °C deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak rumen sıvısı konulana kadar bekletildi.

Laboratuvara getirilen rumen sıvısının kaba partiküllerinden ayrılması için hızlı bir şekilde 4 kat tülbent bezinden süzüldü. Daha önceden hazırlanan 2000 ml yapay tükürük karışımına 1000 ml süzülmüş rumen sıvısı ilave edildi (Williams, 1981). Bu karışım içerisine sürekli CO_2 gazı verilerek dispenser yardımıyla, gaz üretim şırıngalarına 30 ml'lik karışım (rumen sıvısı+yapay tükürük) aktarıldı. Karışımların aktarımı esnasında şırıngalardaki hortumlara inokülasyon gruplarında belirtilen yoğunluklarda 1'er ml'lik ilgili inokulantlar enjekte edilirken kontrol grubuna eş miktarda fizyolojik tuzlu su (FTS) enjeksiyonu yapıldı. Şırıngalardaki hava kabarcıkları ortamdan uzaklaştırıldı ve uç kısmındaki klips kapatılarak mevcut sıvı hacmi okunup kaydedildi ve *in vitro* gaz üretim şırıngaları Şekil 2'deki inkübatöre (Hohenheim ünitesi su banyosu) yerleştirilerek 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 39 ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon süresince şırıngalar belli aralıklarla karıştırıldı.



Şekil 2. Hohenheim ünitesi su banyosu.

Gaz üretim miktarı Menke ve ark. (79) tarafından bildirilen yönteme uyarlama yapılarak belirlendi. İnkübasyon 39 ºC de 24 saat sürdürüldü ve 24. saatteki gaz miktarları kaydedilerek, metan gazı ölçüm işlemleri için şırıngalarda biriken gaz üç yollu puar sistemi ile alındı. Alınan toplam gaz, bilgisayar destekli metan gazı ölçüm cihazına (Sensors Analysentechnik GmbH&Co. KG, Berlin, Germany) enjekte edilerek metan gazı oranı (%) okundu **(Şekil 3)**.



Şekil 3. Metan gazı ölçüm cihazı.

İnkübasyon sonunda şırıngalardaki rumen sıvısı süzülüp, bir beher içerisine aktarıldıktan sonra pH metre (Marka: Thermo, Model: Orion Star A11) ile pH değeri belirlendi. Aynı rumen sıvısı örnekleri, amonyak azotu (NH_3-N) ve uçucu yağ asidi (UYA) analizleri için 10 ml'lik falkon tüplere porsiyonlandı ve üzerine 1ml %25'lik

metafosforik asit ilave edilip analiz yapılıncaya kadar -18ºC de derin dondurucuda saklandı. NH_3-N analizi Markham distilasyon (Markham, 1942) yöntemi ile belirlendi.

Rumen UYA analizleri için ayrılan rumen sıvıları çözdürüldükten sonra santrifüj cihazında (Marka: Thermo, Model: Labofuge 200) 4500 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı 0.45 µm şırınga filtresinden süzülerek, viallere aktarıldı. Uçucu yağ asitleri (asetik asit, propionik asit ve bütirik asit) ve laktik asit konsantrasyonları yüksek-basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) cihazı kullanılarak Quiros ve ark. ' nın (2009) belirttiği metotla belirlendi. *HPLC çalışma koşulları; Model: Thermo Surveyor HPLC, Kolon: C18, 5 µm, 4 x 250 mm, Mobil faz: 0.4 M H_2SO_4, Akış hızı: 0.550 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 30 ºC, Dedektör: 210 nm, Enjeksiyon hacmi: 5 µl.*

Her örnek ve standartlar için okunan net gaz üretiminden ortalama kör değeri çıkarılarak 200 mg kuru maddeye karşılık gelen değer hesaplanmıştır. Rumen sıvısı aktivitesindeki farklılıkların düzeltilmesi standart yem maddelerinin (yonca) ölçümünden elde edilen standart faktörler kullanılarak yapıldı. 24 saat süren inkübasyon sonrası okunan değerlerden yararlanarak gaz üretim miktarları belirlendikten sonra aşağıdaki eşitlikler kullanılarak İVOMS hesaplandı (Menke ve Steinngas, 1988).

İVOMS (%) = 14.88+0.889GÜ+0.45HP+0.0651HK
GÜ = 24 saatlik fermantasyon sonucu açığa çıkan gaz miktarı (ml).
HP= Yemin ham protein içeriği (%, KM).
HK= Yemin ham kül içeriği (%, KM).

Mikrobiyal protein miktarı (MP) ve mikrobiyal protein sentezi etkinliklerinin (MPSE) belirlenmesi:

Yaklaşık 0,5 gram yem örneği 40 ml çözeltiyle (rumen sıvısı + yapay tükürük) 100 ml'lik cam şırıngalar içerisinde 24 saat 39 ˚C'de inkübasyona bırakıldı (Menke ve ark., 1979). İnkübasyon süresince rumen fermantasyon parametrelerinin belirlenmesi sürecindeki protokol uygulandı. İnkübasyonun 24. saatinde mikrobiyal protein ve mikrobiyal protein sentez etkinliği için inkübe edilen şırıngalar, fermantasyonu durdurmak için su banyosundan hızlı bir şekilde çıkartıldı ve +4ºC'de bekletildi. Daha sonra şırıngalardaki rumen içeriği cam tüplere aktarılıp üzerine 70 ml NDF çözeltisi ilave

edilerek bir saat kontrollü bir şekilde kaynamaya bırakıldı **(Şekil 4).** Kaynama sonrası sıvı, Gooch krozelerinden (por:1) süzülüp, 105°C'ye ayarlı etüvde 12 saat boyunca kurutuldu. Gerçek sindirilmiş kuru madde miktarı, taksimat faktörü, mikrobiyal protein üretimi ve sentezleme etkinliği, Blümmel ve ark.'nın (1997) bildirdiği metoda göre hesaplandı.

GSKM(mg) = İnkübe edilen KM(mg) – Kalan KM (mg)
GSD(%) =(GSKM/ İnkübe edilen KM) X 100
TF = GSKM/GÜ
MP (mg/g KM) = GSKM – (GÜ X 2,2 mg/ml),
MPSE = (GSKM – (GÜ X2.2 mg/ml))/GSKM.



Şekil 4. Kaynatma ünitesi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen veriler, IBM SPSS Statistics (v22) paket programında (George ve Mallery, 2016) Genel Doğrusal Model (GLM) prosedürleri kullanılarak homojen varyanslar için uygulanan çok değişkenli yöntemle analiz edildi. Ara inkübasyonlar için inokülasyon, zaman ve inokülasyon*zaman interaksiyonları

belirlendi. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı ($P<0.05$).

4. BULGULAR

Denemede kullanılan TMR'ın besin madde içerikleri **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan TMR'ın ham besin madde (% KM) içerikleri.

Substrat	KM	HK	HP	NDF	ADF	HY	HS
TMR	90.08	10.36	12.67	34.31	20.06	2.00	26.35

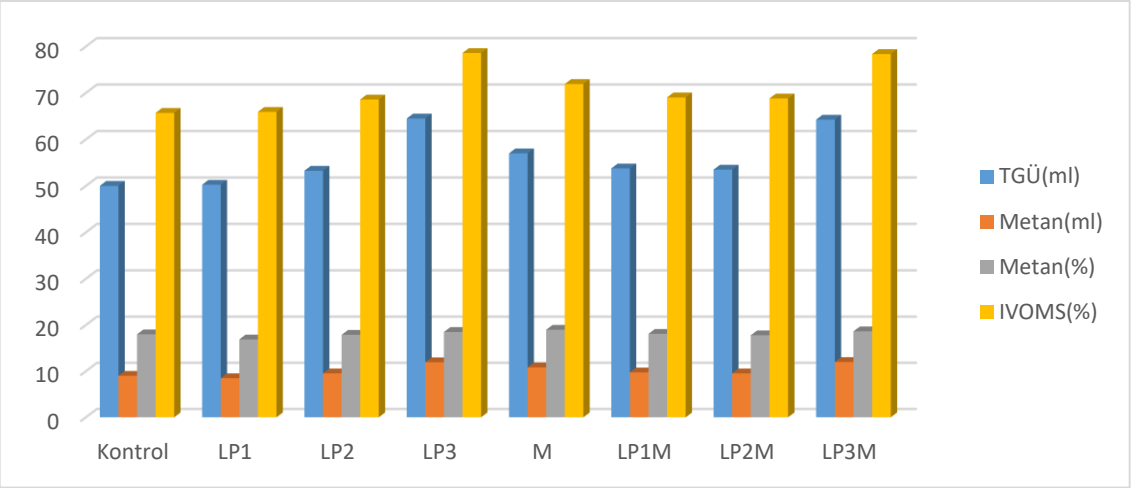
KM: kuru madde, HK: ham kül, HP: ham protein, NDF: nötral deterjan fiber, ADF: asit deterjan fiber, HY: ham yağ, HS: ham selüloz.

İnokülasyonların 24. saatteki *in vitro* gaz üretim parametreleri üzerine etkileri **Tablo 2**'de sunulmuştur.

Tablo 2. İnokülasyonların 24. saatteki *in vitro* gaz üretimi parametreleri üzerine etkileri.

Gruplar	**TGÜ(ml)**	**CH_4(ml)**	**CH_4(%)**	**IVOMS(% KM)**
K	50.00 ± 0.41^{d}	9.00 ± 0.07^{cd}	18.00 ± 0.04^{bc}	65.71 ± 0.36^{d}
LP1	50.25 ± 0.48^{d}	8.48 ± 0.08^{d}	16.88 ± 0.06^{d}	65.93 ± 0.42^{d}
LP2	53.25 ± 0.63^{c}	9.52 ± 0.11^{c}	17.88 ± 0.14^{c}	68.59 ± 0.56^{c}
LP3	64.50 ± 0.87^{a}	11.58 ± 0.14^{a}	17.95 ± 0.03^{c}	78.60 ± 0.77^{a}
M	57.00 ± 0.91^{b}	10.82 ± 0.18^{b}	18.98 ± 0.08^{a}	71.93 ± 0.81^{b}
LP1M	53.75 ± 0.85^{c}	9.73 ± 0.21^{c}	18.09 ± 0.16^{bc}	69.04 ± 0.76^{c}
LP2M	53.50 ± 1.56^{c}	9.53 ± 0.50^{c}	17.78 ± 0.56^{c}	68.82 ± 1.38^{c}
LP3M	64.25 ± 1.55^{a}	11.99 ± 0.32^{a}	18.65 ± 0.65^{ab}	78.38 ± 1.38^{a}
P	0.000	0.000	0.000	0.000

K: kontrol (inokülantsız), LP1: *L.plantarum* 10^6 cfu/200mg substrat, LP2: *L.plantarum* 10^8 cfu/200mg substrat, LP3*: L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat, M: *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP1M: *L.plantarum* 10^6 cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP2M: *L.plantarum* 10^8 cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP3M: *L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, TGÜ: gaz üretimi(ml), CH_4: metan, İVOMS: *in vitro* organik madde sindirimi, ^{a,b,c,d}: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel fark vardır.



Şekil 5. İnokülasyonların 24. saatteki *in vitro* gaz üretimi parametreleri üzerine etkileri.

24 saatlik gaz üretim parametreleri incelendiğinde **(Tablo 2) (Şekil 5)**, inokülasyonlara ait 24 saatlik TGÜ'nün L. plantarum dozu ve/veya maya kombinasyonundan önemli derecede etkilendiği ($P<0.001$) belirlendi. En yüksek TGÜ'nün sırası ile LP3 (64.50 ml) ve LP3M (64.25 ml) inokülasyonlarında; en düşük ise kontrol (50 ml) ve LP1 (50.25 ml) inokülasyonlarında olduğu belirlendi ($P<0.001$). Tek başına maya inokülasyonunun ise (57.0 ml) LP3 ve LP3M inokülasyonları hariç diğer inokülasyonlara kıyasla TGÜ miktarını önemli derecede arttırdığı belirlendi ($P<0.001$).

24 saatlik inkübasyonda, TGÜ içerisindeki metan gazı miktarı (ml) incelendiğinde; TGÜ'sü yüksek olan inokülasyonlarda (sırası ile LP3, LP3M ve M) metan gazı miktarlarının (sırasıyla 11.58, 11.99 ve 10.82 ml) da daha yüksek olduğu belirlenirken ($P<0.001$); en düşük metan gazı üretimi LP1 inokülasyonunda (8.48 ml) tespit edildi ($P<0.001$). Diğer inokülasyonlar arasında, metan gazı (ml) miktarı bakımından bir farklılık belirlenmedi. Metan gazı oranı bakımından en düşük değer LP1 inokülasyonunda (%16.88); en yüksek metan gazı oranı ise maya inokülasyonunda (%18.98) belirlendi ($P<0.001$).

İn vitro organik madde sindirimi üzerine inokülasyonların etkileri incelendiğinde, en yüksek IVOMS oranları LP3 (%78.60) ve LP3M (%78.38) inokülasyonlarında belirlenirken en düşük oran ise kontrol (%65.71) ve LP1 (%65.93) inokülasyonunda belirlendi ($P<0.001$). Tek başına maya inokülasyonuna ait IVOMS oranının (%71.93), LP3 (%78.60) ve LP3M (%78.38) inokülasyonları hariç diğer gruplara göre önemli

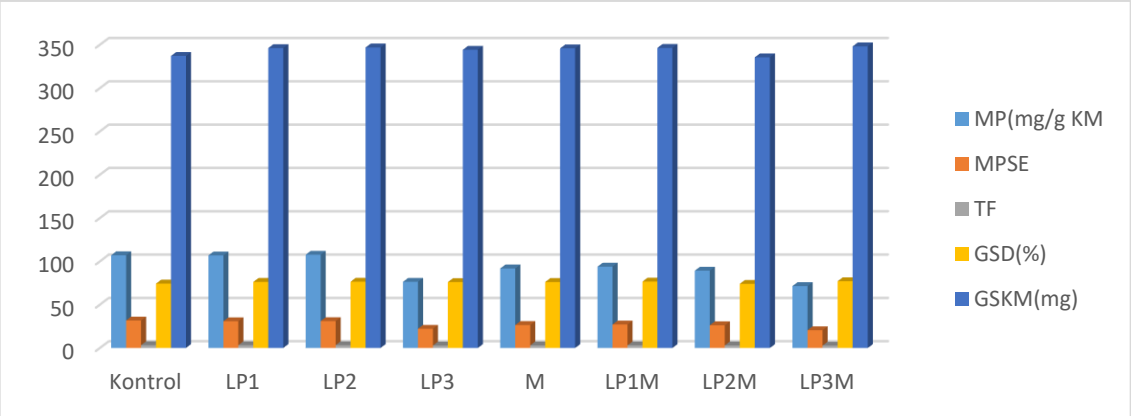
derecede yüksek olduğu tespit edildi (P<0.001). Genel olarak, 24 saatlik TGÜ ile İVOMS arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi.

İnokülasyonlara ait 24 saatlik mikrobiyal protein üretim parametreleri incelendiğinde **(Tablo 3) (Şekil 6)**; kontrol (107.01 mg g^{-1}KM), LP1 (106.84 mg g^{-1}KM) ve LP2 (107.65 mg g^{-1}KM) inokülasyonlarında, 1 g substrat KM'sinden üretilen mikrobiyal protein miktarının (mg), diğer inokülasyonlara kıyasla önemli derecede yüksek olduğu belirlendi (P<0.001). Üretilen mikrobiyal protein miktarının, LP3M (71.48 mg g^{-1}KM) ve LP3 (76.36 mg g^{-1}KM) inokülasyonlarında ise en düşük olduğu belirlendi (P<0.001).Tek başına maya veya *L. plantarum* ile kombinasyonlarında ise inokülasyonlar arasında mikrobiyal protein miktarı bakımından benzerlik belirlendi (LP3M hariç). Gaz üretimi esas alındığında, genel olarak mikrobiyal protein miktarı ile negatif bir ilişkisi olduğu belirlendi.

