

**FERMENTE EDİLMİŞ DOĞAL LAKTİK
ASİT SIVISININ YONCA BALYA SİLAJ
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sevin ÖZTÜRK AKSOY

Yüksek Lisans Tezi

Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fisun KOÇ

Tekirdağ-2014

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FERMENTE EDİLMİŞ DOĞAL LAKTİK ASİT SIVISININ YONCA
BALYA SİLAJ KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sevin ÖZTÜRK AKSOY

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. FİSUN KOÇ

TEKİRDAĞ – 2014

Her hakkı saklıdır.

Doç. Dr. Fisun KOÇ danışmanlığında, Sevin ÖZTÜRK AKSOY tarafından hazırlanan “Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının Yonca Balya Silaj Kalitesi Üzerine Etkileri “ konulu bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından, Zootekni Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Ümit GEÇGEL

İmza :

Üye: Doç. Dr. M. Levent ÖZDÜVEN

İmza :

Üye: Doç. Dr. Fisun KOÇ (Danışman)

İmza :

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

**BU TEZ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
TARAFINDAN NKUBAP.00.24.YL.12.09 NOLU PROJE İLE DESTEKLENMİŞTİR**

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**FERMENTE EDİLMİŞ DOĞAL LAKTİK ASİT SIVISININ YONCA BALYA SİLAJ
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sevin ÖZTÜRK AKSOY

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootečni Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Fisun KOÇ

Bu çalışma homofermantatif (*L. plantarum*), heterofermantatif (*L. buchneri*) laktik asit bakterilerinin (LAB) ve PJJ'nin (Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı) balyalanmış yonca silaj kalitesi ve aerobik stabilite üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Soldurulmuş materyal (602,3 g/kg KM), 3 katkı maddesi ile ayrı ayrı 10^6 cfu/g düzeyinde muamele edilerek balyalanmış ve altı kat streçlenmiş film ile sarılarak 150 gün süre ile silolanmıştır. On iki adet balyanın yapıldığı çalışmada, katkısız hazırlanan balyalar kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Yonca balya silajları dış ortamda muhafaza edilmiştir. Silolama dönemi sonunda her muamele grubundan 3'er silo açılarak silajlarda kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Silolama döneminin sonunda açılan tüm silajlara 5 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır. Sonuç olarak laktik asit bakteri inokulantı ve PJJ, yonca silajlarında kaliteyi arttırmıştır. Aerobik stabilite açısından; PJJ'li silajların CO₂ üretimi, koliform bakteri sayıları ve maya değerlerinin az olması olumlu yönde bir etkidir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, taze PJJ'nin doğrudan homofermantatif özellikle LAB kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Yonca balya silajı, PJJ (fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı), Laktik asit bakteri inokulantı, Silaj kalitesi.

2014, 62 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

The Effect of Pre-Fermented Juice on Silage Quality of Alfalfa Bale Silage

Sevin ÖZTÜRK AKSOY

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Main Science Division of Animal Science

Supervisor: Assoc. Prof. Fisun KOÇ

The experiment was conducted to investigate the effects of two homofermentative (*L. plantarum*), heterofermentatif lactic acid bacteria (*L. buchneri*) and PJF (pre fermented juice) on silage quality and aerobic stability. Wilted herbage (602,3 g/kgDM), treated with 3 additives at 10^6 cfu/g and baled. A total 12 baled were wrapped with six layers of plastic stretch-film and ensiled for 150 days. Bales with no additives served as control group. Alfalfa silos have been stored in outside. At the end of the ensiling period, three silos of each treatment group were opened and chemical and microbiological analyses were made. Aerobic stability test was applied to all silages which were opened at the end of the ensiling period for five days. Consequently lactic acid bacteria inoculants and PJF increased the quality of alfalfa silages. In terms of aerobic stability, PJF used had a positive effect on CO₂ concentrations. coliform bacteria and yeast. It can be concluded that PJF's can be directly used as good sources homofermentative LAB for alfalfa silage.

Keywords: Alfalfa bale silage, PJF (pre fermented juice), Lactic acid bacterial inoculants Silage quality.

2014, 62 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ŞEKİL ÇİZELGESİ	viii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik , Fizyolojik ve Taksonomik Özellikleri.....	4
2.2. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Gelişimi.....	6
2.3. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silaj Fermantasyonu Üzerine Etkileri.....	7
2.4. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkileri.....	11
2.5. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Hücre Duvarı Bileşenleri Üzerine Etkileri.....	14
2.6. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Aerobik Stabiliteleri Üzerine Etkileri... ..	15
2.7. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Rumen Parçalanabilirlik Özellikleri İle Hayvanların Performansları Üzerine Etkileri.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Silaj materyali.....	22
3.1.2. Silajların hazırlanması.....	22
3.1.3. Silajlarda kullanılan katkı maddeleri.....	23
3.1.4. Katkı maddelerinin kullanım şekli.....	23
3.1.4.1 PJF (Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının Hazırlanması).....	23
3.2.Yöntem.....	24

3.2.1. Silaj kalitesi belirlenmesi için kullanılan yöntemler.....	24
3.2.1.1. pH Analizleri.....	24
3.2.1.2. SÇK Analizi.....	24
3.2.1.3. NH ₃ -N Analizi.....	24
3.2.1.4. Laktik Asit Analizi.....	25
3.2.1.5. Mikrobiyolojik Analizler.....	25
3.2.2. Ham madde analizleri.....	28
3.2.2.1. Ham besin madde analiz yöntemleri.....	28
3.2.2.2. Enzimde OM çözünebilirliği analiz yöntemleri.....	28
3.2.2.3. Hücre duvarı içerikleri analiz yöntemleri.....	29
3.2.3. Aerobik bozulmaya dirence ilişkin analizler.....	31
3.2.4. İstatiksel analizler.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler.....	33
4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri.....	34
4.2.1. Yonca silajlarının fermentasyon özellikleri ile ilgili bulgular.....	34
4.2.1.1. PH.....	35
4.2.1.2. KM.....	36
4.2.1.3. NH ₃ -N.....	36
4.2.1.4. SÇK.....	37
4.2.1.5. HP.....	37
4.2.1.6. LA.....	38
4.2.2. Yonca silajlarının mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili bulgular.....	38
4.3. LAB'lerinin İdentifikasyon Testi.....	40
4.3.1. Karbonhidrat metabolizmaları (API 50 CHL) sonuçlarına göre LAB izolatlarının Tanımlanması.....	40
4.3.2. Silajların aerobik stabiliteleri.....	40

4.3.3. Yonca silajlarının hücre duvarı bileşenlerine ait bulgular.....	41
4.3.4. Yonca silajlarının enzimatik yöntem ile OM sindirilebilirliğine ait bulgular.....	43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
6. KAYNAKLAR.....	46
7. EKLER.....	56
TEŞEKKÜR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62

KISALTMALAR DİZİNİ

KM	: Kuru madde
TM	: Taze materyal
HK	: Ham kül
HP	: Ham protein
LAB	: Laktik asit bakterileri
PJF	: Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı
^{ho} LAB	: Homofermantatif laktik asit bakterileri
^{het} LAB	: Heterofermantatif laktik asit bakterileri
SÇK	: Suda çözünebilir karbonhidratlar
NH ₃ -N	: Amonyaya bağlı nitrojen
TMAB:	: Total mezofilik bakteri
NAD	: Nikotinamid adenin dinükloit
NDF	: Nötral çözücülerde çözünmeyen karbonhidratlar
ADF	: Asit çözücülerde çözünmeyen karbonhidratlar
ADL	: Asit çözücülerde çözünmeyen lignin
OM	: Organik madde
OMS	: Organik madde sindirilebilirliği

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Silolama dönemine kadar bitkide bulunan bakteriyal ve fungal populasyonlar ile miktarları (cfu/g).....	11
Çizelge 4.1. Yoncanın silolanmadan önceki özelliklerine ilişkin değerler.....	33
Çizelge 4.2. Yonca silajlarında kimyasal analiz sonuçları.....	35
Çizelge 4.3. Yonca silajlarında mikrobiyolojik analiz sonuçları, log ₁₀ cfu/g TM.....	38
Çizelge 4.4. Yonca silajlarının aerobik dayanıklılık test sonuçları.....	40
Çizelge 4.5. Yonca silajlarında hücre duvarı bileşenlerine ait analiz sonuçları, % KM.....	42
Çizelge 4.6. Yonca silajlarının in vitro OM sindirilebilirlik özellikleri, (%).....	43

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Silajlarda yaygın olarak bulunan laktik asit bakteri cinsleri.....	6
Şekil 3.1. Yonca Balya Silajları.....	23
Şekil 3.2. Ekim Yapılmış ve Renk Değişimi Gözlenmiş API 50 CHL Test Kiti.....	27

1. GİRİŞ

Silaj, suca zengin yemlerin beton, taş, tahta veya plastik malzemeden hazırlanan silo kabı içinde havasız ortamda süt asidi (laktik asit) bakterilerinin etkinliğine bırakılarak fermente edilmeleriyle elde edilen yemdir (Kutlu 1995). Hayvanların yeşil ot ihtiyacını gidermek için suca zengin yemlerden hazırlanan bir çeşit turşu olarak da tanımlanabilir.

Silaj özellikle ruminant hayvanlar için vazgeçilmez bir kaba yem kaynağıdır. Yeterli ekili yem bitkisi alanı bulunup kurutma olanağı olmayan birçok işletme haylage (kısmen kurutulmuş silaj) formunda silaj yapmaktadır (Stallings ve ark. 1981). Yapılmakta olan silajlar için çeşitli hammaddeler kullanılmaktadır. Bunların arasında mısır, fiğ, sorgum, şeker pancarı, buğday ve son yıllarda değerlendirildiği görülen sanayi yan ürünlerinden ana hammaddeye anason posası, üzüm posası ilavesiyle elde edilen silajlar örnek olarak verilebilir.