Tablo 3. İnokülasyonların 24. saatteki *in vitro* mikrobiyal protein üretim parametreleri üzerine etkileri.

Gruplar	MP, mg g^{-1}KM	GSD(%KM)	GSKM (mg)	MPSE(%)	TF
K	107.01±2.96^{a}	74.37±0.47	337.11±2.22	31.73±0.61^{a}	3.25±0.90^{a}
LP1	106.84±2.96^{a}	76.31±0.68	346.09±2.55	30.86±0.55^{a}	3.19±0.02^{a}
LP2	107.65±1.56^{a}	76.48±0.52	346.90±1.40	31.03±0.36^{a}	3.20±0.02^{a}
LP3	76.36±1.73^{c}	76.09±0.29	344.21±1.24	22.18±0.46^{c}	2.83±0.02^{c}
M	91.78±2.34^{b}	76.18±1.44	345.88±2.58	26.53±0.42^{b}	3.00±0.08^{b}
LP1M	93.89±1.96^{b}	76.62±0.32	346.34±1.33	27.11±0.48^{b}	3.02±0.02^{b}
LP2M	89.25±3.25^{b}	75.02±0.45	340.05±1.03	26.24±0.95^{b}	2.98±0.04^{b}
LP3M	71.48±3.13^{c}	77.06±0.27	348.13±1.41	20.53±0.86^{c}	2.77±0.03^{c}
P	0.000	0.130	0.200	0.000	0.000

K: kontrol (inokülantsız), LP1: *L.plantarum* 10^{6} cfu/200mg substrat, LP2: *L.plantarum* 10^{8} cfu/200mg substrat, LP3: *L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat, M: *S. cerevisiae* 10^{7} cfu/200mg substrat, LP1M: *L.plantarum* 10^{6} cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^{7} cfu/200mg substrat, LP2M: *L.plantarum* 10^{8} cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^{7} cfu/200mg substrat, LP3M: *L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^{7} cfu/200mg substrat, MP: mikrobiyal protein üretimi, GSD: gerçek sindirim derecesi, GSKM; gerçek sindirilebilir kuru madde, MPSE: mikrobiyal protein sentezleme etkinliği, TF: taksimat faktörü, ^{a,b,c,} aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel fark vardır.



Şekil 6. İnokülasyonların 24. saatteki *in vitro* mikrobiyal protein üretim parametreleri üzerine etkileri.

Mikrobiyal protein üretimi için kullanılan substrata ait *in vitro* gerçek sindirilme dereceleri (GSD) incelendiğinde **(Tablo 3)**, inokülasyonların kontrol grubuna kıyasla GSD'de rakamsal bir artış eğilimi gösterdiği; bu eğilimin LP3M inokülasyonunda (%77.06) kontrol grubuna kıyasla daha belirgin olduğu; aynı durumun gerçek sindirilebilen kuru madde miktarları (GSKM, mg) bakımından da söz konusu olduğu tespit edildi **(Tablo 3).**

Gaz üretimi için (1ml) yıkımlanan, mg cinsinden gerçek sindirilebilir kuru madde miktarları (TF, Taksimat Faktörü) incelendiğinde (Tablo 3), kontrol (3.25), LP1 (3.19) ve LP2 (3.20) inokülasyon gruplarında diğer inokulasyonlara kıyasla önemli derecede yüksek olduğu ($P<0.001$) belirlendi. LP3M (2.77) ve LP3 (2.83) inokülasyonlarının TF değerini önemli derecede düşürdüğü ($P<0.001$); M, LP1M ve LP2M inokülasyonlarına ait TF değerlerinin ise kendi aralarında benzer olduğu belirlendi.

İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde (3. 6. 12. ve 24. saat) rumen fermantasyon parametreleri [rumen sıvısı uçucu yağ asitleri (asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit), laktik asit, toplam uçucu yağ asitleri, rumen pH'sı ve amonyağa bağlı azot miktarı (NH_3-N)] üzerine etkileri **Tablo 4**'de sunulmuştur. İncelenen parametreler bakımından inokülasyon, zaman ve inokülasyon*zaman interaksiyonlarının istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.001$) belirlendi.

Tablo 4. İnokulasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen fermantasyon parametreleri üzerine etkileri.

Gruplar	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	P
			Asetik Asit (mmol/L)		
K	24.75±0.46^{De}	26.21±0,53^{Cd}	28.41±0.50^{Bd}	32.17±0.56^{Ad}	0.000
LP1	28.53±0.57^{Cd}	32.37±0.73^{Bc}	33.40±0.69^{Bc}	38.54±0.68^{Ac}	0.000
LP2	29.25±0.50^{Ccd}	33.51±0.79^{Bbc}	35.68±0.91^{Bbc}	39.42±0.85^{Ac}	0.000
LP3	30.47±0.55^{Ccd}	33.62±0.75^{Bbc}	35.83±1.16^{Bbc}	40.64±0.95^{Abc}	0.000
M	32.70±0.84^{Ca}	34.34±0.86^{BCabc}	36.79±1.31^{Bb}	42.76±0.98^{Aab}	0.000
LP1M	31.16±0.63^{Cabc}	33.66±0.84^{Cbc}	37.91±1.25^{Bab}	42.64±0.87^{Aab}	0.000
LP2M	31.62±0.86^{Cab}	35.51±1.00^{Bab}	38.48±0.94^{Bab}	43.54±1.07^{Aa}	0.000
LP3M	31.39±0.94^{Dab}	36.63±0.93^{Ca}	40.63±1.03^{Ba}	45.26±1.27^{Aa}	0.000
P	0.000	0.000	0.000	0.000	
			Propiyonik Asit (mmol/L)		
K	6.68±0.73^{Bab}	13.25±0.60^{Ab}	13.10±0.61^{Ab}	14.35±0.64^{Ab}	0.000
LP1	7.73±0.68^{Cab}	12.48±0.65^{Bb}	14.16±0.66^{Bab}	16.43±0.63^{Aa}	0.000
LP2	6.77±0.73^{Cab}	11.56±0.64^{Bbc}	12.54±0.67^{Bb}	16.42±0.75^{Aa}	0.000
LP3	6.59±0.64^{Cab}	11.67±0.61^{Bbc}	12.41±0.60^{Bb}	14.76±0.60^{Aab}	0.000
M	5.94±0.63^{Cb}	10.37±0.66^{Bc}	15.07±0.62^{Aa}	16.32±0.65^{Aab}	0.000
LP1M	6.13±0.46^{Cb}	11.93±0.62^{Bbc}	12.97±0.56^{Bb}	16.06±0.67^{Aab}	0.000
LP2M	6.22±0.44^{Cb}	15.62±0.77^{Aa}	12.72±0.62^{Bb}	16.09±0.60^{Aab}	0.000
LP3M	8.38±0.87^{Ca}	15.57±0.92^{Aa}	13.26±0.62^{Bab}	14.80±0.60^{Aab}	0.000
P	0.063	0.000	0.048	0.046	
			Asetik asit/Propiyonik Asit		
K	3.85±0.46^{Aabc}	1.99±0.19^{Be}	2.19±0.14^{Bd}	2.25±0.16^{Bd}	0.001
LP1	3.79±0.39^{Ac}	2.63±0.19^{Bbcd}	2.38±0.16^{Bcd}	2.35±0.18^{Bcd}	0.003
LP2	4.45±0.39^{Aabc}	2.94±0.22^{Bab}	2.86±0.18^{Babc}	2.41±0.21^{Bbcd}	0.000
LP3	4.74±0.38^{Aabc}	2.91±0.18^{Bab}	2.90±0.21^{Bab}	2.77±0.35^{Bab}	0.000
M	5.65±0.54^{Aa}	3.35±0.42^{Ba}	2.47±0.20^{Cbcd}	2.64±0.14^{BCbc}	0.000
LP1M	5.15±0.62^{Aab}	2.83±0.38^{Bbc}	2.95±0.21^{Bab}	2.66±0.36^{Bbc}	0.000
LP2M	5.20±0.54^{Aa}	2.28±0.26^{Bde}	3.06±0.23^{Ba}	2.71±0.28^{Bbc}	0.000
LP3M	3.82±0.33^{Aabc}	2.38±0.24^{Ccde}	3.08±0.29^{Ba}	3.08±0.46^{Ba}	0.004
P	0.019	0.000	0.003	0.001	

İnteraksiyon	
İnokülasyon	***
Zaman	***
İnokülasyon * Zaman	***

Tablo 4' ün devamı arka sayfadadır.

Tablo 4 (devamı). İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen fermantasyon parametreleri üzerine etkileri.

Gruplar	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	P
Laktik Asit (mmol/L)					
K	1.36±0.25^{A}	0.34±0.03^{Bde}	0.11±0.02^{B}	0.19±0.09^{Bbc}	0.000
LP1	1.66±0.15^{A}	0.54±0.07^{Bcd}	0.38±0.06^{B}	0.39±0.08^{Ba}	0.000
LP2	1.77±0.24^{A}	1.13±0.24^{Aa}	0.41±0.005^{B}	0.16±0.06^{Bbc}	0.000
LP3	1.83±0.24^{A}	1.09±0.25^{Aa}	0.10±0.02^{C}	0.21±0.09^{Cb}	0.000
M	1.56±0.17^{A}	0.55±0.14^{Bcd}	0.19±0.01^{C}	0.18±0.08^{Cbc}	0.000
LP1M	1.18±0.21^{A}	0.72±0.09^{Bbc}	0.25±0.06^{BC}	0.16±0.07^{Cc}	0.000
LP2M	1.36±0.24^{A}	0.83±0.08^{Bb}	0.35±0.02^{C}	0.14±0.04^{Cbc}	0.000
LP3M	1.23±0.09^{A}	0.21±0.09^{Be}	0.28±0.13^{B}	0.12±0.02^{Cbc}	0.000
P	0.239	0.000	0.135	0.001	
Bütirik asit (mmol/L)					
K	3.84±0.12^{Ce}	6.47±0.28^{A}	6.02±0.15^{Ac}	5.32±0.19^{Bd}	0.000
LP1	4.11±0.30^{Cde}	6.52±0.20^{A}	6.18±0.18^{Ac}	5.49±0.13^{Bcd}	0.000
LP2	4.56±0.20^{Bcd}	6.30±0.22^{A}	6.29±0.31^{Ac}	6.15±0.24^{Abc}	0.000
LP3	4.40±0.21^{Ccde}	6.65±0.23^{A}	6.07±0.18^{Bc}	6.11±0.13^{Bbc}	0.000
M	4.81±0.30^{Bbc}	6.59±0.25^{A}	6.30±0.21^{Ac}	6.40±0.23^{Aab}	0.001
LP1M	5.29±0.28^{Bab}	6.81±0.28^{A}	6.94±0.35^{Aab}	6.98±0.37^{Aa}	0.000
LP2M	5.02±0.26^{Babc}	6.82±0.23^{A}	6.62±0.28^{Abc}	6.91±0.39^{Aa}	0.000
LP3M	5.44±0.29^{Ba}	7.04±0.31^{A}	7.28±0.33^{Aa}	7.08±0.31^{Aa}	0.001
P	0.000	0.178	0.000	0.000	
Total Uçucu Yağ Asitleri (mmol/L)					
K	35.27±0.78^{Cc}	45.93±0.78^{Bc}	47.53±0.65^{Bd}	51.84±1.07^{Ac}	0.000
LP1	40,37±1.03^{Cb}	51.37±1.24^{Bb}	53.74±1.35^{Bc}	60.46±1.42^{Ab}	0.000
LP2	42.35±1.42^{Cb}	51.38±1.16^{Bb}	54.51±1.70^{Bbc}	61.99±1.53^{Ab}	0.000
LP3	43.29±1.13^{Cab}	51.94±1.07^{Bb}	54.31±1.55^{Bc}	61.51±1.78^{Ab}	0.000
M	45.00±1.32^{Dab}	51.30±1.20^{Cb}	58.16±1.60^{Bab}	65.48±1.53^{Aa}	0.000
LP1M	43.76±1.30^{Dab}	52.40±1.38^{Cb}	57.82±1.87^{Bab}	65.68±1.37^{Aa}	0.000
LP2M	44.22±1.48^{Cab}	57.95±1.65^{Ba}	57.82±1.19^{Bab}	66.54±1.48^{Aa}	0.000
LP3M	46.43±1.92^{Ca}	59.24±1.81^{Ba}	61.17±1.93^{Ba}	67.14±1.66^{Aa}	0.000
P	0.000	0.000	0.000	0.000	
İnteraksiyon					
İnokülasyon	***				
Zaman	***				
İnokülasyon * Zaman	***				

Tablo 4' ün devamı arka sayfadadır.

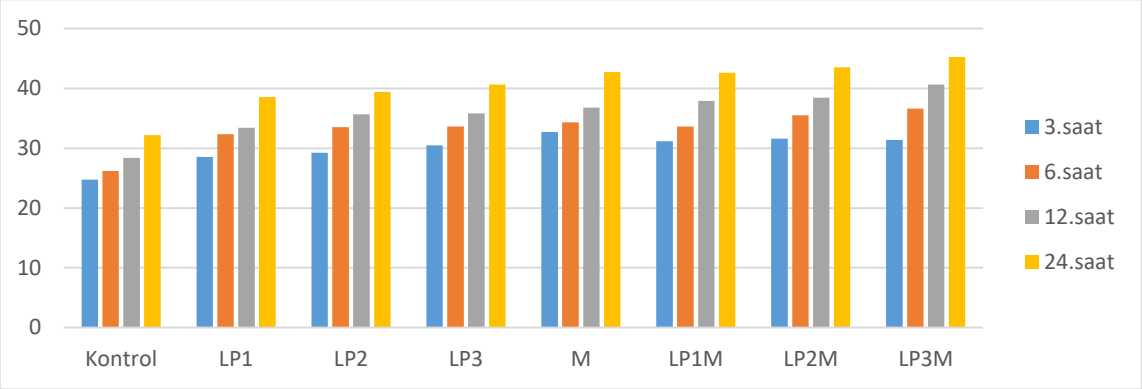
Tablo 4 (devamı). İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen fermantasyon parametreleri üzerine etkileri.

Gruplar	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	P
		pH			
K	6.54±0.01^{Cab}	6.68±0.01^{Aab}	6.63±0.01^{Bab}	6.68±0.01^{Acd}	0.000
LP1	6.51±0.02^{Cbc}	6.65±0.01^{Ab}	6.55±0.02^{Bbc}	6.68±0.01^{Acd}	0.000
LP2	6.48±0.01^{Dc}	6.65±0.01^{Ab}	6.53±0.01^{Cc}	6.64±0.01^{Bd}	0.000
LP3	6.43±0.01^{Cd}	6.52±0.01^{Bb}	6.51±0.03^{Bc}	6.59±0.03^{Ae}	0.000
M	6.56±0.01^{Ba}	6.60±0.01^{ABc}	6.55±0.01^{Bbc}	6.69±0.01^{Abc}	0.000
LP1M	6.54±0.03^{Bab}	6.68±0.02^{Aab}	6.69±0.04^{Aa}	6.75±0.01^{Aa}	0.000
LP2M	6.56±0.01^{Ca}	6.67±0.01^{Aab}	6.63±0.02^{Bab}	6.72±0.00^{Aab}	0.000
LP3M	6.56±0.01^{Ca}	6.70±0.01^{Aa}	6.63±0.03^{Bab}	6.70±0.01^{Abc}	0.000
P	0.000	0.000	0.000	0.000	
	3. saat	**6.saat**	**12.saat**	**24.saat**	**P**
		NH_3-N (mg/dl)			
K	25.25±0.84^{Bc}	27.90±0.78^{ABc}	28.38±1.00^{Ab}	29.03±1.18^{Ab}	0.050
LP1	26.15±0.74^{Bc}	29.48±0.95^{Abc}	30.50±1.68^{Aab}	32.68±1.44^{Aa}	0.000
LP2	27.65±0.41^{Babc}	29.43±1.18^{Bbc}	29.03±0,93^{Bb}	32.75±1.62^{Aa}	0.015
LP3	28.18±0.97^{Babc}	31.50±0.87^{Aab}	28.28±0.63^{Bb}	32.80±1.16^{Aa}	0.004
M	29.63±0.81^{Ba}	33.53±1.21^{Aa}	33.38±1.30^{Aa}	34.73±1.62^{Aa}	0.003
LP1M	28.33±0.52^{Cabc}	31.83±0.97^{Aab}	31.15±1.26^{ABab}	33.00±1.44^{Aa}	0.008
LP2M	26.10±0.77^{Bc}	31.78±1.19^{Aab}	32.88±1.70^{Aa}	33.63±1.42^{Aa}	0.001
LP3M	28.73±0.69^{Bab}	32.13±1.34^{Aab}	28.38±1.00^{Bb}	32.03±1.66^{Aa}	0.036
P	0.010	0.003	0.008	0.005	
İnteraksiyon					
İnokülasyon	***				
Zaman	***				
İnokülasyon*Zaman	***				

K: kontrol (inokülantsız), LP1: *L.plantarum* 10^6 cfu/200mg substrat, LP2: *L.plantarum* 10^8 cfu/200mg substrat, LP3: *L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat, M: *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP1M: *L.plantarum* 10^6 cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP2M: *L.plantarum* 10^8 cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, LP3M: *L.plantarum* 10^{10} cfu/200mg substrat + *S. cerevisiae* 10^7 cfu/200mg substrat, (Büyük koyu harfler grup içi değerlendirme, küçük harfler gruplar arası değerlendirmeyi yansıtmaktadır).

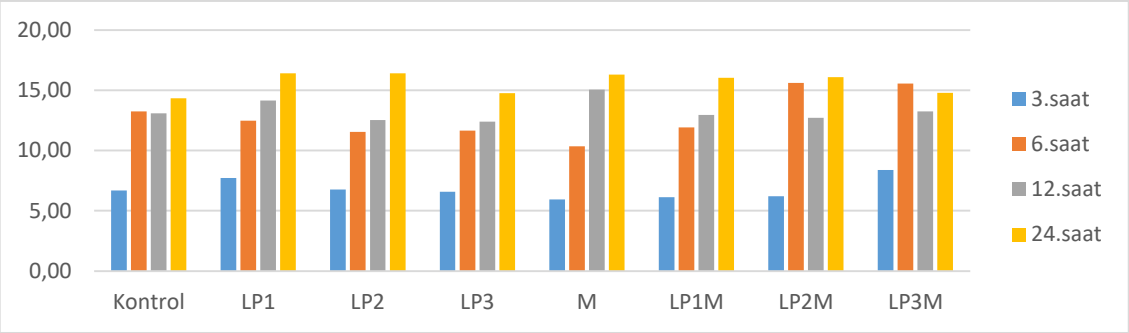
Tablo 4 incelendiğinde, tüm gruplarda zamana bağlı olarak AA miktarının önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001) **(Şekil 7)**. İnokülasyonların kontrol grubuna kıyasla tüm inkübasyon saatlerinde rumen sıvısı asetik asit miktarını önemli derecede arttırdığı (P<0.001); tek başına farklı yoğunluklarda *L. plantarum* inokülasyonlarında doza bağlı önemli bir değişiklik gözlenmediği; maya ve/veya maya + *L.plantarum* inokülasyonlarında rumen sıvısı AA miktarında bir artma eğilimi olduğu; bu eğilimin 24. saatte LP3M inokülasyonunda istatistiksel olarak farklılık oluşturduğu belirlendi (P<0.01). İnkübasyonun 24. saattinde, en düşük rumen sıvısı AA miktarı kontrol (32.17

mmol/l) grubunda, en yüksek ise LP3M (45.26mmol/l) inokülasyonunda tespit edildi (P<0.001).



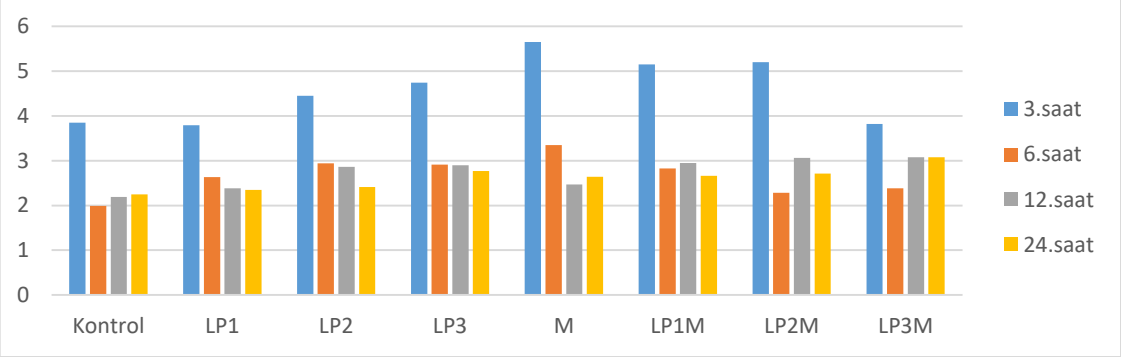
Şekil 7. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen asetik asit miktarı (mmol/L) üzerine etkileri.

İnokülasyonlarda PA miktarının, inkübasyon saatine bağlı olarak artış gösterdiği belirlendi (P<0.01) **(Şekil 8)**. 24. saat rumen sıvısı PA miktarının en düşük kontrol (14.35 mmol/l), en yüksek ise LP1 (16.43 mmol/l) ve LP2 (16.42 mmol/l) inokülasyonlarda olduğu belirlendi (P<0.001). Kontrol grubunda ilerleyen inkübasyon saatlerinde (6., 12., ve 24. saat) rumen sıvısı PA miktarları arasında önemli bir değişiklik gözlenmezken; inokülasyonların bu inkübasyon saatlerinde zamana bağlı daha belirgin bir dinamik fermantasyon gösterdiği; en nihayetinde 24. saatteki PA miktarının inokülasyonlarla önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001). Artan *L. plantarum* dozlarının PA miktarında ara inkübasyon saatlerinde istatistiksel bir farklılık oluşturmadığı gözlenirken; 24. saat PA miktarlarında ise LP1 ve LP2 gruplarında kontrol grubuna göre önemli derecelerde artış gözlendi (P<0.05). M ve maya+*L. plantarum* inokülasyonlarında ise bu denli belirgin olmamakla beraber 24. saat PA miktarında bir artış olduğu belirlendi (P<0.05).



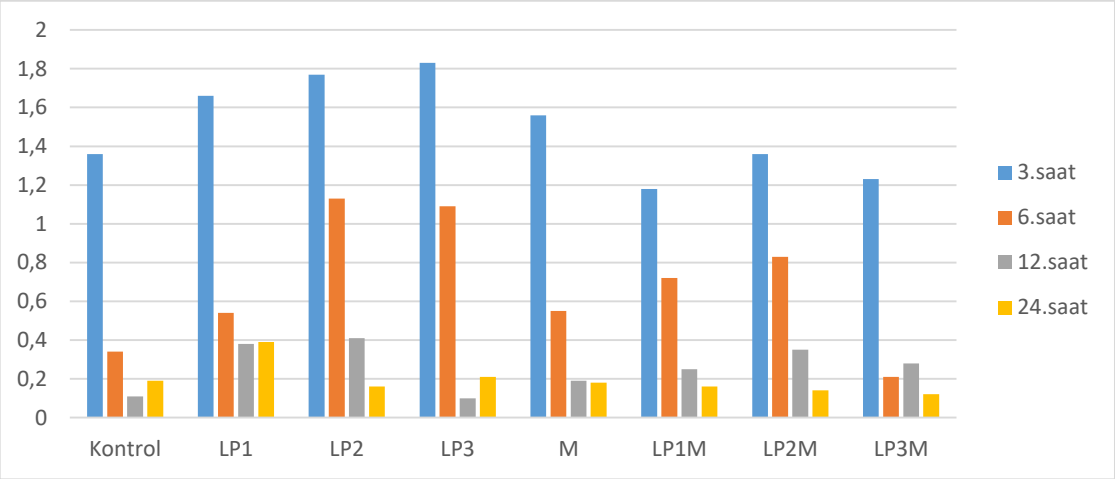
Şekil 8. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen propiyonik asit miktarı (mmol/L) üzerine etkileri.

Asetik asit / Propiyonik asit oranı incelendiğinde; tüm inokülasyonlarda, zamana bağlı olarak AA/PA oranında önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir (P<0.001) **(Şekil 9)**. İnkübasyon saatleri dikkate alındığında bu azalmanın esasen 6. saatte şekillendiği belirlendi (P<0.001). İnkübasyonun 24. saatinde tüm inokülasyonların, kontrole göre AA/PA oranını önemli derecede artırdığı, en yüksek rumen sıvısı AA/PA oranın LP3M inokülasyonunda (3.08), en düşük ise kontrolde (2.25) olduğu belirlendi (P≤0.001). Tek başına *L. plantarum* inokülasyonlarında, AA/PA oranı bakımından belirgin bir farklılık görülmemekle birlikte LP1 inokülasyonunun LP3 inokülasyonuna göre daha düşük AA/PA oranına sahip olduğu tespit edildi (P≤0.001). İnkübasyonun 3. ve 6. saatlerinde tek başına maya inokülasyonunun (M), AA/PA oranını diğer inokülasyonlara kıyasla önemli derecede arttırdığı (P<0.05); maya ile kombine edilen *L. plantarum* inokülasyonlarında ise bu artışın, inkübasyonun 12. saatinde LP2M (3.06) ve LP3M (3.08) inokülasyonlarında (P<0.05); inkübasyonun 24. saatinde ise LP3M (3.08) inokülasyonunda önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05).



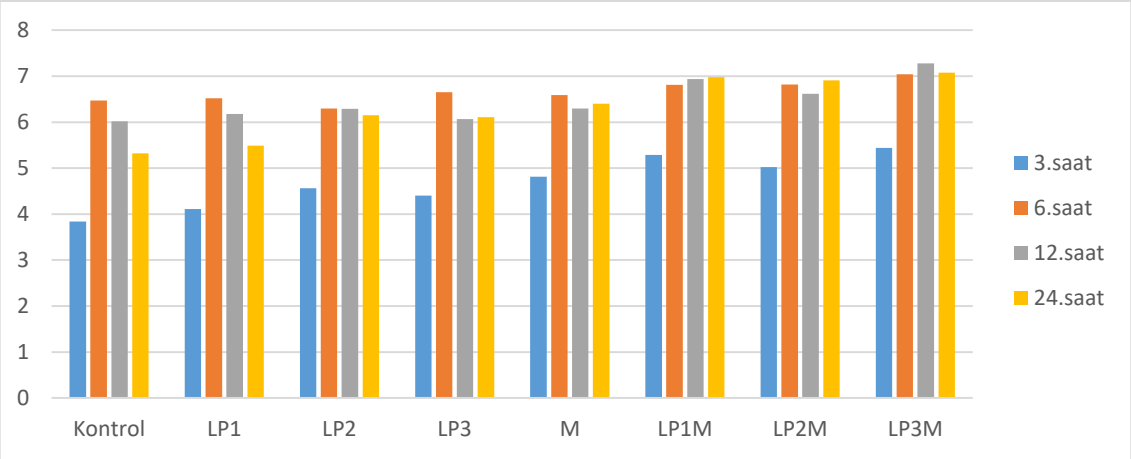
Şekil 9. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen AA/PA oranı üzerine etkileri.

LA miktarının bütün gruplarda zamana bağlı olarak önemli derecede azaldığı görülmüştür (P<0.001) **(Şekil 10)**. Tüm gruplarda en yüksek LA miktarı inkübasyonun 3.saatinde gözlemlenirken (P<0.001); 6. saatten itibaren LA miktarında gözlenen düşüşün LP1 inokülasyonunda daha istikrarlı olduğu, diğer inokülasyonlarda ise bu istikrara 12. saatten sonra ulaşılabildiği belirlenmiştir (P<0.001). İnokülasyonların 3. ve 12. saatte LA miktarlarını istatistiksel olarak etkilemediği; 6. saatte en yüksek LA miktarının sırasıyla LP2M (1.13mmol/l)) ve LP3M (1.09 mmol/l) inokülasyonlarında (P<0.001); 24. saatte ise LP1 (0.39 mmol/l) inokülasyonunda olduğu belirlendi (P≤0.001).



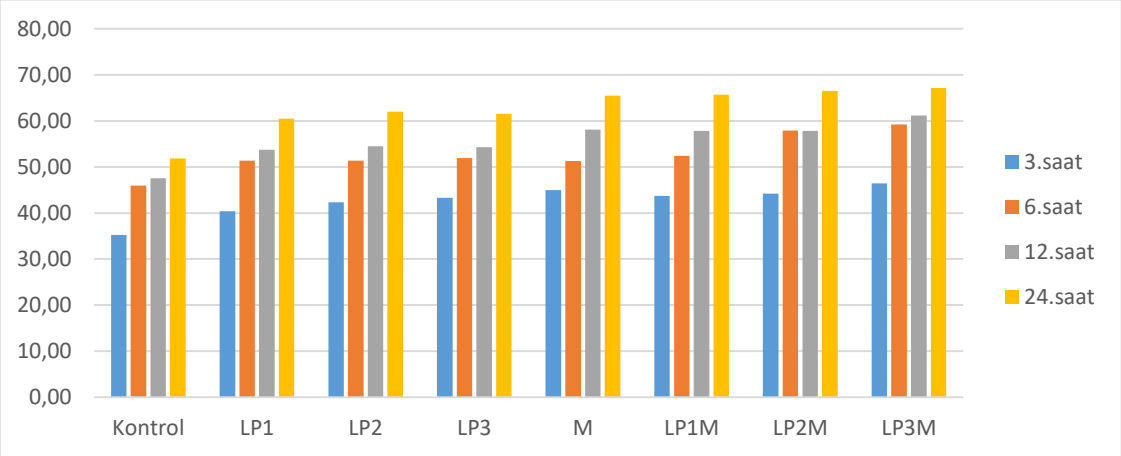
Şekil 10. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen laktik asit miktarı (mmol/L) üzerine etkileri.

İnkübasyon sürelerine bağlı olarak tüm inokülasyonlarda rumen sıvısı BA miktarlarının 3.saatten sonra önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001) **(Şekil 11)**. Ayrıca mayanın tek başına veya kombine inokülasyonlarında rumen sıvısı BA miktarlarının diğer inokülasyonlara kıyasla önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001). 24. saatte en yüksek BA miktarı LP3M (7.08 mmol/l), en düşük ise kontrolde (5.32 mmol/l) tespit edildi (P<0.001).



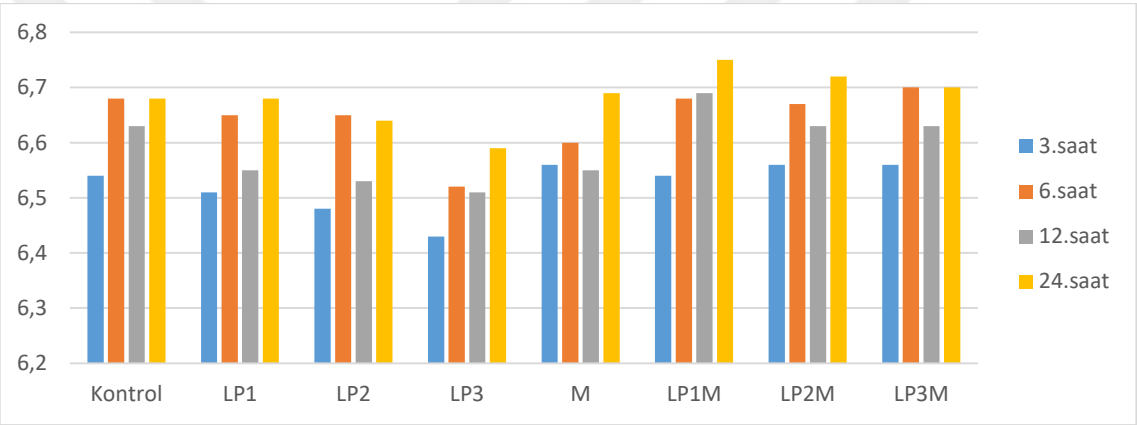
Şekil 11. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen bütirik asit miktarı (mmol/L) üzerine etkileri.