Kaba yem açığının giderek artmaya devam ettiği ülkemizde, özellikle ruminant beslemede çeşitli bitkilerden silaj yapılmaktadır. Silaj olarak yapımı ve kullanımı yeni benimsenmeye başlayan bitki çeşitlerinden biri de yonca (*Medicago sativa*) 'dır. Silajlık olarak yonca protein düzeyinin yüksek olması ve karbonhidrat içeriğinin düşük olmasından dolayı güç silolanan yemler sınıfına girmektedir (McAllister ve ark. 1997). Bu sebeple protein bakımından zengin fakat karbonhidrat bakımından yetersiz olan silajlık yem bitkilerinin silolanması sırasında fermantasyonun başarılı olması için katkı maddelerinin kullanılması zorunlu hale gelmektedir. Kullanılan katkı maddeleri aynı zamanda silajın bozulmasını önlemek ve yem değerini arttırmak için kullanılabilir. İyi bir silaj yapımı için laktik asit bakterilerinin kullanabilecekleri kolay fermente olabilir karbonhidratların yemde yeterince bulunması gerekir (Uygur 2005).

İklim, bitki çeşidi, bitkinin kimyasal bileşimi ve silolama tekniği gibi birçok faktörün kontrol edilmemesi durumunda fermantasyon olayları arzu edilmeyen bir şekilde gerçekleşebilir. Silolama süresince gerçekleşen fermantasyon olaylarının bir sonucu olarak silajlarda kuru madde (KM), pH, organik asit (asetik, bütrik ve laktik) bileşimi, amonyağa bağlı nitrojen (NH₃-N) miktarı gibi özellikler bakımından gözlenecek değerlerin, silaja ilişkin KM tüketimi ve besleme değerliliği üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Kılıç 1986, Phipps ve Wilkinson 1986, Mc Donald ve ark. 1988).

Süt sığırlarının beslenmesinde önemli bir yer tutan silajların kalitesini arttırmak, bozulmadan kaynaklanabilecek kayıpları en aza indirmek ve silaj fermantasyonunu garanti altına almak amacıyla son yıllarda çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Etki mekanizmaları, yapıları ve kullanım amaçlarına göre farklı gruplar altında incelenebilecek olan katkı maddelerini silolanan kitlede arzu edilmeyen mikroorganizma aktivitesini baskı altına alan katkı maddeleri (çeşitli asit ve bunların karışımları, tuz vb.) ve laktik asit aktivitesini destekleyen katkı maddeleri (şeker ve nişasta içeren besin maddeleri, bakteriyel inokulantlar enzimler, mikrobiyal kültürler vb.) olmak üzere iki ana grupta değerlendirmek de mümkündür (Mc Donald ve ark. 1991, Henderson 1992).

İnokulantlar genellikle silolama sırasında karşılaşılan hızlı bir pH düşüşü, suda çözünebilir karbonhidratların (SÇK) laktat salınımı için proteolitik aktivitesi ve çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) uyum yetenekleri ölçülerek seçilmektedir. İnokulantlar bu kriterleri sağlayarak silajda fermantasyonu sürekli olarak geliştirirler ve birçok numunede fermantasyon parametreleri inokulantın temel değerlendirmesi için kullanılır (McAllister ve ark. 1997). Bakteriyel inokulantlar, genel olarak *Lactobasillus plantarum*, *Streptococcus* (*Enterococcus faecium* ve çeşitli *Pediococcus* türlerini tek başlarına veya çeşitli karışımlar halinde bir arada bulunduran ticari ürünlerdir (Filya 2000). Bakteriyel inokulantlardan laktik asit bakterileri (LAB) silaj fermantasyonunda kullanılan en önemli mikroorganizmalardır. Silolama olayında temel olarak kullanılan LAB'ı anaerobik koşullar altında SÇK başta laktik asit olmak üzere organik asitlere dönüştürürler. Bunun sonucunda pH düşer ve su içeriği yüksek materyal bozulmaya neden olan mikroorganizmalardan korunmuş olur (Weinberg ve ark. 1993). Bakteriyel inokulantların bir diğer yoğun kullanılma sebebi de güvenli, kullanımı kolay, tarım makinaları açısından korozif etkisi olmayan, çevreyi kirletmeyen doğal ürünler olmasıdır (Özdüven ve ark. 2009).

LAB kullanılan birçok çalışmada üretimi yapılan silajların pH değerini düşürdüğü laktik asidin rumende fermantasyonunu arttırdığını, asetik asit, bütirik asit, amonyağa bağlı nitrojen ve etanol düzeyini azalttığı saptanmıştır (Weinberg ve ark. 1993; Stokes ve Chen 1994). Böylece inokulantlar silaj nitrojeninin mikrobiyal protein haline geçen kısmını arttırarak, rumendeki mikrobiyal büyümeyi teşvik ederler (Filya 2000). LAB, hücre duvarı parçalayan enzimlerle birleştiğinde diğer katkı maddelerine nazaran fermente şekerler daha fazla laktik asit salgılatırlar (Özdüven ve ark. 2009). LAB inokulantlarının silaj fermantasyonunu geliştirmenin yanında ruminantların süt verimini, canlı ağırlık artışını ve yemin değerlendirilme etkenliğinde de gelişme sağladıkları bildirilmektedir (Moran ve ark. 1996,

Kleinmans ve Hooper 1999, Muck 1993, Kung ve ark. 1993). Bunun yanı sıra LAB inokulantların silajların aerobik dayanıklılığı (silo ömrü) üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırma sonuçlarında, bazı araştırmacılar LAB inokulantların silajların aerobik dayanıklılıklarını arttırdığını bildirirken (Weinberg ve ark. 1993, Meeske ve Basson 1998), bazı araştırmacılar ise etkilemediğini (Moran ve ark. 1996) veya aerobik dayanıklılığı düşürerek, silajlarda gözle görülür bir küflenme ve yoğun karbondioksit gazı üretimine neden olduklarını bildirmişlerdir (Stokes ve Chen 1994, Meeske ve Basson 1998, Filya 2002b, Polat ve ark. 2005).

Ticari inokulantlara alternatif olarak son zamanlarda PJF (Previously Fermented Juice) olarak adlandırılan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı silaj katkı maddesi olarak kolay hazırlanabilir, ekonomik etkili olarak kullanılmaya başlanmıştır (Ohshima ve ark. 1997, Cao ve ark. 2002, Wang ve ark. 2009). Silaj katkı maddesi olarak eklenen PJF'nin yonca silajlarının laktik asit üretimin artırarak silaj kalitesini yükselttiği görülmüştür (Ohshima ve ark. 1997, Cao ve ark. 2002, Wang ve ark. 2009). Bazı durumlarda ticari inokulantların etkisiz olduğu durumlarda bile PJF'nin silaj pH'sını düşürmek suretiyle laktik asit ve *in vitro* düzeyini artırıp, amonyağa bağlı nitrojen ve bütrik asit düzeyini düşürdüğü yönünde çalışmalarda bulunmaktadır (Nishino 1999, Wang ve ark. 2009).

Bu çalışmada, melas ile hazırlanmış PJF'nin, homofermantatif ve heterofermantatif olan iki ticari inokulant katkı maddesi olarak yonca balya silajlarının ilave edilmiştir. İlave edilen katkı maddelerinin silaj kalitesi ve aerobik stabilite üzerine etkilerinin saha koşullarında incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca silajlardaki LAB izole edilerek laktik asit bakterilerinin identifikasyonu (tanımlaması) yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik, Fizyolojik ve Taksonomik Özellikleri

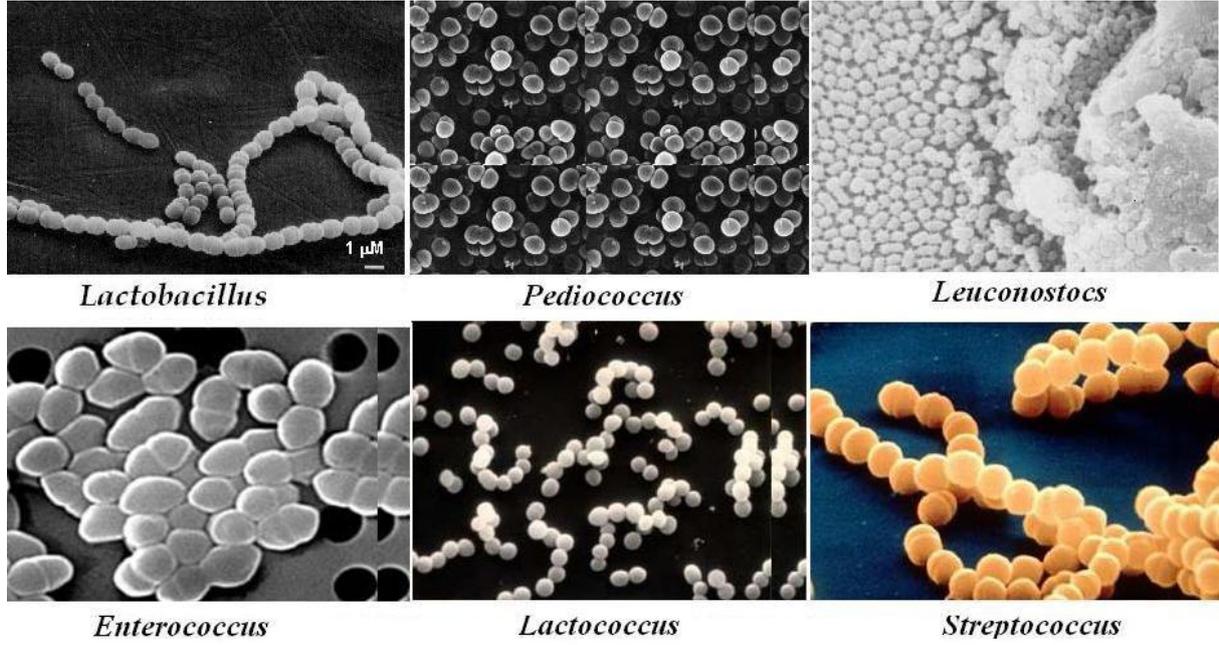
Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, doğada çok yaygın olarak bulunduğu bilinen LAB ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermantasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler LAB olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda *Lactobacillaceae* familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa ve uzun çubuk veya kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellikler göstermektedirler. Tüm üyeler; gram pozitif, katalaz negatif, *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob (oksijenin varlığında ve yokluğunda yaşayabilen), *Pediococcus* cinsi hariç yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, düzgün veya düzensiz çubuk ya da kok şeklindeki bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bu bakteriler mutlak fermentatiftirler ve katalaz ile sitokrom içermeksizin, oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır (Shape ve ark. 1966). Gelişebilmeleri için kompleks besin maddelerine ve vitaminlere gereksinim duyarlar. Laktik asit bakterilerinin ortamda büyümesi ile karbonhidrat miktarı ve bakterinin laktik asit üretimine bağlı olarak ortamın pH' sı düşer. Ortam pH'sını hızlı bir şekilde düşürmesi LAB' nin istenilen ve önemli özelliklerinden birisidir. Laktik asit bakterileri düşük pH' da (3.5–4) canlılıklarını ve büyümelerini sürdürmekte ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki baskılayıcı etkileriyle, kontaminasyonu engellemektedirler (Palalı 2007). Patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri bu antagonistik aktivite; ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriosin veya bakteriosin benzeri ürünler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır (Davidson ve Hoover 1993). Laktik asit bakterileri 5–50°C sıcaklıklar arasında gelişebilmekle birlikte, en iyi aktiviteyi 25–40°C sıcaklıklar arasında göstermektedirler (McDonald ve ark. 1991). Pek çoğu et, süt ile hayvan ve bitki gibi doğal ortamlarda bulunurlar (Daeschel ve ark. 1987). Laktik asit bakterileri gereksinim duydukları enerjiyi sağlamak için daha çok Embden-Meyerhoff-Parnas ile fosfoglukonat/fosfoketolaz glikolik yolunu kullanırlar. Bu yolları izleyerek, pirüvat ve asetil fosfat üretirler. Daha sonra pirüvat, laktat dehidrojenaz ile laktata indirgenir. Asetil fosfat oluşumu ise başlangıç substratına ve redoksa bağlı olarak değişiklik gösterir. Substrat olarak heksoz şekerler fermente edildiğinde asetil fosfat indirgenerek etanol, pentoz şekerler fermente edildiğinde ise asetat oluşur (Pahlow ve ark. 2003). Kluyver ve Donker (1924) LAB' ni glikoz metabolizması sonucunda ürettikleri son ürüne bağlı olarak iki ana gruba ayırmıştır;