Fermantasyon süresine bağlı olarak tüm inokülasyonlarda TUYA miktarlarının önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001) **(Şekil 12)**. Tek başına *L. Plantarum* inokülasyonlarında M ve M+LP inokülasyonlarına kıyasla ara inkübasyon sürelerinde gözlenen farklılık 24. saatte daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır (P<0.001). İnkübasyonun 24. saatindeki TUYA miktarı, M ve/veya M+LP inokülasyonlarında diğer inokülasyonlara kıyasla önemli derecede yüksek olduğu belirlendi (P<0.001). En düşük TUYA miktarı kontrolde (51.84 mmol/l), en yüksek ise LP3M inokülasyonunda (67.14 mmol/l) belirlendi (P<0.001).



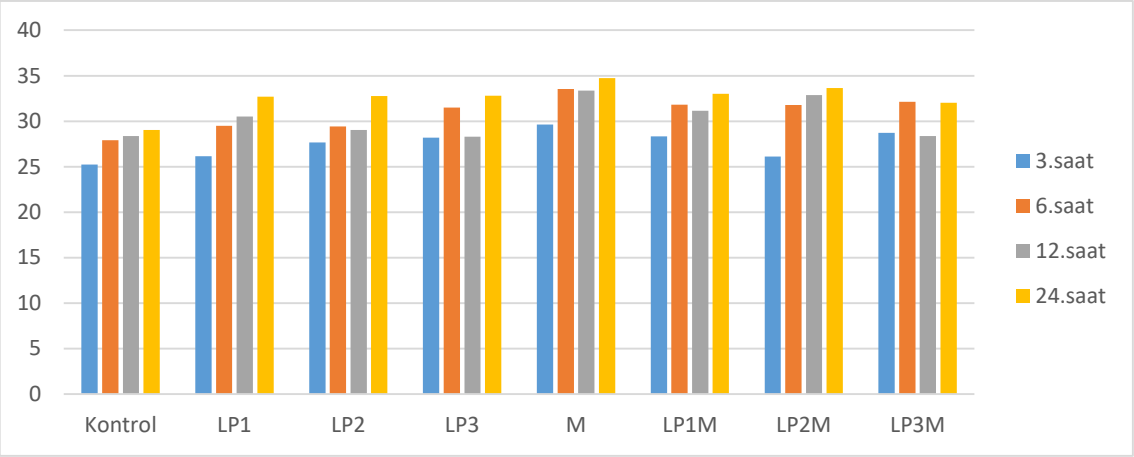
Şekil 12. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen total uçucu yağ asitleri (mmol/L) miktarı üzerine etkileri.

İnokülasyonlara ait rumen sıvısı pH değerlerinin 6.43- 6.75 aralığında olduğu belirlendi (P<0.001) **(Tablo 4)**, **(Şekil 13)**. İnkübasyon saatleri bakımından en düşük pH değeri, inkübasyonun 3. saatinde LP3 inokülasyonunda (6.43); en yüksek ise inkübasyonun 24. saatinde LP1M (6.75) inokülasyonunda belirlendi (P<0.001). Genel olarak tüm inkübasyon saatlerinde en düşük pH LP3 inokülasyonda gözlendi (P<0.001). Rumen sıvısı pH'sının ara inkübasyon saatlerinde genel olarak artma eğiliminde olduğu, 24. saatte ise diğer inkübasyon saatlerine kıyasla önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.001). Tek başına M veya M+LP inokülasyonlarının, özellikle inkübasyonun 3. saatinde belirgin olmak üzere diğer inkübasyon saatlerinde de rumen sıvısı pH'sını diğer inokülasyonlara kıyasla önemli derecede arttırdığı belirlendi (P<0.001).



Şekil 13. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen pH'sı üzerine etkileri.

Tüm inokülasyon gruplarında fermantasyon süresine bağlı olarak rumen sıvısı NH_3-N miktarının önemli derecede arttığı belirlendi (P<0.05) **(Şekil 14).** İnokülasyonların 24. saatte kontrol grubuna göre NH_3-N miktarını önemli derecede arttırdığı tespit edildi (P<0.01). Tüm inokülasyon gruplarında en yüksek NH_3-N değeri tek başına M inokülasyonunda (34.73 mmol/l) belirlendi. İnokülasyonun 6. saatinden itibaren M katkısının rumen sıvısı NH_3-N miktarında belirgin bir artış yaptığı gözlenmiştir (P<0.05). İnokülasyonlar bakımından 24. saat rumen sıvısı NH_3-N miktarında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 14. İnokülasyonların farklı inkübasyon saatlerinde rumen amonyak azotu (mmol/L) miktarı üzerine etkileri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kırmızı yoncadan (*Trifolium pratense*) izole edilen *Lactobacillus plantarum* RC1.4 'ün rumen aşılaması ile rumen fermantasyon parametreleri, *in vitro* rumen besin madde sindirilebilirliği, mikrobiyal protein üretimi ve rumen metan üretimine etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. *Lactobacillus plantarum*'un rumen probiyotiği olarak potansiyeli; fermantasyon sırasında rumen mikroorganizmalarının artan besin gereksinimlerinin sağlanması ve özellikle H_2- değerlendirme potansiyelini arttırmak yoluyla CH_4 üretimini azaltmasına katkı sunabilmesi amacı ile *Saccharomyces cerevisae* ile kombinasyonları olarak da incelenmiştir. Ayrıca *in vitro* gaz üretim sisteminin temel mantığı olarak 24. saatteki rumen fermantasyon parametrelerine ilave olarak ara fermantasyon süreçlerinde (3, 6, ve 12. saat), inokülasyonların rumen fermantasyon parametrelerini nasıl etkilediği de tespit edilmeye çalışılmıştır. Zira rumen sıvısına probiyotik inokülasyonu rumen fermantasyonda dalgalı bir seyire yol açar. Kullanılan substratın kolay fermente olabilir karbonhidrat içeriği, inoküle edilen bakterinin türü ve yoğunluğu ile rumen bakterilerinin çözünebilir fraksiyonlara eş zamanlı kolonizasyonu ve yeterliliği gibi unsurların, rumen fermantasyonundaki bu dalgalanmaya etki eden temel faktörler olduğu bildirilmektedir (Ellis ve ark., 2016; Astuti ve ark., 2018; İzüddin ve ark., 2018).

Toplam gaz üretiminin, *L. plantarum*'un 10^6 cfu/200mg substrat yoğunluğu dışındaki gerek tek başına gerekse maya ile kombine edilen inokülasyonlarında önemli derecede yüksek olması ($P<0.001$), *L. plantarum* inokülasyonlarının rumen fermantasyonunu iyileştirmesinden ve maya kombinasyonlarının da buna katkı sunmasından kaynaklanmıştır. Toplam gaz üretimindeki bu artış, kuru madde ve organik maddenin *in vitro* rumen sindirilebilirliğindeki artışı ile ilişkilidir (Astuti ve ark., 2018). TGÜ ile İVOMS arasında doğrusal bir ilişki vardır (Monteiro ve ark., 2020). Nitekim gruplara ait İVOMS arttıkça TGÜ'de artmıştır. TGÜ'deki bu artış, fermantasyonu domine eden bakteri populasyonuna (İzuddin ve ark., 2018), bakteri popülasyonunun substrat olarak kullandığı karbonhidrat yapısına (Jiao ve ark., 2017a) ve rumende oluşan uçucu yağ asitlerinin tampon çözeltiler ile girdiği reaksiyon sonrası oluşan indirekt gazlara (Özkan ve ark., 2020) bağlı olarak değişiklik gösterir.

Sığır rumeninden izole edilen *L. plantaruma* ait 14 farklı suşun, *in vitro* rumen fermantasyonuna etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Astuti ve ark., 2018), tüm *L. plantarum* suşlarının 24 saatlik TGÜ'yü kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Farklı yoğunluklarda (%0, 0.3, 0.6, 0.9 ve 1.2) *L. plantarum* RG14 kaynaklı postbiyotiklerin, rumen fermantasyonu ve mikrobiyal popülasyon üzerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada (İzüddin ve ark., 2018) ise, tüm yoğunlukların kontrol grubuna kıyasla 72. saat toplam gaz üretimi, rumen fermantasyon kinetiği ve İVOMS'de inokülasyon yoğunluğuna bağlı olarak önemli derecede doğrusal bir artış gösterdiği bildirilmiştir. Rumenden izole edilen *L. mucosae*'nın, kurutulmuş bira posasının *in vitro* rumen fermantasyon özellikleri, metan üretimi ve bakteriyel çeşitliliği üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada (Soriano ve ark., 2014), benzer şekilde LAB inokülasyonunun kontrolden önemli derecede daha yüksek gaz ürettiği tespit edilmiştir.

Sunulan bu çalışmanın bulgularının aksine, yüksek verimli süt ineklerinin diyetlerinde doğrudan yedirilen mikrobiyal katkı (DFM) olarak *Lactobacillus plantarum*'un *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin incelendiği çalışmanın *in vitro* aşamasında (Monteiro ve ark., 2020), *L. plantarum* ($1.35x10^9$ cfu g^{-1}) ve *S. cerevisiae* (10^7 cfu g^{-1})'nın farklı yoğunluklarda (%0.05, %0.10, %0.15 ve %0.20 KM substrat) inokülasyonlarının ilavesi ile 24 saatlik TGÜ'sünde önemli bir azalma tespit edilmiştir. İnokülasyonların, kontrol grubuna kıyasla CO_2 üretimini (mL/g KM) azaltma eğilimi gösterdiği ve bunun da TGÜ' de azalmaya sebep olduğu ifade edilmiştir (Monteiro ve ark., 2020). Gaz üretimindeki bu azalmanın aynı zamanda İVOMS'deki azalmadan dolayı gerçekleşmiş olabileceği; yine ruminal fermantasyondan elde edilen TGÜ ile İVOMS arasında doğrusal bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Menke ve Steingass, 1988). Sunulan çalışmada da inokülasyonlar bakımından İVOMS ile TGÜ miktarları arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Contreras-Govea ve ark. (2011), *L. plantarum* ilavesi ile *in vitro* rumen sindiriminde önemli bir artış olduğunu bildirmiştir. Artan sindirilebilirliğin, LAB ilavesinin rumende fibrolitik bakterileri uyarmasından kaynaklanmış olabileceği ifade edilmiştir. Bu sonuçlar, bir rumen probiyotiği olarak *L. plantarum* ilavesinin rumen fermantasyonu üzerindeki etkisinin bakteri suşuna, dozuna ve inkübe edilen substrata bağlı olduğunu göstermektedir (Jiao ve ark., 2017b). Aynı zamanda *S. cerevisiae*'nin fibrolitik bakterilerin büyümesini ve aktivitesini uyarma etkisi ile ilişkili olarak yemlerin

in vitro rumen sindirilebilirliğinin ve TGÜ'nün arttığı bildirilmiştir (Wanbui ve ark., 2010). Mevcut araştırmada da, maya kullanımının amaçlarından biri olan bu yaklaşım, önceki çalışma bulguları ile benzerlik göstermektedir (Mao ve ark., 2013; Elghandour ve ark., 2014). Nitekim tek başına maya (10^7cfu/ml) inokülasyonunun, genel olarak (LP3 ve LP3M inokülasyonları hariç) TGÜ miktarını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir ($P<0.001$). Bu artış da *L. plantarum* gibi canlı mayanın da rumen fermantasyonunu iyileştirici etkisine atfedilmiştir. Benzer çalışmalarda artan maya inokülasyonu ile TGÜ'nün arttığı belirtilmiştir. Diğer taraftan maya dozuna, substrat içeriğine ve *in vitro* rumen sıvısı hacmine bağlı olarak maya inokülasyonunun TGÜ'yü etkilemediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Hernandez ve ark., 2017; Direkvandi ve ark., 2021).

Rumen fermantasyonu sırasında açığa çıkan önemli gazlardan birisi metandır. Gaz üretiminde olduğu gibi metan üretimi de, substratın fermente olabilen karbonhidrat miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Gruplardaki metan gazı oranları değerlendirildiğinde (Tablo 1), özellikle tek başına *L. plantarum* inoküle edilen gruplarda TGÜ içerisindeki metan gazı oranının azalması daha önceki kimi çalışmalarda (O'Brien ve ark.,2013; Monteiro ve ark., 2020) ifade edilen *L. plantarum*'un rumen fermantasyonunu iyileştirici ve metan gazı üretimini azaltıcı etkisiyle benzerlik göstermektedir.

Lactobasillerin rumen kaynaklı metan üretimini baskılamasına yönelik birçok mekanizma ileri sürülmektedir (Jeyanathan ve ark., 2014; Doyle ve ark., 2019; Lan ve Yang, 2019). Bu mekanizmaların başlıcaları; (1) rumen metanojenlerini doğrudan inhibe etmek, (2) metanojenez için gerekli olan H_2 veya metil içeren bileşikleri üreten spesifik rumen bakterilerini inhibe etmek (Doyle ve ark., 2019) ve (3) UYA profilini propiyonik asit lehine dönüştürmek için LAB ve metabolitlerinin kullanımını arttırmak (İzüddin ve ark., 2018) şeklindedir. Mevcut araştırmada farklı inkübasyon sürelerindeki AA/PA oranları da incelendiğinde (Tablo 4), özelikle fermantasyonun 6. saatinden başlamak üzere fermantasyonun 24. saatine kadar *L. plantarum* inokülasyonlarının bu yönde bir fermantasyon gösterdikleri belirlenmiştir. Bu veriler önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Astuti ve ark., 2018; Direkvandi ve ark., 2021). Laktik asit bakterilerinin CH_4 üretiminin azaltılması üzerindeki bir diğer etkisi laktik asit kullanan bakterilerin (LUB) laktik asiti propiyonik asite çevirerek metan üretiminde kullanılan H^+ iyonu konsantrasyonunu azaltmasıdır (Seo ve ark., 2010).

Diğer taraftan, O'Brien ve ark. (2013), *Lactobacillus plantarum* TUA1490L süpernatantının *in vitro* rumen metanogenezi ve fermantasyonu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında; *L. plantarum* kültürlenmesi ile (supernatant) oluşan hidrojen peroksitin (H_2O_2) metan üreten bakteriler üzerinde anti-bakteriyel etki göstererek metan üretimini azalttığını bildirmişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarda, *L. plantarum* yoğunluğu arttıkça, TUYA, CO_2 ve CH_4 üretimi üzerindeki olumsuz etkilerin daha fazla olduğunu; rumen fermantasyonu üzerindeki kimi baskılayıcı etkilerden kaçınmak için *L. plantarum* yoğunluğunun bir sınırı olması gerektiği bildirilmiştir. Monteiro ve ark., (2020), *L. plantarum* inokülasyonunda dozun $1.35x10^9$ cfu/g substrat üzerine çıktığında rumen fermantasyonunun olumsuz etkilendiğini bildirmiştir. Astuti ve ark. (2018) kaba yem ağırlıklı bir substrata (%70 *P. Purpureum*+%30 konsantre) 10^9cfu/ml^{-1} yoğunluğunda *L. plantarum* inokülasyonlarının, kimi suşlarda 24. saat CH_4 üretimini önemli derecede arttırdığını belirtmiştir. Diğer taraftan (Ellis ve ark., 2016), dört farklı dozda *L. plantarum* için *in vitro* ruminal fermantasyon (72 saat) parametrelerini inceledikleri benzer bir çalışmada, CH_4 üretimi, TGÜ ve TUYA değerlerinin istatistiksel olarak değişmediğini belirlemiştir.

Patra (2012), *S.cerevisiae* kültürlerinin CH_4 üretimindeki artış veya azalma üzerindeki etkisinin mayanın türüne veya substratın kimyasal yapısına bağlı olduğunu bildirmiştir. Mevcut araştırmada maya ve *L. plantarum* + maya kombinasyonlarının kontrol grubuna göre metan üretimini arttırmış olması; mayanın ruminal anaerob bakterilerin büyümesini ve aktivitesini uyarma yeteneğine (Jouany, 2001; Polyorach ve ark., 2014) ve artan selülolitik bakterilerin bir sonucu olarak lif fraksiyonlarının yıkımlanabilirliğinin artmasına atfedilebilir (Elghandour ve ark., 2014). Zira lifli fraksiyonların parçalanması ile birlikte artan asetat miktarı **(Tablo 4)** metan üretimini tetiklemiş olabilir (Direkvandi ve ark., 2021). Bu veriler Elghandour ve ark.'nın (2016) bulguları ile uyum içerisindedir. Yapılan bazı çalışmalarda ise maya ilavesiyle bazı lif fraksiyonlarının yıkılımının etkilenmediğini dolayısı ile metan üretiminin de değişmediği bildirilmektedir (Guedes ve ark., 2008; Opsi ve ark., 2011). Diğer taraftan, büyüyen kuzularda mikrobiyal yem katkı maddelerinin büyüme performansı, mikrobiyal protein sentezi ve rumen mikrobiyal popülasyonu üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmada,

S.cerevisiae ile kombine edilen *L. fermantum* ve *L. plantarum* katkılarının metanojenik bakterileri önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir (Direkvandi ve ark., 2021). *S.cerevisiae'nın* antimetanojenik etki mekanizması ile ilgili bir diğer muhtemel mekanizma olarak, *S.cerevisiae'nın* metanojenler için H_2 kullanılabilirliğini azaltarak, bütirat veya propiyonat yolağına yönlendirdiği (Erasmus ve ark., 2005) veya asetojenleri metanojenik bakterilerle rekabet etmeye teşvik ederek, rumen CH_4 emisyonunu azalttığı ileri sürülmüştür (Mwenya ve ark., 2004; Hristov ve ark., 2013b; Elghandour ve ark., 2014).

Sunulan çalışmada 24 saatlik mikrobiyel protein (MP) üretim parametreleri incelendiğinde **(Tablo 2)**, özellikle tek başına LP1 ve LP2 inokülasyonlarının diğer inokülasyon gruplarından önemli derecede yüksek ve kontrol grubu ile benzer olduğu gözlendi ($P<0.001$). Maya ve/veya maya+*L. plantarum* kombinasyonlarında ise MP üretimi daha düşüktü ($P<0.001$). Bu durum TUYA ile MP üretimi arasındaki negatif ilişkiye bağlanabilir. Diğer taraftan TGÜ arttıkça MP üretimi azalmaktadır. Zira yemlerde fermente olabilen besin maddelerinin büyük bir bölümünün UYA ve gaz üretiminde kullanılması durumunda MP sentezinde kullanılacak kısım azalacağından, MP sentezi azalır (Özkan ve ark.,2020). Nitekim mevcut araştırmaya ait TGÜ **(Tablo 2)** ve TUYA **(Tablo 4)** miktarları incelendiğinde bu ilişki açıkça görülmektedir. Diğer taraftan, hem *L. plantarum* hem de *S. cerevisiae* rumen sıvısında bulunan kolay fermente olabilir karbonhidrat miktarı için diğer mikroorganizmalarla birlikte verilen paylaşım mücadelesinde MP üretimi için mikroorganizma başına düşen kolay fermente olabilir karbonhidrat miktarının azalmasına; böylelikle MP üretiminde azalmaya sebebiyet vermiş olabilir (Lu ve ark., 2019). Substratın kaba yem ağırlıklı olması bu sonuca olumsuz katkı sunmuş olabilir. Kolay fermente olabilir karbonhidrat yetersizliğinde ve rumen mikroorganizmalarının ihtiyacı üzerindeki azot kaynağı (maya) varlığında, rumende karbonhidrat ve protein sindirimi eş zamanlı gerçekleşmediğinden rumende amonyak üretimi artar (Nocek ve Russel, 1988; Rymer ve Givens, 2005). Nitekim inokulasyonlara ait amonyak miktarında **(Tablo 4)** maya ve/veya maya+*L. plantarum* kombinasyonları lehindeki artış da bu yorumu destekler niteliktedir.

GSKM veya GSD değerleri yemlerde bulunan fermente olabilecek besin madde miktarını ifade eder (Özkan ve ark.,2018). Substratın GSKM ve GSD'yi arttırması,

inokülasyonların rumen fermantasyonunu ve mikrobiyel sindirim faaliyetlerini iyileştirmesine bağlanabilir. İnokülasyonların GSKM ve GSD'lerinin kendi içlerinde benzer olmasına rağmen mikrobiyal protein üretimlerinde ortaya çıkan farklılık, inokülasyon sonrası şekillenen yeni bakteriyel popülasyona ve bu popülasyonun oluşturduğu fermantasyon profiline atfedilebilir. Aynı substrata rağmen inokülasyon tipi ve yoğunluğuna bağlı olarak gruplarda TGÜ ile TUYA miktarlarının farklı olması mikrobiyal popülasyonun ve dolayısı ile fermantasyon profilinin değişmiş olması şeklinde izah edilebilir (Ellis ve ark., 2016). Nitekim (Monteiro ve ark., 2020), rumene yapılacak inokülasyonlarda, inokülasyon yoğunluğunun rumen fermantasyon profilinin şekillenmesinde etkili olduğunu ve daha kararlı fermantasyon profili için inokülasyon yoğunluğun üst sınırın doğru belirlenmesi gerektiğini bildirmiştir.

Gaz üretimi için (1 ml) yıkımlanan gerçek sindirilir kuru madde miktarları (mg), taksimat faktörü (TF) olarak tanımlanır. Yemlerin TF değeri, MPSE' yi belirleyen en önemli unsurdur ve TF değeri yüksek olan yemlerin MPSE değerleri de yüksek olur (Blümmel ve Lebzien, 2001). Sunulan çalışmada da, MP ve MPSE değerleri yüksek olan inokülasyon gruplarının (LP1 ve LP2), TF değerleri de diğer inokülasyon gruplarına kıyasla önemli derecede yüksek ve kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($P<0.001$). Ruminant beslemede kullanılan bazı kaba ve kesif yemlerin *in vitro* gaz üretimleri, metan üretimleri, gerçek sindirim dereceleri (GSD) ve mikrobiyal protein (MP) üretimlerinin kıyas edildiği bir araştırmada (Özkan ve ark., 2018), benzer şekilde TF değeri yüksek olan yemlerin MPSE değerlerinin de yüksek olduğu belirlenmiştir.

Mikrobiyal inokülasyonların rumen fermantasyon profiline etkilerinin ortaya konulmasında metagenomik testler önemli yol göstericidir. İnoküle edilen bakteri türü ve yoğunluğunun rumen bakteri popülasyonunu nasıl etkilediği ve fermantasyon süresince bakteri popülasyonundaki değişimle birlikte fermantasyon parametrelerinin nasıl etkilendiği böylelikle daha tatminkar olarak belirlenebilmektedir.

Ancak mevcut araştırmada metagenomik analizler yapılamadığından inokülasyonların etkileri, fermantasyon parametreleri ile yorumlanabilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak daha doğru yorumlama yapabilmek için *in vitro* sistemde ara inkübasyonlarda da (3., 6., 12. saatler) rumen fermantasyon parametreleri (pH, amonyak,

laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit, toplam uçucu yağ asitleri) incelenmiştir **(Tablo 4)**.

İncelenen rumen fermantasyon parametrelerinin tümünde, inokülasyon, zaman ve inokülasyon*zaman interaksiyonlarının önemli olduğu görülmektedir ($P<0.001$). Kullanılan substratın %60 yonca kuru otu içermesi de göz önüne alındığında, normal rumen fermantasyon dinamiği bakımından zamana bağlı olarak AA miktarının molar olarak yüksek ve artış gösteriyor olması diğer çalışma bulgularıyla uyum içerisindedir (Soriano ve ark., 2014; İzüddin ve ark., 2018).

Kontrol grubuna kıyasla inokulasyonların AA miktarını arttırmış olması, rumen fermantasyonu ve besin madde sindirimini iyileştirmiş olmasındandır (İzüddin ve ark., 2018). Genel olarak kendi içerisinde tek başına *L. plantarum* veya kombinasyonlarında artan yoğunluğa rağmen AA miktarında bir değişiklik olmaması, benzer yaklaşımla *Lactobacillus plantarum* RG14'un farklı yoğunluklarının *in vitro* rumen parametrelerine etkisinin incelendiği bir çalışmanın (İzuddin ve ark., 2018) bulguları ile uygunluk göstermektedir**.** Bu durum inokülasyonların belli bir yoğunluktan sonra rumeni düzenleme etkilerinin değişmediği ve/veya baskıladığı şeklindeki yorumlarla örtüşmektedir (Monteiro ve ark., 2020). Diğer taraftan, *L. plantarum*+maya kombinasyonlarındaki AA artışı, mayanın selülolitik bakterilerin aktivitesini uyararak potansiyel lif sindirimini arttırmış olmasına bağlanabilir (Elghandor ve ark., 2014; İzuddin ve ark., 2018).

LAB'ların LA üretimini arttırmasının yanında; laktik asit kullanan bakteri popülasyonunun (LUB) gelişimini stimule ederek PA üretiminin artmasına yol açması beklenir (Yoon ve Stern, 1995; Soriano ve ark., 2014). Mevcut araştırmada, inokülasyonlara ait propiyonik asit miktarlarında zamana bağlı bir tutarlılık olmamakla birlikte, bu beklenti 24. saatte özellikle LP1 (16.43 mmol/l) ve LP2 (16.42 mmol/l) inokülasyonlarında gerçekleşmiştir ($P<0.05$). LP+M kombinasyonlarında ise daha az belirgin olan bu artış, M ilavesinin bakteri populasyonunda, selüloz sindiren bakteri sayısında artışa neden olarak fermantasyonu daha çok AA yönlü düzenlemesinden kaynaklanmış olabilir. Bu veriler konu ile ilgili daha önceki (Opsi ve ark., 2011; Monteiro ve ark., 2020) çalışma bulguları ile uyum içerisindedir. PA miktarı bakımından LP3 ve LP3M inokülasyonlarında görülen rakamsal düşüş ise artan *L. plantarum* yoğunluğunun

propiyonik asit üreten bakterilere anti-mikrobiyal etki yapmasına ve böylelikle propiyonat üretiminin azalmasına bağlanabilir (Zalan ve ark., 2005; O'Brain ve ark., 2013). Mevcut araştırmada, rumen fermantasyon parametrelerinin genelinde, ara inkübasyonlarda belli bir kararlılık görülmemektedir. Dinamik bir yapıya sahip olan rumen ekolojisindeki bu fermantasyon dalgalanması, daha önce de belirtildiği gibi inokülasyonun yoğunluğu ve içeriği ile substratın çözünür kısmı ve hücre duvarı elemanlarının fermantasyon hızları arasındaki ilişkiye atfedilebilir. Zira, Blummel ve Becker (1997) ve Wanapat (2012), *in vitro* çalışmalarda sıklıkla karşılaşılan bu durumu; gecikmiş mikrobiyal kolonizasyonun neden olduğu fermantasyon gecikmesine veya substratın çözünür kısmı tüketildikten sonra hücre duvarları unsurlarının fermantasyonunun başlamasına kadar geçen lag periyoda bağlamışlardır. Diğer taraftan *in vitro* çalışmalarda kullanılan toplam rumen sıvısı hacminin (100, 200 ve 300 ml), bakteriyel kolonizasyonu ve fermantasyonu etkilediği, daha yüksek rumen sıvısı hacimli *in vitro* sistemlerde, substrata bakteriyel yapışmanın daha hızlı ve dengeli olmasını sağlayarak bakteriyel popülasyonun demografik yapısını daha kararlı kıldığı ifade edilmiştir (McDermott, 2018).

LAB inokulasyonlarında AA/PA oranı, UYA üretimi sağlayan rumen fermantasyon yolağının göstergesidir. Araştırmacılar *L. plantarum* ilavesi ile AA miktarının arttığını (Soriano ve ark., 2014; İzüdddin ve ark., 2018), azaldığını (Astuti ve ark., 2018; Direkvandi ve ark., 2020) veya değişmediğini (Ellis ve ark., 2016; Direkvandi ve ark., 2021) bildirmişlerdir. PA miktarının arttığı (Soriano ve ark., 2014; Astuti ve ark., 2018; İzüdddin ve ark., 2018), azaldığı (Asa ve ark., 2010) veya değişmediğine (Ellis ve ark., 2016; Direkvandi ve ark., 2020; Direkvandi ve ark., 2021) dair bildirişler bulunmaktadır.

Sunulan bu çalışmada, AA ve PA miktarları zamana bağlı olarak eş zamanlı artarken; AA/PA oranları ise inkübasyon sürelerine bağlı olarak değişmiştir ($P<0.001$). İnokülasyonlar arasında, PA miktarının artışı ile AA/PA oranının düşmesine nispeten daha fazla katkı sunan inokülasyonlar LP1 ve LP2 iken; maya kombinasyonlu gruplarda ise beklendiği üzere AA/PA oranında bir artma eğilimi tespit edilmiştir. Ara inkübasyonlarda, inokülasyonların AA ve PA miktarları göz önüne alındığında; inokülasyonların zamana bağlı rumen fermantasyon modelleri ve muhtemel sebepleri

hakkında önceki kısımlarda zikredilen yorumlar temelinde mevcut veriler, literatür bilgileri ile uyum içerisindedir (Soriano ve ark., 2014; İzüdddin ve ark., 2018). AA/PA oranının azalması, TGÜ içerisindeki metan gazı miktarını azaltır. Nitekim LP1 inokülasyonunun AA miktarının genel olarak diğer inokülasyonlara göre düşük ($P<0.001$), PA miktarının ise rakamsal olarak yüksek olması, bu inokülasyonun kontrol grubuna göre metanı baskılama performansı bakımından da en başarılı inokülasyon olmasını sağlamıştır ($P<0.001$) **(Tablo1)**.

LP1 inokülasyonunda, özellikle 12. ve 24. saatlerde AA/PA oranının azalması; rumen ortamında metanojenik bakterilerin metan oluşumu için ihtiyaç duydukları H_2'nin propiyonik asit üretiminde kullanıldığı ve böylece metan oranının düşmesine sebep olduğu şeklinde değerlendirilmektedir (Görgülü ve ark., 2009; Astuti ve ark., 2018). Bununla birlikte LP1 inokülasyonunda metan oranının diğer inokülasyonlara göre daha düşük olması, diğer tek başına *L. plantarum* inokülasyonlarına kıyasla İVOMS'nin daha düşük olması ile de ilişkili olabilir. Zira İVOMS'i kontrole göre daha yüksek olan *L. plantarum* inokülasyonları göz önüne alındığında bu sonuç ortaya çıkmaktadır. Bu ilişki *L. plantarum* inokülasyonlarının TGÜ miktarları ile de uyum içerisindedir.

M ilavesi ile 24. saat AA miktarında belirgin bir artış görülmektedir. Mayanın selülolitik bakterilerin gelişimi ve dolayısı ile AA üretimi üzerine katkısı sebebi ile bu beklenen bir sonuç olup; M inokulasyonlarında TGÜ içerisindeki metan oranının yüksek olmasını da açıklamaktadır. Ayrıca M inokülasyonlarının da AA/PA oranındaki mevcut artış bu yorumu da destekler niteliktedir. Bununla birlikte, 24. saatte en yüksek rumen sıvısı AA miktarı LP3M inokülasyonunda tespit edilmiştir ($P<0.001$). Yine aynı inkübasyon saatinde diğer inokulasyon gruplarına kıyasla rakamsal olarak en düşük PA miktarı sırasıyla LP3 ve LP3M inokülasyonlarında belirlenmiştir. Bu durum, daha önce belirtildiği gibi artan *L. plantarum* inokülasyonun propiyonik asit üreten bakterilere anti-mikrobiyal etki göstermesine ve böylelikle propiyonat üretimini baskılamasına da bağlanabilir (Zalan ve ark., 2005; O'Brain ve ark., 2013). Bu anti-mikrobiyel etkinin metanojenler lehine selektif olduğu; böylelikle artan AA/PA oranı sebebi ile metanol ve metilamin gibi metil grubu içeren bileşiklerin metanojenler tarafından kullanımının arttığı bildirilmektedir (Doyle ve ark., 2013).