1. Mutlak homofermantatif (fakültatif heterofermantatif) LAB: Bu mikroorganizmalar glikolik yolla heksoz şekerleri laktik aside (>%85) fermente ederlerken, pentoz şekerler (ksiloz) ile glukonati fermente edemezler. Bu aşamada da *fosfoglukonat/fosfoketolaz* yolunu kullanamazlar. Bu gruba ait üyeler; *Pediococcus damnosus* ve *Lactobacillus ruminis*' tir (Devriese ve ark. 1992, Hammes ve ark. 1992).

Yalnız bazı özel durumlarda (ortamda yeterli şeker olmadığına) fakültatif ^{het}LAB olarak da isimlendirilen bu grupta yer alan mikroorganizmalar heksoz şekerleri laktik asidin yanı sıra CO₂ ve etanole (ya da asetik aside) fermente ederler. Bu aşamada asetik asit ancak NAD (Nikotinamid Adenin Dinükloit) +['] in ortamda yeniden oluşması ile etanol oluşmaksızın ortaya çıkabilir ya da fruktoz ve/veya moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında oluşabilir. Ayrıca bu organizmalar fosfoketolaz yolunu kullanarak pentoz şekerleri de fermente edebilir ve son ürün olarak laktik ve asetik asit üretebilirler. Bu gruba ait en önemli üye *Lactobacillus plantarum*' dur. Ayrıca *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *Enterococcus faecium*' da bu grupta yer almaktadır (Devriese ve ark. 1992, Hammes ve ark. 1992).

2. Mutlak heterofermantatif LAB: Bu mikroorganizmalarda heksoz şekerleri laktik asidin yanı sıra CO₂ ve etanole ya da uygun elektron alıcısı olduğunda asetik aside, pentoz şekerleri ise sadece laktik ile asetik aside fermente ederler. Bu gruba ait üyeler; *Leuconostoc*, *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* ve bazı *Lactobacillus spp.* türleridir (Holzapfel ve Schillinger 1992, Weiss 1992). Silajlarda LAB' ne ait en yaygın altı üye tespit edilmiştir. Bunlar; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus*' tur.

Laktik asit bakterilerinin diğer üyeleri ise genel olarak farklı ortamlarda meydana gelmekte (örneğin *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* ve *Sporolactobacillus*) ve morfolojik olarak *Pediococcus* bağlantılı, küçük alt türleri oluşturmaktadır (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus* ve *Atopobium*). Ancak, bu mikroorganizmalar silaj fermantasyonu açısından önem taşımayan cinsler olarak kabul edilmektedirler (Schleifer ve Ludwig 1995).



Şekil 2.1. Silajlarda yaygın olarak bulunan laktik asit bakteri cinsleri (Anonim 2008b)

2.2. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Gelişimi

Laktik asit bakteri inokulantları ile ilgili ilk çalışmalar 1970' lerin sonu ile 1980' lerin başında başlamıştır. Geçmişteki çalışmalarda bu bakterilerin silaj ortamına adapte edilememesi, düşük dozlarda kullanımı ve canlılıklarını korumada bazı sorunlar yaşanması gibi nedenlerle istenilen başarı sağlanamamıştır. Daha sonraları, teknolojiye sağlanan ilerlemeler ve genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler ile silolama sürecinin daha iyi anlaşılması bu ürünlerin ticarileştirilmesinde çok önemli katkılar sağlamıştır (Kung ve ark. 2003). İlk silaj inokulantları, homofermantatif laktik asit bakteri (^{ho}LAB)' nin sadece bir cinsini içermiştir. Yapılan çalışmalar sonucu *L. plantarum*, silaj inokulantı olarak kullanılabilen en uygun LAB olarak belirlenmiş ve gerek tek başına gerekse karışım halinde, hemen hemen tüm ticari bakteri inokulantlarının içerisinde yer almıştır (McDonald ve ark. 1991). *L. plantarum*, bir bakteri kültürünün içermesi gereken çoğu önemli kriteri içermesine rağmen, silolanan materyalin pH' sı 5' in altına düşene kadar oldukça yavaş laktik asit üretir. Bu nedenle çoğu ticari inokulantlar, *L. plantarum*' un yanı sıra fermantasyon döneminin başlarında pH' nın 5.0–6.5 arasında değiştiği sırada aktif olabilecek *Pediococcus* ve/veya *Enterococcus* cinsi bakteri gruplarını da içerirler (Filya 2001).

Laktik asit bakterilerinin silaj inokulantı olarak kullanılabilmeleri için sahip olmaları gereken kriterler ilk kez Whittenbury (1961) ile Wieringa ve Beck (1964) tarafından ortaya konmuştur. Bu kriterlere göre, silajlarda kullanılacak LAB' nin silajdaki baskın

mikroorganizma faaliyetini artırmaları, homofermantatif nitelikte olmaları, asit ortama tolerans göstermeleri, ortam pH' sını hızla düşürmeleri, çözünebilir karbonhidratları fermente edebilmeleri, organik asitler üzerinde etkili olmamaları, proteolitik etkinlik göstermemeleri ve değişik sıcaklık aralıklarında gelişmeleri gereklidir. Bazı bakteriler bu kriterleri sağlamamasına rağmen silaj inokulantı olarak kullanılmışlardır.

Bunlardan *Propionibacteria* ve *L. buchneri* heterofermantatif nitelikteki LAB olmalarına karşın, aerobik stabilitenin geliştirilmesi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı silaj inokulantı olarak önem kazanmışlardır. Özellikle *L. buchneri*' nin ticari kullanımı, 1995 yılında tanımlanması ve Muck (1996) tarafından yürütülen çalışmalarda kullanılmasını takiben 2001 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmasından sonra yaygınlaşmıştır.

2.3. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silaj Fermantasyonu Üzerine Etkileri

Silaj fermantasyonu; kontrollü şartların kullanıldığı diğer ticari fermantasyon işlemlerinden farklı olarak, kontrolsüz bir fermantasyon işlemidir. Ayrıca silajlık materyalin kimyasal kompozisyonu değişkendir ve bu da silaj kalitesi üzerinde etkilidir (McDonald ve ark. 1991). Dolayısıyla LAB inokulantları; silajlarda fermantasyonu garanti altına almak, silaj kalitesini artırmak ve silajın daha iyi korunmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Laktik asit bakteri inokulantlarının mısır silajının fermantasyon özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Homofermantatif LAB inokulantları silajlarda SÇK'ların etkin kullanılmasını sağlayarak; ortam pH' sını, asetik asit, bütrik asit, NH₃-N ve etanol konsantrasyonlarını düşürür. Bunun yanı sıra laktik asit ve laktik : asetik asit oranını artırarak, yüksek düzeyde enerji ve KM geri kazanımı sağlar (Woolford 1984, McDonald ve ark. 1991). Bu konuda 1990-1995 yılları arasında yapılan ve ^{ho}LAB inokulantlarının silaj fermantasyonu üzerindeki etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmaların % 60' ında silajların laktik:asetik asit oranını artırdıkları (n= 233), % 55' inde pH (n= 221) ve NH₃-N (n= 148) konsantrasyonlarını ise düşürdükleri tespit edilmiştir (Muck ve Kung 1997). Davies (1996) *L. plantarum* MTD1' in silolamanın 100. günündeki mısır silajının pH' sını (3.6), asetik asit (18.3 g/kg KM) ve NH₃-N (% 6.4) konsantrasyonlarını kontrol grubuna göre (pH, 4.3; asetik asit, 20.3 g/kg KM; NH₃-N, %8.2) önemli düzeyde düşürdüğünü, laktik asit konsantrasyonunu ise (53 g/kg KM) kontrol grubuna göre (48.8 g/kg KM) önemli düzeyde artırdığını belirlemiştir (P<0.05). Aynı araştırmacı, *L. plantarum* MTD1' in mısır silajında protein geri kazanımı sağladığını belirterek, ham protein (HP) içeriğini kontrol grubu ve *L. plantarum* MTD1 kullanılan silajlarda sırasıyla 93.2 ve 101.6 g/kg KM olarak saptamıştır

($P < 0.05$). Shayan ve ark. (1996) *L. plantarum*+*E. faecium* kullandığı mısır silajının laktik ve asetik asit konsantrasyonunu sırasıyla 16.4 ve 4.6 g/kg KM olduğunu belirlerken, aynı parametreleri kontrol silajında sırasıyla 13.7 ve 8.3 g/kg KM olarak saptamıştır. Aynı araştırmacılar, *L. plantarum*+*E. faecium*' un (% 63.3) mısır silajının HP fraksiyonundaki gerçek protein değerini kontrol grubuna (% 47.0) göre önemli düzeyde artırdığını tespit etmişlerdir ($P < 0.05$). Bunun nedenini kontrol grubundaki proteolitik bakterilerin yüksek metabolik aktivite göstermesine bağlamışlardır. Filya (2002a) başlangıç pH' sı 5.8 olan mısır bitkisinde (% 35.0 KM) *L. plantarum*+*E. faecium* kullanmış ve silolamanın 50. gününde açtığı silajların pH' sını kontrol ve inokulant kullanılan gruplarda sırasıyla 3.6 ve 3.5; başlangıç materyalinde 0.8 olan laktik asidi % 4.3 ve 9.4; başlangıç materyalinde hiç bulunmayan asetik asidi % 4.3 ve 0; bütrik asidi % 4.2 ve 0; etanolü ise % 7.3 ve 2.2 olarak saptamıştır. Benzer sonuçlar Johnson ve ark. (2003) ile Kim ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir. Ayrıca bu araştırmalarda *L. plantarum*' un mısır silajının HP içeriğini ve KM geri kazanımını artırdığı da belirlenmiş olup, KM geri kazanımı kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla % 91.4 ve 95.4 olarak saptanmıştır.

Araştırmacılar bu bulguların, tüm silajların hızlı ve tam olarak fermente olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Filya ve ark. (2006) mısır bitkisinde (%35.5 KM) *L. plantarum* ile *L. plantarum*+*Pediococcus cerevisiae* kullanmışlar ve silolamanın 50. gününde mısır silajının laktik asit konsantrasyonunu kontrol, *L. plantarum* ve *L. plantarum*+*Pediococcus cerevisiae* gruplarında sırasıyla 55.7, 86.6 ve 87.9 g/kg KM; $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu 2.76, 1.71 ve 1.77 g/kg KM; SÇK' ları 21.6, 13.6 ve 14.4 g/kg KM olarak saptamışlardır. Bu çalışmalardan farklı olarak Weinberg ve ark. (2007) ise *L. plantarum* MTD1 (29 g/kg KM), *P. pentosaceus* A (35 g/kg KM) ve *E. faecium* Q' nun (37 g/kg KM) mısır silajının laktik asit konsantrasyonunu kontrol grubuna (39 g/kg KM) göre düşürdüğünü; *E. faecium* C' nin (39 g/kg KM) ise etkilemediğini belirlemişlerdir. Bazı ^{ho}LAB inokulantlarının (13–30 g/kg KM) ise beklenmedik bir şekilde mısır silajının asetik asit konsantrasyonunu kontrol grubuna (11 g/kg KM) göre önemli düzeyde artırdığını da saptamışlardır ($P < 0.05$). Homofermantatif LAB inokulantlarının mısır silajlarının fermantasyon özelliklerini geliştirdiği bilinmekle birlikte, yapılan çalışmalarda bu inokulantların silaj fermantasyonunu etkilemediği de belirlenmiştir (Meeske ve Basson 1998, Ranjit ve Kung 2000). Araştırmacılar bunun nedenini, mısırın silolanabilme özelliğinin iyi olması ve fermantasyon için yeterli düzeyde epifitik LAB popülasyonunu içermesi ile açıklamışlardır. Bolsen ve ark. (1992) *L. plantarum*+*E. faecium*' un mısır silajının fermantasyon özelliklerini etkilemediğini belirterek, silolamanın 120.

gününde açtıkları tüm silajların pH'larını 4.14 olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, silajların laktik asit konsantrasyonunu kontrol ve inokulant gruplarında sırasıyla % 2.67 ve 2.88; asetik asit konsantrasyonunu % 0.87 ve 0.89; etanol konsantrasyonunu % 0.15 ve 0.21; NH₃-N konsantrasyonunu tüm silajlarda % 0.09 olarak belirlemişlerdir. Ranjit ve Kung (2000) *L. plantarum* 30115 kullandıkları mısır silajının pH' sını, laktik ve asetik asit konsantrasyonlarını sırasıyla 3.68, % 7.24 ve % 1.68 olarak belirlerlerken, aynı parametrelerin kontrol grubunda sırasıyla 3.66, % 7.72 ve % 1.82 olduğunu saptamışlardır. Weinberg ve ark. (2002) başlangıç pH' sı 5.7 olan mısır bitkisinde *L. plantarum*' un etkisini 50 L' lik plastik silolarda incelemişler ve silolamanın 90. gününde tüm silajların pH' sını 3.8 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar mısır silajında laktik asidin kontrol ve inokulant kullanılan gruplarda sırasıyla 25 ve 26 g/kg KM; asetik asidin 10 ve 9 g/kg KM; gaz kayıplarının % 1.7 ve 1.5 olduğunu saptamışlardır. Heterofermantatif LAB inokulantlarının genel olarak silaj fermantasyonunu etkilemediği bildirilmekle birlikte (Ranjit ve Kung 2000, Holzer ve ark. 2003), yapılan bazı çalışmalarda bu inokulantların mısır silajının pH' sını, asetik asit konsantrasyonunu ve KM kaybını artırdıkları, laktik asit konsantrasyonunu ise düşürdükleri belirlenmiştir (Nishino ve ark. 2003, Kleinschmit ve ark. 2005). Driehuis ve ark. (1999) 3 aylık silolama süresi sonunda *L. buchneri*' nin, mısır silajının asetik asit ve 1-propanol konsantrasyonları ile KM kaybını artırdığını, laktik asit konsantrasyonunu ise düşürdüğünü saptamışlardır. Ranjit ve Kung (2000) *L. buchneri* (10⁶ cfu/g) kullandığı mısır silajının laktik ve asetik asit konsantrasyonlarını sırasıyla % 7.72 ve 1.88 olarak belirlerken, aynı parametreleri kontrol grubunda sırasıyla % 6.35 ve 3.60 olarak saptamışlardır. Nishino ve ark. (2003) fermantasyonun tüm dönemlerinde (10. ve 60. gün) *L. buchneri*' nin mısır silajının asetik asit (% 5.27) konsantrasyonunu kontrol grubuna (% 2.04) göre artırdığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar adı geçen inokulantın mısır silajının laktik asit (% 3.73) ve etanol konsantrasyonlarını (%0.65) kontrol grubuna göre (sırasıyla % 6.11, 1.68) düşürdüğünü bildirmişler ve aynı inokulantın KM kaybına neden olduğunu belirterek, fermantasyonun 60. gününde KM kaybını kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla % 4.21 ve 8.08 olarak saptamışlardır. Kleinschmit ve ark. (2005) süt olum döneminde (% 25.5 KM) hasat ettikleri mısır bitkisinde *L. buchneri* 40788 (4x10⁵ cfu/g) ve *L. buchneri* 11A44 (10⁵ cfu/g) içeren iki farklı inokulant kullanmışlardır. Araştırmacılar, silolamanın 122. gününde mısır silajının pH' sını kontrol ve inokulant kullanılan gruplarda (*L. buchneri* 40788 ve *L. buchneri* 11A44) sırasıyla 3.44, 3.50 ve 3.52; laktik asit konsantrasyonunu % 8.21, 7.73 ve 7.70; asetik asit konsantrasyonunu % 2.19, 2.83 ve 2.47; etanol konsantrasyonunu ise % 2.76,

3.09 ve 3.40 olarak saptamışlardır. Filya ve ark. (2006) iki farklı gelişme döneminde (% 29 ve 35.5 KM) hasat ettikleri mısır bitkisinde *L. buchneri* (106 cfu/g) kullanmışlardır. Araştırmacılar, *L. buchneri*' nin mısır silajının SÇK içeriğini ve NH₃-N konsantrasyonunu etkilemediğini (P>0.05), aynı inokulantın silajların pH, asetik asit ve etanol konsantrasyonları ile gaz kaybını artırdığını, laktik asit konsantrasyonunu ise kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşürdüğünü bildirmişlerdir (P<0.05). Kleinschmit ve Kung (2006a) *L. buchneri*' nin kullanıldığı 43 araştırmanın sonucunu meta-analiz yöntemi kullanılarak değerlendirmişler ve araştırmada uygulamaları kontrol ve *L. buchneri*' nin ($\leq 10^5$ ve $>10^5$ cfu/g taze materyal) iki farklı dozu olmak üzere üç farklı kategoride toplamışlardır. Sonuçta, *L. buchneri*' nin ($\leq 10^5$ ve $>10^5$ cfu/g) mısır silajının laktik asit konsantrasyonunu (sırasıyla % 5.87 ve 4.79) kontrol grubuna (% 6.59) göre düşürdüğünü, ortam pH' sını (sırasıyla % 3.75 ve 3.88) ve asetik asit konsantrasyonunu (sırasıyla % 2.63 ve 3.89) ise kontrol grubuna (% 2.18) göre önemli düzeyde artırdığını saptamışlardır (P<0.01). Bununla birlikte *L. buchneri*' nin KM geri kazanımında düşüşe neden olduğunu, en önemli düşüşün ise *L. buchneri*' nin yüksek dozunda ($>10^5$ cfu/g) gerçekleştiğini bildirmişler ve silajların KM geri kazanımını kontrol, $\leq 10^5$ ve $>10^5$ cfu/g gruplarında sırasıyla % 95.5, 95.5 ve 94.5 olarak saptamışlardır. Weinberg ve ark. (2007) kontrol ve *L. buchneri* içeren mısır silajının laktik asit konsantrasyonunu sırasıyla 39 ve 36 g/kg KM; asetik asit konsantrasyonunu 11 ve 29 g/kg KM; etanol konsantrasyonunu 1 ve 4 g/kg KM olarak belirlemişlerdir. Kung ve ark. (2007) yürüttükleri iki farklı denemeden birincisinde *L. buchneri*' nin mısır silajının laktik asit konsantrasyonunu (% 0.60) kontrol grubuna (% 0.73) göre önemsiz düzeyde düşürdüğünü (P>0.05), asetik asit (% 0.71), etanol (% 0.52) ve NH₃-N (% 0.032) konsantrasyonlarını ise kontrol grubuna göre sırasıyla % 0.23, 0.36 ve 0.021 önemli düzeyde artırdığını tespit etmişlerdir (P<0.05). Aynı araştırmacılar, KM içeriği düşük mısır için en uygun *L. buchneri* dozunu 6×10^5 (cfu/g taze materyal) olarak belirlemişler ve yürüttükleri ikinci denemede bu inokulasyon dozundan daha düşük (4×10^5 cfu/g taze materyal) ya da yüksek (8×10^5 cfu/g taze materyal) uygulamalar arasındaki farklılıkları incelemişlerdir. Deneme sonunda, inokulasyon düzeyindeki artışın silajların KM ve HP içeriklerinde doğrusal bir azalmaya neden olduğunu gözlemişlerdir. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu araştırmalarında, *L. buchneri*' nin mısır silajının pH' sını (4.81, P=0.09) ve SÇK' ları (%0.07, P=0.09) kontrol grubuna göre (sırasıyla 4.91 ve % 0.14) önemli düzeyde düşürdüğünü, laktik (% 0.17, P=0.06) ve propiyonik asit konsantrasyonlarını ise (% 0.11, P=0.10) kontrol grubuna göre (sırasıyla % 0.14 ve 0) önemli düzeyde artırdığını da belirlemişlerdir. *Lactobacillus buchneri*' nin propiyonik asit üretmediğini bildiren araştırmacılar,

söz konusu artışın sebebini *L. buchneri*'nin fermantasyon ürünü olan 1,2–propanediol' ün başka mikroorganizmalar tarafından propiyonik aside dönüştürülmesi olarak göstermişlerdir.