Gerek *in vivo* gerekse *in vitro* çalışmalarda, yem veya substratın toplam çözünebilir kısmının fermantasyon hızının en yüksek olduğu saat yemlemeden (veya inkübasyondan) sonraki ilk saatlerdir. Mevcut araştırmada, rumen sıvısı LA miktarının inkübasyonun 3. saatinde yüksek olması bu nedenle beklenen ve diğer bildirişlerle uyumlu olan bir sonuçtur (Khota ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2019; Oskoueian ve ark., 2021). Fermantasyonun ilerleyen süreçlerinde LA miktarındaki azalma, laktik asit kullanan bakterilerin artan LA kullanımına atfedilebilir. Çünkü yapılan çalışmalarda, özellikle konsantre yem ağırlıklı substratlarda gözlenmek üzere kaba yem ağırlıklı substrat fermantasyonununda da, rumen sıvısında *in vitro* LAB inokülasyonunun bakteriyel popülasyonu bir denge arayışı içerisinde değiştirdiğini, artan LA miktarına bağlı olarak başta *Megasphaera elsdenii* olmak üzere laktik asit kullanan bakteri popülasyonunun arttığını, böylelikle ortamdaki LA'nın propiyonik aside dönüştürülerek bir denge sağlandığını ifade etmektedirler (Yoon ve Stern, 1995) **.** Maya katkılı inokülasyonlarda ise selülolitik bakteri yoğunluğunun artmasına bağlı olarak pH'nın yükselebileceği bildirilmiştir (Elghandor ve ark., 2014). Tek başına M ve LP+M kombinasyonlarına ait 24. saat pH değeri bu yorumu destekler niteliktedir. Diğer taraftan, Monteiro ve ark. (2020), LAB kombinasyonları (*L. fermentum*+*L. plantarum*) ve/veya maya inokülasyonlarının LA miktarını değiştirmediğini ifade etmiştir. Probiyotik takviyesinin ruminal mikropların laktik asit varlığına adaptasyonunu arttırdığı veya laktik asitin asetik aside parçalanmasıyla rumendeki laktik asit birikimini engellediği öne sürülmüştür (Ghorbani ve ark., 2002; Nocek ve ark., 2002).

Rumen sıvısı BA miktarları *in vivo* (Thrune ve ark., 2009; Sari ve ark.,2019) ve *in vitro* LAB inokülasyonu (Soriano ve ark., 2014; Astuti ve ark.,2018) yapılan çalışmalarla uyum içerisindedir. Direkvandi ve ark. (2021), kaba yem ağırlıklı substrata LAB (*L. plantarum*+*L. fermentum*), *Saccharomyces cerevisia* ve *Megasphaera elsdenii* inokülasyonunun 48. saat rumen fermantasyon parametrelerine etkilerini incelediği çalışmada; LAB inokülasyonunun rumen sıvısı bütirik asit miktarını rakamsal, *Saccharomyces cerevisia* inokülasyonunun ise istatistiksel olarak azalttığını tespit etmişlerdir. Soriano ve ark. (2014) ise *L. mucosae* inokülasyonu ile 24. saat rumen sıvısı bütirik asit miktarının önemli derecede arttığını belirlemiştir. Diğer taraftan, Asa ve ark. (2010) ile O'Brain ve ark. (2013) ise *in vitro* LAB inokülasyonunun rumen sıvısı BA miktarını azalttığını bildirmişlerdir. Substratın kimyasal kompozisyonu ve LAB

yoğunluklarına göre farklılık gösteren bu veriler, rumen sıvısındaki *Megasphaera elsdenii* yoğunluğuna bağlı olarak belirginlik göstermekte ve fermantasyon modelinde asetik asite kıyasla daha çok propiyonik asit ve bütirik asit üretimi sağlamaktadır. Bu durum, özellikle rumen sıvısı pH'sındaki iyileşmenin daha bariz gözlendiği konsantre ağırlıklı substratlara yapılan inokülasyonlarda, rumen fermantasyon profilinde bütirat ve valerat üretimine doğru bir kayma ile de açıklanmaktadır (Direkvandi ve ark., 2021).

Rumen sıvısı pH aralığı (6.43-6.75), kaba yem ağırlıklı substrat kullanılarak yapılan çalışmaların (İzüddin ve ark., 2018; Abdelbagi ve ark., 2021) pH aralığı ile uyum göstermektedir. LP2 ve LP3 inokülasyonlarında *L. plantarum* yoğunluğundan kaynaklanan pH düşüşü Soriano ve ark.'nın (2014) bulguları ile uyumludur. Diğer taraftan *in vitro* ruminal pH'nın *S. cerevisiae* içeren gruplarda kontrol grubu ve diğer inokülasyon gruplarından daha yüksek olması Bach ve ark. (2007), Thrune ve ark. (2009) ve Pinloche ve ark.'nın (2013) yaptığı çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. İnokülasyonlara *S. cerevisiae* dâhil edildikten sonra pH değerlerinde istatistiki olarak önemli derecede artış gözlenmesi; bu gruplarda selülolitik bakteri popülasyonundaki iyileşmeye bağlı olarak şekillenen AA yönlü bir fermantasyona bağlanabilir. Sunulan bu çalışmanın aksine Abdelbagi ve ark.'nın (2021) yapmış olduğu bir denemede de (50ml rumen sıvısı+tampon çözelti ve 500mg substrat, %60 kaba+%40 konsantre) 0.5 ml (10^{11}cfu/ml) kapsüllü ve kapsülsüz *L. plantarum* (TSD-10) inokülasyonu uygulamış ve kapsül formda *L. plantarum*'un rumen sıvısı pH'sını önemli derecede düşürdüğünü ($P<0.01$); kapsülsüz formunun ise etkilemediğini tespit etmiştir. Maya kültürleri ile yapılan bazı çalışmalarda ise (Putnam ve ark., 1997; Miller-Webster ve ark., 2002; Erasmus ve ark., 2005), pH'nın etkilenmediği bildirilmiştir. Mikrobial yem katkılarının rumen sıvısı pH'sını etkilemesine, glikoz kullanımı için *S. bovis* ve diğer laktobacillus türleri arasındaki yarışın da içinde bulunduğu birçok mekanizmanın etkili olduğu ileri sürülmektedir (Chaucheyras ve ark., 1996). LAB inokülasyonunun glikoz tüketimi için LUB (Nagaraja 2014) ve protozoa (Galip, 2006) popülasyonunda modifikasyonlara yol açtığı bildirilmektedir. pH değişimindeki bu farklılıkların ayrıca, substratın kimyasal bileşimi, mikroorganizma inokülasyon düzeyi, *in vitro* rumen sıvısı miktarı gibi çeşitli faktörlere bağlı olabileceği de düşünülmektedir.

Rumende TUYA üretimi büyük ölçüde fermantasyon derecesine ve hızına bağlıdır (Cone ve Becker, 2012). Mevcut çalışmada, inokülasyonların TUYA miktarını arttırmış olması bakteriyel popülasyonun fermantasyonu iyileştirmesine atfedilmiştir (Soriano ve ark., 2014; Ardani ve ark., 2023). *S. cerevisea*'nın dâhil olduğu inokülasyonlarda, özellikle 24. saat TUYA miktarında gözlenen artış, bu gruplarda selülolitik bakteri varlığındaki artışa bağlı olarak şekillenen AA yönlü bir fermantasyona bağlanabilir. Nitekim inokülasyonlara ait AA miktarları da bu yorumu destekler niteliktedir. Diğer taraftan inokülasyonlara ait İVOMS ve TGÜ değerlerinin, TUYA ile olan uyumu bu parametreler arasındaki pozitif korelasyona işaret eden önceki çalışma bulguları (Rahman ve ark., 2013; Retta, 2016; Asuti ve ark., 2018) ile benzerlik göstermektedir. İzüddin ve ark.'nın (2018) yaptığı benzer bir çalışmada rumen sıvısına postbiyotik inokülasyonunun rumen sıvısındaki toplam ve bireysel UYA üretimini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Abdelbagi ve ark. (2021), *L. plantarum* inokülasyonunun rumen sıvısı TUYA miktarını arttırdığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Monteiro ve ark. (2020), *L. plantarum ve S. cerevisea* inokülasyonlarının TUYA miktarını azalttığını, bunun da muhtemelen TUYA üretimi için ihtiyaç duyulan fermente olabilir karbonhidrat kullanımının mikrobiyal rumen sıvısı inokülasyonları ile sınırlanmış olmasına ve daha düşük OM sindirilebilirliğine atfetmişlerdir. Ancak LAB ve diğer mikrobiyal katkı maddeleri ile yapılan bazı araştırmalarda, TUYA miktarının inokülasyonlardan etkilenmediği de bildirilmiştir (Raeth-Knight ve ark., 2007; O'Brien ve ark., 2013; Ellis ve ark., 2016; Jeyanathan ve ark., 2016). Yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda da süt sığırlarına maya takviyesi yapıldığında rumen asetat, propiyonat, bütirat konsantrasyonları, AA/PA ve TUYA konsantrasyonlarında önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (Newbold ve ark., 1995; Putnam ve ark., 1997).

Fermantasyon süresine bağlı olarak rumen sıvısı NH_3-N miktarında gözlenen artışın, inokülasyonların yoğunluğuna bağlı olarak aynı şekilde artmadığı; tek başına *S. cerevisiae* inokulasyonun tüm inkübasyon sürelerinde en yüksek, *L. plantarum*+ *S. cerevisiae* inokülasyonlarının ise tek başına *L. plantarum* inokülasyonlarından yüksek olduğu belirlendi. M veya M kombinasyonlu gruplarda genel olarak gözlenen daha yüksek NH_3-N miktarı, mayanın N kaynağı olarak rumende amonyak üretimi için daha fazla kullanılmasına bağlanabilir. Beklenenin aksine, mayanın rumen sıvısı NH_3-N üretimi üzerine olumlu etkisi, mikrobiyal protein üretiminde gözlenmemiştir **(Tablo 3)**.

MP üretimi ile TUYA üretimi arasında negatif bir ilişki vardır ve yemlerde fermente olabilen besin maddeleri gaz üretimi, uçucu yağ asidi üretimi ve mikrobiyal protein sentezinde kullanılmaktadır. Böylelikle yemlerde fermente olabilen besin maddelerinin büyük bir kısmının uçucu yağ asidi ve gaz üretiminde kullanılması durumunda mikrobiyal protein üretiminde kullanılan kısım azalacağından dolayı mikrobiyal protein sentezi azalmaktadır (Özkan ve ark., 2020). *S. cerevisiae* içeren kombinasyonlarda da bu yönde bir süreç geliştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla gaz üretiminin öncelenmesinin mikrobiyal protein üretiminin aleyhine sonuçlandığı ifade edilmektedir (Özkan ve ark., 2020).

Mevcut araştırma bulgularının aksine, yüksek verimli süt ineği rasyonlarının substrat olarak kullanıldığı ve *L. plantarum* ve maya inokülasyonlarının yapıldığı bir *in vitro* çalışmada (Monteiro ve ark., 2020), katkıların rumen NH_3-N miktarını azalttığı; bu azalmanın ya protein yıkılımını azaltmasına ya da amonyağın rumen mikroorganizmaları tarafından kullanımının artmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. *S. cerevisiae* (Doto ve Lui 2011; Hristov ve ark., 2013a) ve *L. plantarum* (Asa ve ark., 2010; Monteiro ve ark., 2020) inokülasyonunun rumen NH_3-N miktarındaki düşüşe bu mekanizma ile sebep olduğunu bildiren *in vitro* çalışmalarla birlikte rumen mikrobiyal inokülasyonlarının NH_3-N miktarını etkilemediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Yang ve ark., 2004; Direkvandi ve ark., 2021).

SONUÇ:

Mevcut tez çalışması verileri genel olarak değerlendirildiğinde;

İn vitro rumen sıvısı inokülantı olarak kullanılan *L.plantarum RC1.4* ve *S. cerevisiae* mikrobiyal katkılarının, yoğunluk ve zamana bağlı olarak rumen fermantasyonu ve ruminal biogaz profili üzerinde önemli etkisi olduğu belirlendi. Dinamik rumen ekosisteminin, mikrobiyal katkıların kullanım etkinliğinde önemli bir sınırlandırıcı faktör olduğu kanaatine varıldı. Nitekim;

1- IVOMS'yi en çok arttıran inokülantlar (LP3 ve LP3M) TGÜ'yü arttırken; MP üretimini olumsuz etkiledi. 2- GSD ve GSKM'yi en çok arttıran inokülant (LP3M) TGÜ'yü arttırken; MP üretimini olumsuz etkiledi. 3- Rumen TUYA miktarını en çok arttıran inokülantlar (*S. cerevisiae* ile kombine edilenler) TGÜ ve İVOMS'u arttırken;

MP üretimini olumsuz etkiledi. 4- 24. saat TGÜ içerisindeki CH_4 oranını en çok baskılayan inokülant (LP1), IVOMS ve MP üretimini değiştirmedi.

Sonuç olarak, mikrobiyal yem katkı maddelerinin rumen mikroorganizma popülasyonuna etkilerini ortaya koyan metagenomik çalışmalarla desteklenerek, rumen fermantasyonu ile mikrobiyal protein üretiminde herhangi bir zaafiyet oluşturmadan CH_4 üretimini baskılayacak mikroorganizma türlerinin kullanımına yönelik *in vitro* çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

Abdelbagi M, Ridwan R, Fidriyanto R, Jayanegara A. Effects of probiotics and encapsulated probiotics on enteric methane emission and nutrient digestibility in vitro. In IOP Conference Series: Earth Environ Sci. IOP Publishing. 2021; 788: 012050).

Abrão FO, Duarte ER, Freitas CES, Vieira EA, Geraseev LC, da Silva-Hughes AF, et al. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. Curr. Microbiol. 2014;69:649-59.

Adegbeye MJ, Elghandour MM, Monroy JC, Abegunde TO, Salem AZ, Barbabosa-Pliego A, et al. Potential influence of Yucca extract as feed additive on greenhouse gases emission for a cleaner livestock and aquaculture farming-a review. J Clean Prod. 2019; 239:118074.

Aksu T, Validov S, Karimova L, Demirel M, Levendoğlu T, Erdoğan S, et al. The effects of the L. plantarum strain RC1. 4 starter culture with or without sucrose addition on fermentation efficacy, microbial content, and aerobic stability indicators of alfalfa silage. Turk J Vet Anim Sci. 2021;45(4):726-34.

AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists; Arlington, VA, USA. 2005.

Ardani LR, Marlida Y, Zain M, Jamsari J, Fassah DM. Lactic acid bacteria and yeast strains isolated from fermented fish (Budu) identified as candidate ruminant probiotics based on in vitro rumen fermentation characteristics. Vet. World. 2023;16(2):395.

Asa R, Tanaka A, Uehara A, Shinzato I, Toride Y, Usui N, et al. Effects of protease-resistant antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. Asian-Australas J Anim Sci. 2010;23(6):700-7.

Astuti WD, Wiryawan KG, Wina E, Widyastuti Y, Suharti S, Ridwan R. Effects of selected Lactobacillus plantarum as probiotic on in vitro ruminal fermentation and microbial population. Pak. J. Nutr. 2018;17(3):131-9.

Bach A, Iglesias C, Devant M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. Anim. Feed Sci. Technol. 2007;136(1-2):146-53.

Ball DM, Collins M, Lacefield GD, Martin NP, Mertens DA, Olson KE, et al. Understanding forage quality. American Farm Bureau Federation Publication. 2001;1-21.

Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. J Dairy Sci. 2003;86(2):630-43.