2.4. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkileri

Silaj kalitesinin, bitkinin içerdiği başlangıç epifitik LAB'nin büyüklüğünden, varyete ve aktivitelerinden etkilendiği bilinmektedir (McDonald ve ark. 1991, Cai ve ark. 1998). Seale ve ark. (1990) bitkide bulunan, bakteriyal ve fungal populasyonların taksonomik kompozisyonunu standart yöntemler kullanarak belirlemişlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Silolama dönemine kadar bitkide bulunan bakteriyal ve fungal populasyonlar ile miktarları (cfu/g)

Bakteriyal ve fungal populasyonlar	Miktar
Toplam aerobik bakteri	>10 000 000
Laktik asit bakteri	10-1 000 000
Enterobacteria	1 000-1 000 000
Maya ve maya benzeri mantar	1 000-100 000
Küf	1 000-10 000
Clostridia (endosporlar)	100-1 000
Bacilli (endosporlar)	100-1 000
Asetik asit bakteri	100-1 000
Propiyonik asit bakteri	10-100

Epifitik mikrobiyal floranın en önemli üyesi LAB' dir. Bitkideki sayıları geniş sınırlar içerisinde değişim göstermekle birlikte, yoncada 10^5 cfu/g, çimde 10^6 cfu/g, mısır ve sorgumda 10^7 cfu/g düzeyinde bulunmaktadırlar. Söz konusu bakteri grubu mevsim değişikliklerinden etkilenmekte ve sayıları kış aylarında azalır, yaz aylarında artmaktadır. Ayrıca hasat zamanı da bitkinin içerdiği LAB populasyonunu etkilemektedir. Nitekim yoncada LAB populasyonunun 2. ya da 3. biçimde arttığı, mısırın erkenci çeşitlerinin de daha fazla LAB içerdiği bildirilmektedir (Lin ve ark. 1992). Canlı bitki üzerindeki epifitik LAB populasyonu düşük olmasına rağmen, bu bakteriler parçalanma sürecinden de etkilenmektedir. Woolford ve Pahlow (1998) bu olguyu “parçalama inokulasyonu (chopper inoculation)” olarak tanımlamaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin hasattan hemen sonraki sayılarının, hasat edilmeden önceki sayılarına göre 100 kat, hatta bazen daha fazla arttığı da bildirilmektedir (Pahlow 1991). Epifitik mikrofloranın diğer önemli üyesi *Enterobacteria*' dir. Bu grup üyeleri nitratları indirgeyip, nitrit ve nitrojen oksit gazlarını oluşturmaktadır (Pahlow ve ark. 2003). *Enterobacteria*' nin diğer üyelerinden *Clostridia* ve *Bacilli* ise bitki üzerinde nadir bulursa da toprak kontaminasyonu ile sayıları artmaktadır. Ayrıca *Bacilli* diğer aerob

bakteriler gibi aerobik bozulma üzerinde de etkili olmaktadır. Çoğu zaman, parçalanmamış bitkide hatta silaj yapıldıktan sonra da aynı bakteriyel gruplardan mayaların varlığı da tespit edilmiştir (kuvvetli aerob olanlar hariç). Tarla üzerindeki üründe çok sayıda maya varyetesine rastlanırken, silajda sınırlı sayıda gelişim gösterdikleri kaydedilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda bilinen varyetelere ilave olan *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Geotrichum* ve *Saccharomyces*' ler ile bunlardan daha sonra tanımlanan *Debaromyces*, *Trichosporon* ve *Guilliermondella*' nın fermantasyonun ilerleyen safhalarında dominant hale geldiği, genellikle aerobik koşullarda gelişebildiği ve toplam mikrofloranın %10'undan az bir kısmını oluşturduğu belirlenmiştir (Middelhoven ve van Baalen 1988, Woolford 1990). Aynı durum küfler içinde geçerlidir. Flamentöz mantarlar bütün karma mikrobiyal populasyonlarda olduğu gibi, bazı türleri düşük pH' da ve oksijen varlığında da gelişebilmekte, yüksek CO₂ ile organik asit konsantrasyonuna diğerlerinden daha iyi adapte olabilmektedirler. Bu nedenle, Pelhate (1977) küflerin aerobik, tolerant (toleranslı) ve mikroaerofilik türler olmak üzere üç ekolojik kategoriye ayrılmasını önermiştir. Araştırmacı, silaj ortamında *Byssochlamys nivea*, *Monascus ruber* veya *Penicillium roqueforti* gibi sadece depolamanın son aşamalarına doğru siloya oksijen girmesiyle ile dominant hale gelebilecek tolerant küf türlerine rastlamıştır. Bu grupların dışında daha az öneme sahip olan asetik ve propiyonik asit bakteri de epifitik mikrofloranın üyelerindedir. Asetik asit bakterileri daha çok mısır silajında olmak üzere, aerobik bozulmaya sebep olan bakteri türüdür (Spoelstra ve ark. 1988). Propiyonik asit bakterileri ise silaj fermantasyonu ve saklama dönemlerinde bozulmadan sorumlu bakteri grubunu oluşturmaktadır (Pahlow ve Honig 1994). Sonuç olarak; silaj fermantasyonundaki temel prensip, silaj ortamında yeterli sayıdaki LAB' nin gelişmelerini sağlamak ve istenmeyen epifitik mikroorganizmalar ile bitkide bulunan endojen katabolik enzimlerin aktivitelerini engellemektir (McDonald ve ark. 1991). Çünkü silolanan bir materyal LAB' nin ürettiği laktik asit tarafından korunur (McDonald ve ark. 1991, Filya 2001). Ancak bitkiler istenen (LAB) ve istenmeyen mikroorganizma populasyonlarının (*Enterobacteria*, maya ve küfler, *Clostridia*, *Bacillus* türleri, asetik ve propiyonik asit bakterileri) her ikisini de içermektedir. Silajlık materyalin ya da silo ortamının uygun olmaması durumunda *Enterobacteria*, *Clostridia* ve *Bacilli* sporları ile maya ve küfler fermantasyona katılır. Bu mikroorganizmalar bitkideki fermente olabilir karbonhidratları kullanabilmek için LAB' i ile rekabete girerler. Silaj ortamında bu tür mikroorganizmaların baskın gelmeleri durumunda, fermantasyon istenmeyen yönde ilerler ve silaj kalitesini düşüren bazı ürünler (bütrik asit, NH₃-N ve etanol vb) açığa çıkar (Woolford 1984). Ayrıca silolanacak materyalin başlangıç

epifitik LAB popülasyonu genellikle düşüktür ve bu bakterilerin büyük çoğunluğunu ^{het}LAB'i oluşturur (Cai ve ark. 1998). Dolayısıyla LAB inokulantlarının kullanım amacı, silaj ortamında LAB popülasyonunu artırarak laktik asit üretimini teşvik etmek ve ortam pH' sının hızla düşmesini sağlamaktır. Böylece *Enterobacteria*, maya ve küfler, *Clostridia*, *Bacillus* türleri, asetik ve propiyonik asit bakterileri gibi silaj fermantasyonu açısından istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenerek, silajların besleme değerleri korunmaktadır (Bolsen ve ark. 1992). Laktik asit bakteri inokulantlarının silajların mikrobiyal yapıları üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırmalardan değişik sonuçlar alınmıştır. Homofermantatif LAB inokulantlarının mısır silajının *Lactobacilli* popülasyonunu genellikle artırdığı (Muck 1993, Weinberg ve ark. 1993, Filya 2001), maya ve küf popülasyonunu bazen düşürdüğü (Filya 2002a), bazen etkilemediği (Filya 2002a, b), bazen ise artırdığı bildirilmektedir (Weinberg ve ark. 1993, Kleinschmit ve ark. 2005). Diğer yandan bu inokulantların *Enterobacteria* ve *Clostridia* gelişimini önemli düzeyde engellediği de belirtilmektedir (Filya 2002a, b). Weinberg ve ark. (1993) *L. plantarum*+*E. faecium* kullandıkları çalışmalarında, mısır silajının *Lactobacilli* popülasyonunu kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla 4.0 ve 5.5 cfu/g; maya popülasyonunu 4.7 ve 5.4 cfu/g; küf popülasyonunu ise 0 ve 5.0 cfu/g olarak belirlemişlerdir. Davies (1996) *L. plantarum*' un mısır silajının maya ve küf popülasyonunu düşürdüğünü belirterek, silolamanın 100. gününde kontrol silajının maya ve küf içeriğini sırasıyla 3.11 ve 2 cfu/g, aynı mikrobiyal yapıyı *L. plantarum* kullanılan silajlarda sırasıyla 1.26 ve 0 cfu/g olarak saptamıştır. Filya (2003) taze mısırın *Lactobacilli*, maya ve küf popülasyonunu sırasıyla 3.86, 4.06 ve 2.58 cfu/g olarak belirlemiş ve fermantasyonun 2. gününden itibaren söz konusu mikroorganizmaların artış gösterdiğini, fermantasyonun 90. gününde en yüksek değerlerine ulaştığını tespit etmiştir. Araştırmacı, *L. plantarum*' un mısır silajının *Lactobacilli* (10.40 cfu/g) ve maya popülasyonunu (4.45 cfu/g) artırdığını, küf popülasyonunu ise (3.08 cfu/g) kontrol silajına göre (sırasıyla 8.35, 3.86 ve 3.26 cfu/g) düşürdüğünü belirlemiştir. Heterofermantatif LAB inokulantları mısır silajının asetik asit konsantrasyonunu artırmakta, asetik asit ise maya ve küflerin gelişmesini büyük ölçüde engellemektedir (Holzer ve ark. 2003, Kleinschmit ve ark. 2005). Taylor ve Kung (2002) silolamanın 92. gününde mısır silajının, maya popülasyonunu kontrol ve *L. buchneri* (10⁶) kullanılan silajlarda sırasıyla 3.25 ve 2.56 cfu/g olarak saptamışlar ve bu silajlarda hiç küf oluşmadığını bildirmişlerdir. Kleinschmit ve ark. (2005) *L. buchneri* 40788 (3.70 cfu/g) ve *L. buchneri* 11A44' ün (<2.00 cfu/g) mısır silajının maya popülasyonunu kontrol silajına (4.43 cfu/g) göre düşürdüğünü belirlemişlerdir. Kung ve ark. (2007) taze

mısırın LAB, maya ve küf popülasyonunu sırasıyla 4.64, 3.52 ve 3.34 cfu/g olarak saptadıkları araştırmalarında, *L. buchneri*'nin (8×10^5 cfu/g taze materyal) mısır silajının LAB popülasyonunu arttırdığını, maya ve küf popülasyonunu ise düşürdüğünü belirlemişler ve silolamanın 120. gününde silajların LAB popülasyonunu kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla 7.47 ve 8.7 cfu/g; maya popülasyonunu 7.29 ve 5.85 cfu/g; küf popülasyonunu ise 6.05 ve 4.88 cfu/g olarak saptamışlardır. Weinberg ve ark. (2007) *L. buchneri* 40788' in mısır silajının LAB popülasyonunu (3.5 cfu/g) düşürdüğünü, *L. buchneri* 11A44'ün ise LAB popülasyonunu (5.3 cfu/g) kontrol silajına (4.2 cfu/g) göre arttırdığını belirlemişlerdir.

2.5. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Hücre Duvarı Bileşenleri Üzerine Etkileri

Homofermantatif LAB inokulantlarının silajların hücre duvarı bileşenleri (sellüloz, hemisellüloz, lignin) üzerinde etkisi ya hiç yoktur ya da bu etki çok düşüktür (Kung ve Muck 1997). Bu inokulantların hücre duvarını oluşturan polisakkaritler üzerindeki etkileri (özellikle hemisellülozun asit hidrolizi) dolaylıdır ve ortam pH' sını hızla düşürmeleri ile hidrojen iyonlarındaki artış bu etkiyi yaratır (Rook ve Hatfield 2003). Muck (1993) LAB inokulantlarının, pH' yı hızla düşürerek, hücre duvarı fraksiyonlarını açtığını ve hemisellülozun hidrolizini sağlayan ek bir asit ürettiğini bildirmiştir. Ranjit ve Kung (2000) tarafından yürütülen bir araştırmada da, bu görüşü destekler nitelikte sonuçlar alınmış ve *L. plantarum* 30115' in (^{ho}LAB) mısır silajının nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF) içeriğini önemli düzeyde düşürdüğü ($P < 0.05$), ancak gözlenen bu azalmanın asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) içeriğinde önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P > 0.05$). Aynı araştırmacılar, taze mısırın NDF ve ADF içeriğinin sırasıyla % 48.8 ve 26.7 olduğunu belirlemişler ve mısır silajının NDF içeriğini kontrol ve inokulant gruplarında sırasıyla % 46.2 ve 43.0, ADF içeriğini ise % 26.5 ve 24.6 olarak saptamışlardır. Diğer yandan LAB inokulantlarının hücre duvarı bileşenlerini etkilemediğini gösteren çalışmalara da rastlanmıştır (Kung ve ark. 1993, Filya 2002a, Kleinschmit ve ark. 2005, Kleinschmit ve Kung 2006b). Genel olarak, LAB' nin hücre duvarını oluşturan polisakkaritleri fermente edebilme yetenekleri yoktur. Bu bakteriler sadece basit şekerler ile çok az sayıda disakkaritleri (sukroz ve maltoz) metabolize edebilirler. Silaj fermentasyonu açısından yapısal karbonhidratlardan yararlanma ancak hidrolitik aktiviteyle mümkün olabilir. Bitkiler hücre duvarı hidrolitik enzimlerini üretmelerine karşın, bu enzimlerin yapısal karbonhidratlar üzerindeki etkileri, spesifik organ ve dokular tarafından kısıtlanmaktadır. Bitki bünyesinde bulunan doğal hidrolazlar, hücre duvarını

genişletilebilmekte veya çok düşük oranlarda hücre duvarı kapsamını azaltabilmektedirler (Fry 1985, Carpita 1997). Laktik asit bakterilerinin hücre duvarını oluşturan polisakkaritleri paralayamadıkları bilinmekle birlikte son yıllarda *L. buchneri*, *L. reuteri*, *L. crispatus* ve *L. brevis* gibi bazı özel ^{het}LAB suşlarının ferulate esteraz ürettiği kaydedilmiştir. Ferulate esterazın hücre duvarı kapsamını azaltabildiği, bu sayede silaj bünyesindeki çözünebilir karbonhidratların miktarının arttığı ve çözünebilir karbonhidratlardaki bu artışın ise silaj fermentasyonunda kullanılabilecek ilave substrat sağladığı bildirilmektedir. Ancak ileri sürülen bu yeni yaklaşımın desteklenmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği de ifade edilmektedir (Nsereko ve ark. 2008). Diğer yandan hemiselllozların asit hidrolizi yavaş seyreden bir kimyasal parçalanmadır. Doğal silaj fermentasyonunda NDF içeriğindeki azalmanın % 0.5' ten bile düşük seviyelerde gerçekleştiği bildirilmektedir (Muck 1996). Őayet silolanacak bitki sınırlı düzeyde SK içeriyorsa, yapısal karbonhidratların LAB tarafından fermente edilebilir forma dnştrlebilmeleri için yüksek hidrolitik aktivite gereklidir. Bu da ancak, ticari enzim preparatlarının kullanımı ile gerçekleştirilebilir. Ayrıca polisakkaritlerin hücre matriksindeki kompleks yapılarından dolayı LAB' nin kullanılabileceği monosakkarit formuna dnştrlebilmeleri için tek bir enzim katılmasının da yeterli olmayacağı bildirilmektedir (Rook ve Hatfield 2003). Enzim kullanımının ekonomik olmadığı durumlarda *L. amylovorus* elde edilen *-amilaz* geninin ya da rumendeki fungusların fibrolitik enzimlerini (sellülaz, ksilanaz vb.) kodlayan genlerden birinin *L. plantarum'* a klonlanmasıyla elde edilen modifiye organizmalardan da yararlanmanın mümkün olabileceği belirtilmektedir (Fitzsimons ve ark. 1994, Kung ve ark. 2003). Yapılan çalışmalarda, bu organizmaların genellikle baklagiller ile ılıman iklim ayır otu silajlarında, kullanılabılır karbonhidrat içeriğini basit Şekerler ve sukroz yönünden artırmak suretiyle, silaj fermentasyonunda yarar sağladığını göstermektedir (Fitzsimons ve ark. 1994).

İnokulant etkisi dışında da, silolama sresinin uzamasına bağlı olarak, süre gelen asidik koşullar silajların hücre duvarı fraksiyonlarını azaltabilmektedir (Muck 1996). Jones ve ark. (1992) baklagil ve ayır otu silajlarında yürüttükleri çalışmalarında, silolama sresinin uzamasına bağlı olarak, silajların pektik ve hemiselllotik fraksiyonlarında önemli sayılabilecek bir azalmanın meydana geldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar, söz konusu değişimin arabinozal kalıntılar biçimde gerçekleştiğini belirterek, arabinozal dalların furanoz formda bulduklarını ve bu dalların zayıf asitlere bile açık olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silajların Aerobik Stabiliteleri zerine Etkileri

Aerobik stabilite (silo ömrü), açılan bir silajın ısınmadan ve bozulmadan kaldığı sürenin uzunluğudur (Kung 1998). Aerobik bozulma kompleks bir süreç olup, silolanan ürünün mikrobiyal bileşimi, fermantasyon özellikleri, silaj kütesinin sıcaklığı ve silaj yoğunluğu oluşabilecek kayıpları etkilemektedir (Ohyama ve ark. 1975). Aerobik bozulma üzerinde etkili olan mikroorganizmaların başında maya ve küfler gelmektedir (McDonald ve ark. 1991). Bu mikroorganizmalar silajdaki şekerleri ve laktik asit gibi fermantasyon ürünlerini tüketerek, büyük miktarlarda KM ve besin maddeleri (vitamin, protein ve karbonhidrat) kaybına neden olurlar. Aynı zamanda silajın lezzetini azaltarak yem değerini de değiştirirler (Sclatter ve Smith 1999). Mayalar, iyi fermente olmuş silajlarda 10 cfu/g, bozulmuş silajlarda ise 10¹² cfu/g' a kadar değişen düzeylerde bulunabilirler (Middelhoven ve van Baalen 1988). Daniel ve ark. (1970) maya popülasyonu 10⁶ cfu/g olan silajların, aerobik bozulmaya açık silajlar olduğunu bildirmişlerdir. Bazı küf türleri mikotoksin ve diğer toksik bileşikler üretebilirler. Silajlardaki besin maddeleri kaybı ve mikotoksin oluşumu, silajın gerek ekonomik değerini gerekse besleme değerini düşürür. Bu tip silajlar hayvanların yem tüketimini azaltır, besin maddelerinin sindirilebilirliğini olumsuz yönde etkiler, emilimi düşürür ve toksik etki yaratabilir (Sclatter ve Smith 1999).