Beauchemin KA, McGinn SM. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. J. Anim. Sci. 2006;84(6):1489-96.

Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, Mcallister TA. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. Aust. J. Exp. Agric. 2008;48:21–7.

Beauchemin KA, McAllister TA, McGinn SM. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Natur. Resour. 2009;4:1-8.

Belanche A, Fuente GDL, Newbold CJ. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. FEMS Microbiol. Ecol. 2014; 90: 663.

Benchaar C, Pomar C, Chiquette J. Evaluation of diet strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. Can. J. Anim. Sci. 2001;81:563–74.

Blümmel M, Becker K. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. Br. J. Nutr. 1997;77(5):757-68.

Blümmel M, Lebzien P. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. Liv. Prod. Sci. 2001;68(2-3):107-17.

Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Massé D. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. . Can. J. Anim. Sci. 2004;84:319-35.

Breves G, Leonard-marek S. Verdauungsvorgänge in den Vormägen, in: W. V. Engelhardt. Physiologie der Haustiere. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, Germany. 2000;345-54.

Bureenok S, Suksombat W, Kawamoto Y. Effects of the fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB) and molasses on digestibility and rumen fermentation characteristics of ruzigrass (Brachiaria ruziziensis) silages. Livest. Sci. 2011;138:266-71.

Callaway ES, Martin SA. Effects of a Saccharomyces cerevisiae culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J Dairy Sci. 1997;80:2035–2044.

Carro MD, Lebzien P, Rohr K. Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates, Anim. Feed Sci. Technol. 1992;37(3,4):209-20.

Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P. In vitro H2 utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ Microbiol. 1995;61:3466–7.

Chaucheyras F, Fonty G, Gouet P, Bertin G, Salmon JM. Effects of a strain of Saccharomyces cerevisiae (Levucell® SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. Can J. Microbiol. 1996;42:927–33.

Chiquette J. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. Anim. Feed Sci. Technol. 2009;153(3-4):278-91.

Choudhury PK, Salem AZM, Jena R, Kumar S, Singh R, Puniya AK. Rumen microbiology: An overview. Rumen microbiology: from evolution to revolution. 2015;3-16.

Clark H, Pinares-Patiño C, De Klein C. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. In: DA McGilloway (Ed), Grassland: A Global Resource, Wageningen Academic Publishers, Wageningen. 2005;279- 93.

Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Yu Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. Sci. Total Environ. 2016;545:556-68.

Cobos MA, de Coss AL, Ramirez ND, Gonzales SS, Cerrato RF. Pediococcus acidilactici isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. Res. Vet. Sci. 2011;90:26-30.

Cone JW, Becker PM. Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. Anim. Feed Sci. Technol. 2012;172:34-41.

Contreras-Govea FE, Muck RE, Mertens DR, Weimer PJ. Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn and corn silages. Anim. Feed Sci. Technol. 2011;163:2-10.

Cotta MA. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Appl Environ Microbiol. 1988;54:772-76.

Counotte GH, Prins RA, Janssen RH, DeBie MJ. Role of Megasphaera elsdenii in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. Appl. Environ. Microbiol. 1981;42:649-55.

Czerkawski JW. An Introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, Oxford. 1986.

Dalton H. Methane oxidation by methanotrophs. In Methane and methanol. Springer. Boston, MA. USA. 1992;85- 114.

Dawson KA, Girard ID. Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. In Proceedings of Alltech's 13th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Loughborough, Leics, UK: Nottingham University Press. 1997; pp. 34–6.

de Quirós ARB, Lage-Yusty MA, López-Hernández J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. Food Res. Int. 2009;42(8):1018-22.

Dehority BA. Rumen microbiology. Nottingham: nottingham University press. 2003; 372.

Demirtaş A, Pişkin İ. Isırgan otu (Urtica dioica L.), papatya (Matricaria chamomilla L.) ve hayıt meyvesi (Vitex agnus-castus L.) ekstraktlarının normal koşullarda ve asidoz koşullarında rumen mikrobiyal fermentasyonuna in vitro etkileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2013.

Direkvandi E, Mohammadabadi T, Salem AZ. Effect of microbial feed additives on growth performance, microbial protein synthesis and rumen microbial population in growing lambs. Transl Anim Sci. 2020;4(4):203.

Direkvandi E, Mohammadabadi T, Salem AZM. Influence of three microbial feed additives of Megasphaera elsdenii, Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus sp. on

ruminal methane and carbon dioxide production, and biofermentation kinetics. J. App Microbiol. 2021;131(2):623-33.

Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. Comparative efficiency of various fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. Can J Anim Sci. 2000;80:473-82.

Doreau M, Martin C, Morgavi DP, Eugene M. Reducing methane emission in ruminants: is it an achievable goal?. Ranilla MJ (ed), Carro MD (ed), Ben Salem H (ed), Morand-Fehr P (ed). Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Zaragoza, Spain, Universidad de Leon, CIHEAM, CSIC. 2011;65-73.

Doto SP, Liu JX. Effects of direct-fed microbials and their combinations with yeast culture on in vitro rumen fermentation characteristics. J Anim Feed Sci. 2011;20:259–71.

Doyle N, Mbandlwa P, Kelly WJ, Attwood G, Li Y, Ross RP, et al. Use of lactic acid bacteria to reduce methane production in ruminants, a critical review. Front. Microbiol. 2019;10:2207.

Drake HL, Gößner AS, Daniel SL. Old acetogens, new light. Annal. NY Acad. Sci. 2008; 1125:100-28.

Dutta TK, Kundu SS, Kumar M. Potential of direct-fed-microbials on lactation performance in ruminants-a critical review. Livest. Res. Rural. Dev. 2009;21(10):219-27.

Elghandour MMY, Vázquez Chagoyán JC, Salem AZM, Kholif AE, Martínez Castañeda JS, Camacho LM, et al. Effects of Saccharomyces cerevisiae at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. Italian J Anim Sci. 2014;13:295–301.

Elghandour MMY, Salem AZM, Castaneda JSM, Camacho LM, Kholif AE, Chagoya JCV. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. J. Integr. Agric. 2015;14:526-33.

Elghandour MMY, Kholif AE, Lopez S, German D, Mendoza GD, Odongo NE. et al. In vitro gas, methane, and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. J Equine Vet Sci. 2016;38:64–71.

Elghandour MMY, Vázquez JC, Salem AZM, Kholif AE, Cipriano MM, Camacho LM., et al. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Appl. Anim. Res. 2017;45(1):389-95.

Elghandour MM, Reddy PRK, Salem AZ, Reddy PPR, Hyder I, Barbabosa-Pliego A, et al. Plant bioactives and extracts as feed additives in horse nutrition. J. Equine Vet. 2018;69:66-77.

Ellis JL, Dijkstra J, Kebreab E, Bannink A, Odongo NE, McBride BW, et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. J.Agric Sci. 2008;146(2):213-33.

Ellis JL, Bannink A, Hindrichsend IK, Kinleya RD, Pellikaan WF, Milorad N, et al. The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. Anim. Feed. Sci. Tech. 2016;211:61–74.

Erasmus LJ, Robinson PH, Ahmadi A, Hinders R, Garrett JE. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. Anim Feed Sci Technol. 2005; 122:219–39.

FAO; New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, Low Emissions Development of the Beef Cattle Sector in Uruguay—Reducing Enteric Methane for Food Security and Livelihoods (FAO/NZAGGRC, Rome). 2017.

FAO. The future of food and agriculture. 2018.

FAO. FAOSTAT Climate Change, Emissions, Emissions Totals (Internet). 2021(Erişim tarihi: 20.09.2023). Erişim adresi: http://www.fao.org/ faostat/en/#data/GT.

Fenchel T, Finlay B. The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 2006;361:1965–73.

Finn D, Ouwerkerk D, Klieve A. Methanotrophs from natural ecosystems as biocontrol agents for ruminant methane emissions. Govt. report. Australia. The University of Queensland. 2012.

Fonty G, Joblin K, Chavarot M, Roux R, Naylor G, Michallon F. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. Appl. Environ. Microbiol. 2007;73:6391-6403.

French N, Kennelly JJ. Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein cows. J. Dairy Sci. 1990;73:1857-63.

Galip, N. Effect of supplemental yeast culture and sodium bicarbonate on ruminal fermentation and blood variables in rams. J Anim Physiol Anim Nutr. 2006;90:446–52.

George D, Mallery P. IBM SPSS Statistics 23 Step by Step: A Simple Guide and Reference. New York: Routledge. 2016.

Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, et al. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy. 2013.

Ghorbani G, Morgavi D, Beauchemin K, Leedle J. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. J Anim. Sci. 2002;80:1977-85.

Giger-Reverdin S, Morand-Fehr P, Tan G. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. Livest Prod Sci. 2003;82:73-9.

Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. J App. Microbiol. 2005;98(3):662-6.

Görgülü M, Darcan NK, Göncü S. Hayvancılık ve Küresel Isınma, V. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Çorlu. 2009;30.

Guedes CM, Goncalves D, Rodrigues MAM, Dias-da-Silva A. Effect of yeast Saccharomyces cerevisiae on ruminal fermentation and fiber degradation of maize silage in cows. Anim. Feed Sci. Technol. 2008;145:27–40.

Halmemies-Beauchet-Filleau A, Rinne M, Lamminen M, Mapato C, Ampapon T, Wanapat M, et al. Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. Animal. 2018;12:295-309.

Haque MN. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. J Anim. Sci. Technol. 2018;60(1):15.

Henderson G, Naylor GE, Leahy SC, Janssen PH. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:2058-66.

Hernandez A, Kholif AE, Lugo-Coyote R, Elghandour MMY, Cipriano M, Rodríguez GB, et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. J Clean Prod. 2017;142(4):2384–92.

Hess BW, Moss GE, Rule DC. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. J. Anim. Sci. 2008;86:188-204.

Hills JL, Wales WJ, Dunshea FR, Garcia SC, Roche JR. Invited review: an evaluation of the likely effects of individualized feeding of concentrate supplements to pasture-based dairy cows. J. Dairy Sci. 2015;98:1363-1401.

Hook SE, Wright ADG, McBride BW. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. Archaea 2010. 2010.

Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, et al. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. a review of enteric methane mitigation options. J Anim Sci. 2013a;91:5045–69.

Hristov AN, Ott T, Tricarico J, Rotz A, Waghorn G, Adesogan A, et al. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. J Anim Sci. 2013b;91(11): 5095-5113.

Hungate RE. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. Arch. Microbiol. 1967;59:158–64.

Hutjens MF. Making starch work in the rumen. Sponsors and Speakers. 2007;101.

IEA. Global Methane Tracker. Paris: IEA. 2022.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group Ito the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Cli-mate Change, edited by J. T. Houghton et al. Cambridge Univ. Press, New York. 2001;881.

Iqbal MF, Cheng YF, Zhu WY, Zeshan B. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. World J. Microbiol. Biotechnol. 2008; 24:2747-55.

İzuddin WI, Loh TC, Samsudin AA, Foo HL. In vitro study of postbiotics from Lactobacillus plantarum RG14 on rumen fermentation and microbial population. Revista Brasileira de Zootecnia. 2018;47.

Jeyanathan J, Martin C, Morgavi DP. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. Animal. 2014;8(2):250-61.

Jeyanathan J, Martin C, Morgavi DP. Screening of bacterial direct-fed microbials for their antimethanogenic potential in vitro and assessment of their effect on ruminal fermentation and microbial profiles in sheep. J Anim. Sci. 2016;94(2):739-50.

Jiang X, Xu HJ, Cui ZQ, Zhang YG. Effects of supplementation with Lactobacillus plantarum 299v on the performance, blood metabolites, rumen fermentation and bacterial communities of preweaning calves. Livest. Sci. 2020;239:104120.

Jiao PX, Wei LY, Walker ND, Liu FZ, Chen LY, Beauchemin KA, et al. Comparison of non-encapsulated and encapsulated active dried yeast on ruminal pH and fermentation and site and extent of feed digestion in beef heifers fed high-grain diets. Anim. Feed Sci. Technol. 2017a;228:13-22.

Jiao PX, Liu FZ, Beauchemin KA, Yang WZ. Impact of strain and dose of lactic acid bacteria on in vitro ruminal fermentation with varying media pH levels and feed substrates. Anim. Feed Sci. Technol. 2017b;224:1-13.

Joblin KN. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. Aust. J. Agric. Res. 1999;50:1307-13.

Johnson KA, Johnson DE. Methane emisions from cattle. J Anim Sci. 1995;73:2483-92.

Jose VS, Sejian V, Bagath M, Ratnakaran AP, Lees AM, Al-Hosni YAS, et al. Modeling of greenhouse gas emission from livestock. Front. Environ. Sci. 2016;4:27.

Jouany JP. A new look to the yeast culture as probiotics for ruminants. Feed Mix. 2001; 9:17–9.

Kalyuzhnaya MG, Puri AW, Lidstrom ME. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. Metab. Eng. 2015;29:142-52.

Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC, Bhar R. Methane emissions by livestock in India and mitigation strategies. Edited by NE Odongo, M. Garcia & GJ Viljoen, 75.Kebreab E, Strathe A, Fadel J, Moraes L, France J. 2010. Impact of dietary manipulation on nutrient flows and greenhouse gas emissions in cattle. R. Bras. Zootec. 2010;39:458-64.

Karademir G, Karademir B. Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler (Derleme). Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg. 2003;43(1):61-74.

Kaya A, Kaya H, Çelebi Ş. Studies to reduce the production of methane from ruminant. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2012;43(2):197-204.

Kebreab E, Strathe AB, Dijkstra J, Mills JA, Reynolds CK, Crompton LA, et al. Energy and protein interactions and their effect on nitrogen excretion in dairy cows. In Symp. on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Parma, Italy. Wageningen Academic Publishers. 2010;417-26.

Khan AA, Gani A, Masoodi FA, Amin F, Wani IA, Khanday FA, et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β-d-glucan extracted from baker's yeast (Saccharomyces cereviseae)—Effect of γ-irradiation. Carbohydrate polymers. 2016;140:442-50.

Kholif AE, Elghandour MMY, Rodríguez GB, Olafadehan OA, Salem AZM. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. J. Clean. Prod. 2017;142:2649-55.

Khota W, Pholsen S, Higgs D, Cai Y. Fermentation quality and in vitro methane production of sorghum silage prepared with cellulase and lactic acid bacteria. Asian-Australas J Anim Sci. 2017;30(11):1568.

Kobayashi Y. Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation. Asian- Austral. J. Anim. Sci. 2010;23:410-16.

Köknaroğlu H, Akünal T. Küresel ısınmada hayvancılığın payı ve zooteknist olarak bizim rolümüz. Süleyman Demirel Üniv Ziraat Fak Derg. 2010;5(1):67-75.

Krehbiel CR, Rust SR, Zhang G, Gilliland SE. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. J. Anim. Sci. 2003;81:120-32.

Kumar S, Puniya AK, Puniya M, Dagar SS, Sirohi SK, Singh K, et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. World J. Microbiol. Biotechnol. 2009;25:1557-66.

Kung L, Hession AO. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with Megasphaera elsdenii. J Anim Sci. 1995;73:250–56.

Lakhani N, Lakhani P, Sheikh AA, Bhagat R, Dar RR, Dogra P. Methanogenesis: are ruminants only responsible: a review. J. pharmacogn. phytochem. 2017;6(6):2347-52.

Lan W, Yang C. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. Sci. Total Environ. 2019;654:1270-83.

Latham EA, Pinchak WE, Trachsel J, Allen HK, Callaway TR, Nisbet DJ, et al. Isolation, characterization and strain selection of a Paenibacillus species for use as a probiotic to aid in ruminal methane mitigation, nitrate/nitrite detoxification and food safety. Bioresour. Technol. 2018;263:358-64.

Le Van TD, Robinson JA, Ralph J, Greening RC, Smolenski WJ, Leedle JA, et al. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and Acetitomaculum ruminis. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64:3429-36.

Li Z, Wang X, Alberdi A, Deng J, Zhong Z, Si H, et al. Comparative microbiome analysis reveals the ecological relationships between rumen methanogens, acetogens, and their hosts. Front. Microbiol. 2020;1311.