Silajların aerobik olarak bozulmasından özellikle maya ve küf gibi mikroorganizmalar sorumlu olurken, aerobik olarak bozulmuş silajlardaki kimyasal, fiziksel ve mikrobiyal değişiklikler, bakterilerin de bozulmadan sorumlu mikroorganizmalar olabileceğini göstermiştir (Woolford ve ark. 1982). Spoelstra ve ark. (1988) aerobik bozulmaya asetik asit bakterilerinin de sebep olduğunu bildirmişlerdir. Barry ve ark. (1980) ise yemleme döneminde bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların aside dayanıklı aerobik bakteriler olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan kötü fermente olmuş silajlarda görülen *Listeria* gibi patojenik bakteriler ile *Clostridium botulinum*, *C. butyricum* ve *C. tyrubutyricum* gibi spor oluşturan bakteriler de silajların hijyenik kalitesini etkiler ve besleme değerini önemli ölçüde düşürürler (Wilkinson 1999). Bu mikroorganizmalardan *C. botulinum*, botulinum toksini üretir. Söz konusu toksin doğada bulunan en güçlü nörotoksindir ve kaslarda felçlere neden olur (Adams ve Moss 2000). Ayrıca *C. butyricum* ve *C. tyrubutyricum*' un silajlarda bulunması, süt ve süt ürünlerinin kalitesini de düşürmektedir (Klijn ve ark. 1995). Aerobik bozulma üzerinde silajların fermantasyon özellikleri de etkilidir. Silaj bünyesinde kullanılmadan kalan şekerler ile yüksek düzeyde oluşan laktik asit, aerobik stabiliteyi düşürmektedir. Bazı maya ve küfler artan şekerler ile laktik asidi besin maddesi olarak kullanıp silajlarda CO₂ üretimine yol açmakta, bunun sonucunda ortam pH' sında ve sıcaklığında artış meydana gelmektedir

(Ashbell ve ark. 1991). Dawson ve ark. (1990) aerobik mikroorganizmaların besin maddelerini metabolize etmeleri sonucunda siloda oluşan sıcaklık ve pH artışını “aerobik instabilite” olarak tanımlamaktadır. Aerobik stabilite üzerinde etkili diğer bir faktör de çevre sıcaklığıdır.

Homofermantatif LAB inokulantlarının mısır silajlarının aerobik stabiliteyi üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırmalardan değişik sonuçlar alınmıştır. Bu inokulantlar; kullanıldıkları silajların aerobik stabiliteyi çoğunlukla düşürmüşler (Muck 1993, Weinberg ve Muck 1996), kimi çalışmada artırmış (Sebastian ve ark. 1989), kimisinde ise etkilememişlerdir (Filya ve ark. 2002a). Muck ve Kung (1997) 1990–1995 yılları arasında yapılan bir dizi araştırma sonucunu derledikleri çalışmalarında, ^{ho}LAB inokulantlarının kullanıldığı araştırmaların % 60’ ında silajların aerobik stabiliteyi düştüğünü belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu durumun nedenini, fermantasyon sırasında oluşan düşük asetik asit ile yüksek laktik asidin silajların havaya maruz kaldıkları dönemde antifungal ajan olarak yetersiz kalmasına bağlamışlardır. Weinberg ve ark. (1993) ile Filya (2002b) *L. plantarum*+*E. faecium*’un mısır silajının fermantasyon özelliklerini geliştirdiğini ancak aerobik stabiliteyi düşürdüğünü belirlemişlerdir. Aerobik stabilitedeki düşüşe bu silajlardaki yüksek düzeydeki laktik asidin ve düşük düzeydeki UYA’ nin neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar Weinberg ve ark. (1993) aerobik dönemde mısır silajının CO₂ üretimini kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla 0 ve 8.6 g/kg KM olarak belirlemişlerdir. Filya (2002b) ise mısır silajının CO₂, maya ve küf içeriğinin kontrol silajında sırasıyla 12.3 g/kg KM, 4.8 ve 5.3 cfu/g olduğunu belirlerken, bu değerleri inokulant kullanılan silajda sırasıyla 18.8 g/kg KM, 7.2 ve 8.6 cfu/g olarak saptamıştır. Danner ve ark. (2003) uyguladıkları aerobik stabilite testinde, mısır silajının pH’ sını kontrol grubu, *P. pentosaceus* 147 ve *L. plantarum* 268 kullanılan silajlarda sırasıyla 3.81, 3.88 ve 3.83; asetik asit konsantrasyonunu 16.5, 8.4 ve 8.1 g/kg KM olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, fermantasyonda sağlanan düşük pH’ nın, silajların açıldıktan sonraki dönemde aerobik mikroorganizmaları engellemede yetersiz kaldığını bildirmişlerdir. Filya ve Sucu (2003) LAB inokulantlarının kullanıldığı bir dizi araştırma sonucunu değerlendirmişler ve 28 ^{ho}LAB inokulantlarının mısır silajlarının CO₂ üretimleri (16.3 g/kg KM) ile maya (9.5 cfu/g) ve küf içeriklerini (3.2 cfu/g) önemli düzeyde artırdığını belirlemişler ve kontrol silajında aynı parametreleri sırasıyla 13.9 g/kg KM, 7.9 cfu/g ve 2.3 cfu/g olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar yapılan silajları görsel olarak değerlendirdiklerinde ise ^{ho}LAB inokulantlarının kullanıldığı silajların, noktalar halinde yüzeye yayılmış bir şekilde küf içeren silaj

kategorisinde yer aldığını tespit etmişlerdir. Filya ve ark. (2006) mısır silajının CO₂ üretimini kontrol ve *L. plantarum* kullanılan silajlarda sırasıyla 42.19 ve 46.88 g/kg KM, maya içeriğini ise 5.88 ve 5.94 cfu/g olarak belirlemişlerdir. Heterofermantatif LAB inokulantları çoğunlukla silajların aerobik stabilitesini artırmaktadır (Muck 1996, Weinberg ve Muck 1996). Heterofermantatif LAB' den silaj katkı maddesi olarak en yaygın kullanılanı *L. buchneri*' dir. *Lactobacillus buchneri*' nin maya ve küf gelişimini baskı altına alabilme potansiyeli ilk kez Cooke (1995) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Muck (1996) *L. buchneri*' nin laktik asidi fermente ederek asetik asit ürettiğini, bu asidin ise aerobik süreçte bozulmaya sebep olan maya ve küflerin çoğalmasını engellediğini ve silajların aerobik stabilitesini artırdığını bildirmiştir. Oude-Elferink ve ark. (1999) ise *L. buchneri*' nin laktik asidi; asetik asidin yanı sıra 1,2-propanediol' e de fermente ettiğini ve her iki metabolitin de bozulmayı önlediğini belirlemişlerdir.

Ranjit ve ark. (2002) *L. buchneri* 40788' in mısır silajının asetik asit konsantrasyonunu önemli düzeyde artırdığını (P<0.05) ve silajlarda yüksek düzeyde oluşan asetik asidin ise küf gelişimini önemli ölçüde engellediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, havanın oksijenine maruz bıraktıkları inokulantlı silajların 25 saatten daha fazla bozulmadan kaldığını gözlemişlerdir. Taylor ve Kung (2002) *L. buchneri* 40788+enzim kullandıkları çalışmalarında, aerobik süreçte en erken bozulan mısır silajının kontrol grubu (47 saat) olduğunu belirlerken; en geç bozulan silajın *L. buchneri* 40788 [sırasıyla 6.6x10⁵ (400 saat), 10⁶ (371 saat) ve 5x10⁵ (333 saat)] kullanılan grup olduğunu saptamışlardır. Danner ve ark. (2003) aerobik stabilite testi sonunda, mısır silajının pH' sını kontrol ve *L. buchneri* 218 gruplarında sırasıyla 3.81 ve 4.11, asetik asit konsantrasyonunu 16.5 ve 55.5 g/kg KM olarak saptarlarken, silajların aerobik dayanıklılık süresini kontrol ve *L. buchneri* 218' de sırasıyla 40 ve 274 saat olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, silajların bozulmadan en az 100 saat kalabilmeleri için gerekli asetik asit düzeyinin 50 g/kg KM olması gerektiğini belirtmişlerdir. Kleinschmit ve ark. (2005) mısır silajının aerobik dayanıklılık süresini kontrol grubu, *L. buchneri* 11A444 ve *L. buchneri* 40788 kullanılan silajlarda sırasıyla 39, 139 ve 45 saat olarak belirlemişlerdir. Kleinschmit ve Kung (2006a) 43 çalışmanın sonucunu meta-analiz yöntemi kullanılarak değerlendirmişler ve araştırmalarında uygulamaları kontrol grubu ve *L. buchneri*' nin ($\leq 10^5$ ve $>10^5$ cfu/g taze materyal) iki farklı dozu olmak üzere üç farklı kategoride toplamışlardır. Araştırmacılar, *L. buchneri*' nin mısır silajının aerobik stabilitesini artırdığını belirterek, silajların bozulmadan kaldıkları sürenin uzunluğunu kontrol, $\leq 10^5$ cfu/g ve $>10^5$ cfu/g gruplarında sırasıyla 25, 35 ve 503 saat olarak bulmuşlardır. Filya ve ark.

(2006) en düşük CO₂ üretimi ile maya gelişiminin *L. buchneri* kullanılan mısır silajında gerçekleştiğini (sırasıyla 5.40 g/kg KM, 1.88 cfu/g) saptarlarken; en yüksek CO₂ üretimi ile maya gelişiminin kontrol silajında oluştuğunu (sırasıyla 44.19 g/kg KM, 5.88 cfu/g) belirlemişlerdir. Kung ve ark. (2007) *L. buchneri* kullandıkları mısır silajını (73 saat) kontrol grubundan (37 saat) aerobik olarak daha dayanıklı bulmuşlardır. Aynı 30 araştırmacılar, *L. buchneri*' nin (maya ve küf sırasıyla 5.63–5.51 cfu/g) mısır silajında maya ve küf gelişimini kontrol grubuna göre (6.05–7.29 cfu/g) engellediğini de belirlemişlerdir (P<0.05).