Lila ZA, Mohammed N, Yasui T, Kurokawa Y, Kanda S, Itabashi H. Effects of a twin strain of Saccharomyces cerevisiae live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. J Anim. Sci. 2004;82(6):1847-54.

Lu Z, Xu Z, Shen Z, Tian Y, Shen H. Dietary energy level promotes rumen microbial protein synthesis by improving the energy productivity of the ruminal microbiome. Front. Microbiol. 2019;10:847.

Magacz M, Alatorre-Santamaría S, Kędziora K, Klasa K, Mamica P, Pepasińska W, et al. Modified lactoperoxidase system as a promising anticaries agent: In vitro studies on Streptococcus mutans biofilms. Int. J. Mol. Sci. 2023;24(15):12136.

Maia MR, Fonseca AJ, Oliveira HM, Mendonça C, Cabrita AR. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. Sci. Rep. 2016;6:32321.

Malik PK, Bhatta R, Gagen EJ, Sejian V, Soren NM, Prasad CS. "Alternate H2 sinks for reducing rumen methanogenesis," in Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation, eds V. Sejian, J. Gaughan, L. Baumgard, and C. Prasad (New Delhi: Springer). 2015;303–20.

Mao HL, Mao HL, Wang JK, Liu JX, Yoon I. Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation product on in vitro fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. J Anim Sci. 2013;91:3291– 98.

Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R, Bayourthe C. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows?. J. Dairy Sci. 2008;91(9):3528-35.

Markham R. A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis. J. Biochem. 1942;36(10-12):790.

Marlida Y, Harnentis H, Nur YS, Ardani LR. New probiotics (Lactobacillus plantarum and Saccharomyces cerevisiae) supplemented to fermented rice straw-based rations on digestibility and rumen characteristics in vitro. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2023;10(1):96.

Marques RD, Cooke RF. Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. Animals. 2021;11:2871.

Martin C, Morgavi DP, Doreau M, Jouany JP. Comment reduire la production de methane chez les ruminants? Fourrages. 2006;187:283-300.

Martinez-Fernandez G, Duval S, Kindermann M, Schirra HJ, Denman SE, McSweeney CS. 3-NOP vs. halogenated compound: methane production, ruminal fermentation and microbial community response in forage fed cattle. Front. Microbiol. 2018;9:1582.

McAllister TA, Newbold CJ. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Aust. J. Exp. Agric. 2008;48(2):7-13.

McDermott K. A batch culture study of the rumen bacterial community and the fermentative digestion of forage in cattle [Doctoral thesis]. Leeds. The University of Leeds Faculty of Biological Sciences School of Biology. 2018.

McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, Colombatto D. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. J Anim Sci. 2004;82:3346–56.

McSweeney C, Mackie R. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. Background study paper. 2012;61.

Membrive CMB. Anatomy and Physiology of the Rumen. In: D Millen, M De Beni Arrigoni, R Lauritano Pacheco (Eds), Rumenology. Springer, Cham. 2016;1-38.

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J Agric. Sci. 1979;93(1):217-22.

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.

Meral Y, Biricik H. Ruminantlarda metan emisyonunu azaltmak için kullanılan besleme yöntemleri. VII. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı). 2013;26-7.

Miller-Webster T, Hoover WH, Holt M. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy Sci. 2002;86:2009–14.

Min BR, Parker D, Brauer D, Waldrip H, Lockard C, Hales K, et al. The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: challenges and opportunities. Anim. Nutri. 2021;7:1371-87.

Minato H, Endo A, Higuchi M, Ootomo Y, Uemura T. Ecological treatise on the rumen fermentation I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. J. Gen. Appl. Microbiol. 1966;12(1):39-52.

Monteiro HF, Lelis ALJ, Brandao VL, Faccenda A, Avila AS, Arce-Cordero J, et al. In vitro evaluation of Lactobacillus plantarum as direct-fed microbials in high-producing dairy cows diets. Transl. Anim. Sci. 2020;4(1):214-28.

Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P. Quantitative determination of H_2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. Curr. Microbiol. 1996;32:129-33.

Moss AR, Jouany JP, Newbold J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootech. 2000;49:231-53.

Mwenya B, Santoso B, Sar C, Gamo Y, Kobayashi T, Arai I, et al. Effects of including 1,4-galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 2004;115: 313–26.

Nagaraja TG. A microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. 2014.

Nagashima K, Yasokawa D, Abe K, Nakagawa R, Kitamura T, Miura T, et al. Effect of a Lactobacillus species on incidence of diarrhea in calves and change of the microflora associated with growth. Biosci Microflora. 2010;29:97–110.

Newbold CJ, Wallace RJ, Chen XB, McIntosh FM. Different strains of Sacccharomyces cerevisiae differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. J. Anim. Sci. 1995;73:1811–18.

Newbold CJ, McIntosh FM, Wallace RJ. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. Can Anim. Sci. 1998;78(2):241-4.

Nocek JE, Russell J. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. J. Dairy Sci. 1988;71(8):2070-2107.

Nocek JE, Kautz WP, Leedle JAZ, Allman JG. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. J. Dairy Sci. 2002;85:429-33.

O'Brien M, Hashimoto T, Senda A, Nishida T, Takahashi J. The impact of Lactobacillus plantarum TUA1490L supernatant on in vitro rumen methanogenesis and fermentation. Anaerobe. 2013;22:137-40.

Odongo NE, Bagg R, Vessie G, Dick P, Or-Rashid MM, Hook SE, et al. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 2007;90:1781-8.

Ogata T, Kim YH, Masaki T, Iwamoto E, Ohtani Y, Orihashi T, et al. Effects of an increased concentrate diet on rumen pH and the bacterial community in Japanese Black beef cattle at different fattening stages. J. Vet. Med. Sci. 2019;81:968-74.

Opsi F, Fortina R, Tassone S, Bodas R, Lopez S. Effects of inactivated and live cells of Saccharomyces cerevisiae on in vitro ruminal fermentation of diets with different forage: concentrate ratio. J. Agric. Sci. 2011;150:271–83.

Oskoueian E, Jahromi MF, Jafari S, Shakeri M, Le HH, Ebrahimi, M. Manipulation of rice straw silage fermentation with different types of lactic acid bacteria inoculant affects rumen microbial fermentation characteristics and methane production. Vet. Sci. 2021;8(6):100.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. Acidosis in cattle: a review. J. Anim. Sci. 1998; 76:275-86.

Özkan ÇÖ, Kamalak A, Şahin M, Canbolat Ö. Farklı dönemlerinde hasat edilen bazı baklagil yem bitkilerinin sindirim derecesinin ve metabolik enerji değerlerinin in vitro gaz tekniği ile belirlenmesi. BSJ Agri. 2018;1(1):15-9.

Özkan ÇÖ, Cengiz T, Yanık M, Evlice S, Selçuk B, Ceren B, ve ark. Ruminant hayvan beslemede kullanılan bazı kaba ve kesif yemlerin in vitro gaz üretiminin, metan üretiminin, sindirim derecesinin ve mikrobiyal protein üretiminin belirlenmesi. BSJ Agri. 2020;3(1):56-60.

Öztürk H. Küresel ısınmada ruminantların rolü. Vet. Hek. Der. Derg. 2007;78(1):17-21.

Öztürk H, Demirbaş YS, Aydin FG, Pişkin İ, Ünler FM, Emre MB. Effects of hydrolyzed and live yeasts on rumen microbial fermentation in a semicontinuous culture system (Rusitec). Turkish J. Vet. Anim. Sci. 2015;39(5):556-9.

Öztürk H, Gür G. Rumen physiology: microorganisms, fermentation and manipulation. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 2021;68(4):423-34.

Pandey VC, Singh JS, Singh DP, Singh RP. Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation. Int. J. Environ. Sci Technol. 2014;11:241-50.

Patra AK. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. Asian J. Anim. Vet. Adv. 2012;7:366–75.

Philippeau C, Lettat A, Martin C, Silberberg M, Morgavi DP, Ferlay A, et al. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal characteristics, methane emission, and milk fatty acid composition in cows fed high-or low-starch diets. J. Dairy Sci. 2017;100(4): 2637-50.

Pinloche E, McEwan N, Marden JP, Bayourthe C, Auclair E, Newbold CJ. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. Plos One. 2013;8(7):e67824.

Polyorach S, Wanapat M, Cherdthong A. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. Asian Australas J. Anim. Sci. 2014;27:36–45.

Putnam DE, Schwab CG, Socha MT, Whitehouse NL, Kierstead NA, Garthwaite BD. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. J. Dairy Sci. 1997;80:374–84.

Raeth-Knight ML, Linn JG, Jung HG. Effect of direct fed microbial on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 2007;90: 1802–9.

Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the wood–ljungdahl pathway of CO_2 fixation. Biochim. Biophys. Acta. 2008;1784:1873-98.

Rahman MM, Salleh MAM, Sultana N, Kim MJ, Ra, CS. Estimation of total volatile fatty acid (VFA) from total organic carbons (TOCs) assessment through in vitro fermentation of livestock feeds. Afr. J. Microbiol. Res. 2013;7(15):1378-84.

Retta KS. Role of probiotics in rumen fermentation and animal performance: a review. Int. J. Livest. Prod. 2016;7(5):24-32.

Rezaeian M, Beakes GW, Parker DS. Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. Mycol. Res. 2004;108(10):1227-33.

Richard SH, Thomas EH. Methanotrophic bacteria. Microbiol. Rev. 1996;60:439-71.

Roque BM, Venegas M, Kinley RD, de Nys R, Duarte TL, Yang X, et al. Red seaweed (Asparagopsis taxiformis) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. Plos One. 2021;16:e0247820.

Rymer C, Givens DI. n− 3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: A review. Lipids. 2005;40(2):121-30.

Sarıpınar-Aksu, D, Sulu N. Ruminantlarda probiyotiklerin kullanımı ve rumene etkileri. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2005;11(1):93-8.

Sari NF, Ridwan R, Rohmatussolihat, Fidriyanto R, Astuti WD, Widyastuti Y. The effect of probiotics on high fiber diet in rumen fermentation characteristics Proc. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2019;251:012057.

Sazinsky MH, Lippard SJ. Methane monooxygenase: functionalizing methane at iron and copper. Met. Ions Life Sci. 2015;15:205-56.

Seankamsorn A, Cherdthong A, So S, Wanapat M. Ruminal Ecology, Microbial Protein Synthesis and Milk Production in Lactating Dairy Cows Fed Glycerin-Based Diet: A Comparison Study on Chitosan Sources Supplementation. 2020.

Seo JK, Kim SW, Kim MH, Upadhaya SD, Kam DK, Ha JK. Direct-fed microbials for ruminant animals. Asian Australas J Anim Sci. 2010;12:1657–67.

Soriano AP, Mamuad LL, Kim SH, Choi YJ, Jeong CD, Bae GS, et al. Effect of Lactobacillus mucosae on in vitro rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. Asian-australas. J. Anim. Sci. 2014;27(11):1562.

Stein DR, Allen DT, Perry EB, Bruner JC, Gates KW, Rehberger TG, et al. Effects of feeding Propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. J. Dairy Sci. 2006;89:111-25.

Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT, Palmquist DL. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 1994;77(9):2762-86.

Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 1997;36(1):1-29.

Stover MG, Watson RR, Collier R. Pre-and probiotic supplementation in ruminant livestock production. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion. 2016;938.

Sutton JD, Hart IC, Broster WH, Elliot RJ, Schuller E. Feeding frequency for lactating cows: Effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. Br. J. Nutr. 1986;56:181-92.

Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. Nat. Rev. Microbiol. 2008;6(8):579-91.

Thrune M, Bach A, Ruiz-Moreno M, Stern MD, Linn JG. Effects of Saccharomyces cerevisiae on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: yeast supplementation on rumen fermentation. Livest Sci. 2009;124:261–5.

Tong JJ, Zhang H, Jia WANG, Yun LIU, Mao SY, Xiong BH, Jiang LS. Effects of different molecular weights of chitosan on methane production and bacterial community structure in vitro. J. Integr. Agric. 2020;19(6):1644-55.

Toprak NN. Do fats reduce methane emission by ruminants? - A review. Anim. Sci. Pap. Rep. 2015;33:305-21.

Tseten T, Sanjorjo RA, Kwon M, Kim SW. Strategies to mitigate enteric methane emissions from ruminant animals. J. Microbiol. Biotechnol. 2022;269-77.

Ungerfeld EM. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. Front. Microbiol. 2015;6:37.

Ungerfeld EM. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. Front. Microbiol. 2020;11:589.

Valdez C, Newbold CJ, Hillman K, Wallace RJ. Evidence for methane oxidation in rumen fluid in vitro. Ann. Zootech. 1996;45:351.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci. 1991;74:3583-97.

Vibhute VM, Shelke RR, Chavan SD, Nage SP. Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows. Vet. World. 2011;4(12):557.

Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Front. Microbiol. 2019;10: 57.

Vijn S, Compart DP, Dutta N, Foukis A, Hess M, Hristov AN, et al. Key considerations for the use of seaweed to reduce enteric methane emissions from cattle. Front. Vet. Sci. 2020;7:1135.

Vyas D, McGeough EJ, Mohammed R, McGinn SM, McAllister TA, Beauchemin KA. Effects of Propionibacterium strains on ruminal fermentation, nutrient digestibility and methane emissions in beef cattle fed a corn grain finishing diet. Animal. 2014;8:1807-15.

Vyas D, Alazzeh A, McGinn SM, McAllister TA, Harstad OM, Holo H, et al. Enteric methane emissions in response to ruminal inoculation of Propionibacterium strains in beef cattle fed a mixed diet. Anim. Prod. Sci. 2015;56:1035-40.

Wambui CC, Awano T, Ando S, Abdulrazak SA, Ichinohe T. Effect of yeast supplementation on in vitro ruminal degradability of selected browse species from Kenya. J. Food Agric. Environ. 2010;8(2):553-7.

Wanapat M. Rumen manipulation to increase the efficient use of local feed resources and productivity of ruminants in the tropics. Asian-Australas J Anim Sci, 2000;13:59-67.

Wanapat M, Kongmun P, Poungchompu O, Cherdthong A, Khejornsart P, Pilajun R, et al. Effects of plants containing secondary compounds and plant oils on rumen fermentation and ecology. Trop. Anim. Health Prod. 2012;44:399-405.

Weinberg ZG. Effect of lactic acid bacteria on animal performance. Indian J. Biotechnol. 2003;2:378-81.

Weinberg ZG, Chen Y, Gamburg M. The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, in vitro studies. J. Dairy Sci. 2004;87(10):3386-97.

Williams, D. L. Genyornis eggshell (Dromornithidae; Aves) from the Late Pleistocene of South Australia. Alcheringa. 1981;5(2),133-40.

Wolin MJ, Miller TL, Stewart CS. Microbemicrobe interactions In: The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Blackie Acad. Profess. London. 1997;467-91.

Yang WZ, Beauchemin KA, Vedres DD, Ghorbani GR, Colombatto D, Morgavi DP. Effects of directfed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. Anim Feed Sci Tech. 2004;114:179–93.

Yoon IK, Stern MD. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants-A review. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 1995;8:533-55.

Zalan Z, Németh E, Baráth A, Halász A. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of lactobacillus strains. Food Technol. Biotechnol. 2005;43(3):219–25.

Zhang ZW, Cao ZJ, Wang YL, Wang YJ, Yang HJ, Li SL. Nitrocompounds as potential methanogenic inhibitors in ruminant animals: a review. Anim. Feed Sci. Technol. 2018; 236:107-14.

Zhao J, Dong Z, Li J, Chen L, Bai Y, Jia Y, et al. Effects of lactic acid bacteria and molasses on fermentation dynamics, structural and nonstructural carbohydrate composition and in vitro ruminal fermentation of rice straw silage. Asian-Australas J Anim Sci. 2019;32(6):783.

ÖZGEÇMİŞ

EKLER

Ek 1. Etik Kurul raporu

Ek 2. Tez Orjinallik Raporu