2.7. Laktik asit bakteri inokulantlarının silajların rumen parçalanabilirlik özellikleri ile hayvanların performansları üzerine etkileri

Laktik asit bakteri inokulantları ile yapılan çalışmalarda, inokulantların besin maddelerinin sindirilebilirliği üzerindeki etkilerinin genellikle olumlu yönde olduğu bildirilmiştir (Bolsen ve ark. 1996, Kung ve Muck 1997, Filya 2000). Nitekim Luther (1986) *L. plantarum*' un, Filya (2002a) *L. plantarum*+*E. faecium*' un (^{ho}LAB) mısır silajının hem kalitesini hem de sindirilebilirliğini arttırdığını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar Luther (1986) yürüttüğü iki denemeden birincisinde, mısır silajının KM sindirilebilirliğini kontrol ve inokulant gruplarında sırasıyla % 65.7 ve 68.5; ikincisinde ise % 67.7 ve 71.2 olduğunu belirlemiştir. Filya (2002a) ise aynı parametreyi kontrol silajında % 51.5, inokulant kullandığı silajda % 60.1 olarak saptamıştır. Weinberg ve ark. (2007) çeşitli LAB inokulantlarını kullandığı çalışmasında, bazı inokulantların mısır silajının *in vitro* KM sindirilebilirliğini [^{ho}LAB *E. faecium* Q (% 64.5) ve *L. plantarum*+*E. faecium* (% 61.1), ^{het}LAB *L. buchneri* (% 63.1) ve P11A44 (% 62.0)] kontrol silajına (% 59.6) göre arttırdığını, bazılarının ise etkilemediğini belirlemiştir (^{ho}LAB *L. plantarum* MTD1 ve *P. pentosaceus* E). Diğer yandan Filya ve ark. (2004b), Rodrigues ve ark. (2002) ile Polat ve ark. (2005) *L. plantarum*+*E. faecium*' un (^{ho}LAB) mısır silajının *in situ* ve *in vivo* KM sindirilebilirliğini etkilemediğini bildirmişlerdir. Bahsedilen bu çalışmalardan Rodrigues ve ark. (2002)' nin yürüttüğü araştırmada, mısır silajının KM sindirilebilirliğinin kontrol ve *L. plantarum*+*E. faecium* içeren gruplarda sırasıyla % 64.6 ve 64.5 olduğu belirlenmiştir. Polat ve ark. (2005) ise 1 yaşlı 3 baş Türkgeldi tokluda yürüttükleri sindirim denemesi sonucunda söz konusu silajda KM' nin sindirilme derecesini kontrol silajında % 66.3, inokulant kullanılan silajda % 69.8 olarak saptamışlardır.

Laktik asit bakterilerinin hücre duvarı bileşenleri ve diğer komponentlerini nasıl etkilediği tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Muck 1993). Ancak inokulant kullanımına bağlı olarak silajlarda sağlanan düşük pH' nin, hücre duvarı komponentlerinde

bir azalma sağladığı ve hemisellülozun hidrolizini sağlayan ek bir asit üreterek hücre duvarı fraksiyonlarını açtığı ve sonuçta hücre duvarının rumen mikroorganizmalarınca daha kolay sindirilebilir hale geldiği öne sürülmektedir (Bolsen ve ark. 1996). Nitekim Polat ve ark. (2005) yürüttükleri sindirim denemesinde, *L. plantarum*+*E. faecium*' un mısır silajının ham sellüloz sindirimini önemli düzeyde artırdığını belirterek, ham sellülozun sindirilme derecesini kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla % 71.3 ve 78.6 olarak belirlemişlerdir (P<0.05). Weinberg ve ark. (2007) ^{ho}LAB *E. faecium* Q (%45.2) ile ^{het}LAB *L. buchneri* (% 49.8) ve P11A44' ün (% 49.6) mısır silajının NDF sindirilebilirliğini kontrol grubuna göre (% 42.2) önemli düzeyde artırdığını saptamışlardır (P<0.05). Diğer yandan Sanderson (1993) ve Filya (2002b) (^{ho}LAB *L. plantarum*+*E. faecium*' un, Filya ve ark. (2006) ise *L. buchneri*' nin (^{het}LAB) mısır silajının NDF sindirilebilirliğini etkilemediğini bildirmişlerdir. Filya (2002b) tarafından yürütülen çalışmada, in situ NDF sindirilebilirliği kontrol ve inokulant kullanılan silajlarda sırasıyla % 41.4 ve 40.6 olarak belirlenirken, Filya ve ark. (2006) aynı parametreyi kontrol silajında % 35.6, *L. buchneri* kullandıkları silajda ise % 35.5 olarak belirlemişlerdir. Laktik asit bakterilerinin mısır silajının organik madde (OM) sindirilebilirliği üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırmalardan değişik sonuçlar alınmıştır. Meeske ve Basson (1998) ile Kleinmans ve Hooper (1999) tarafından yürütülen çalışmalarda, *L. plantarum*+*E. faecium* mısır silajının *in vitro* OM sindirilebilirliğini artırmış ve bu silajları tüketen kuzular kontrol grubuna göre daha iyi bir besi performansı göstermiştir. Diğer yandan Filya ve ark. (2004b) ^{ho}LAB *L. plantarum*+*E. faecium*' un, Filya ve ark. (2006) ise ^{het}LAB *L. buchneri*' nin mısır silajının OM parçalanabilirliğini ve kuzuların besi performanslarını etkilemediğini bildirmişlerdir. Bahsedilen bu çalışmalardan ilkinde, OM parçalanabilirliği kontrol grubu ve *L. plantarum*+*E. faecium* kullanılan silajda sırasıyla % 60.6 ve 62.5, ikincisinde ise kontrol grubu ve *L. buchneri* kullanılan silajda sırasıyla % 62.4 ve 62.3 olarak saptanmıştır (Filya ve ark. 2006). Muck (1993) ^{ho}LAB inokulantlarının, ruminantların performanslarını genellikle olumlu yönde etkilediğini bildirerek, bu inokulantların yapılan çalışmaların %25–40' unda yem tüketiminde, canlı ağırlık artışında, yemin enerjisinin değerlendirilmesinde ve/veya süt üretiminde %5–11 düzeyinde artış sağladığını bildirmiştir. Wohlt (1989) süt sığırlarını mısır silajı ve yoğun yem karmasıyla beslemiş ve 8 haftalık deneme sonunda, *L. plantarum* (^{ho}LAB) içeren silajı tüketen sığırların kontrol grubuna göre 0.7 kg/gün daha fazla süt (% 3.5 yağa göre düzeltilmiş) verdiğini belirlemiştir. Aynı araştırmacı, *L. plantarum*' un sütün bileşimini de olumlu yönde etkilediğini tespit etmiş ve bu inokulantın süt yağı (45 g/gün) ile süt proteinini (50 g/gün) artırdığını da saptamıştır. Kung ve ark. (1993)

süt sığırlarını % 50 mısır silajı, % 45 yoğun yem ve % 5 yonca kuru otu içeren komple rasyonla beslemişler ve *L. plantarum*' un süt verimini 1.5 kg/gün düzeyinde (% 3.5 yağa göre düzeltilmiş) artırdığını saptamışlardır. Kung ve ark. (2003) 12 çalışmanın sonucunu değerlendirdikleri araştırmalarında, *L. plantarum* MTD1' in (^{ho}LAB) süt verimini 1.2 kg/gün düzeyinde artırdığını belirlemişlerdir. Dhiman ve ark. (1991) 16 çalışmanın sonuçlarını derlemiş ve ^{ho}LAB inokulantlarının silajdaki epifitik LAB sayısını en az 10 kat artırması durumunda, süt veriminde % 2.5 düzeyinde bir artışın sağlanabileceğini bildirmiştir.

Laktik asit bakteri inokulantlarının kullanımına bağlı olarak hayvanların performanslarında sağlanan ilerlemelerinin nedeni henüz yeteri kadar açıklığa kavuşturulamamıştır (Weinberg ve ark. 2003, 2004, Muck ve ark. 2007). Fermantasyon ürünleri ile KM geri kazanımında ve KM sindirilebilirliğinde sağlanan artışların hayvanların performanslarına olumlu yönde yansıtacağı bildirilmektedir (Muck 1993). Ancak yapılan bazı çalışmalarda bunların aksine sonuçlar alınmış ve LAB inokulantlarının silaj fermantasyonunu ya da sindirilebilirliğini etkilemediği durumlarda bile hayvan performanslarında artış gözlenmiştir (Gordon 1989a,b, Kung ve ark. 1993). Keady ve ark. (1994) *L. plantarum* MTD1' in (^{ho}LAB) silaj fermantasyonunda herhangi bir gelişme sağlamaksızın silaj tüketimi ile hayvanların performanslarında artış sağladığını belirlemişlerdir. Söz konusu artışların nedeni bilinen mekanizmalarla açıklanamamış, dolayısıyla bu konu ile ilgili yeni hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezlerden biri, spesifik LAB suşlarının probiyotik etki göstermeleri ve söz konusu LAB türlerinin rumen mikroorganizmaları ile etkileşime girerek, hayvanların performanslarında olumlu gelişmelere neden olmalarıdır (Weinberg ve Muck 1996, Malik ve Sharma 1998). Diğer bir hipotez ise LAB inokulantlarının silaj ve rumen ortamında bulunan zararlı mikroorganizmaları baskı altına alan bakteriosin gibi bileşikler üretebilmeleridir (Vandenberg 1993). Öne sürülen bu hipotezlerden sonra Muck ve ark. (2007) yonca silajı ile yaptıkları çalışmaları sonucunda, silaj fermantasyonunda ya da sindirilebilirlikte herhangi bir gelişme sağlanmadığı durumlarda bile LAB inokulantlarının *in vitro* rumen fermantasyonunu etkilediğini, bazı inokulantların mikrobiyal biyokitle miktarını artırabileceğini ancak bu konunun aydınlatılması için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Silaj materyali

Çalışmanın ana materyalini Tekirdağ ili Malkara İlçesi Vakıfıdemir Köyü'nde yetiştirilen yonca (*Medicago sativa*) bitkisi oluşturmuştur.

3.1.2. Silajların hazırlanması

2012 yılında ekimi yapılan yoncalar 10.06.2013 tarihinde ikinci biçim sonrası silaj yapılmıştır. Hasat ile silaj arasında yapılan işlem aşamaları; ilk önce biçme makinesiyle biçilmiş, toplama makinesiyle toplanmış ve tarlada 24 saat süreyle soldurma işlemi yapılmıştır. Soldurma işleminden sonra, taze materyallerde yapılacak olan analizler için tarlanın farklı bölgelerinden örnekler alınmış homojen bir şekilde karıştırılıp poşetlenip derin dondurucuda saklanmıştır. Parçalanmış materyal balya bağlama makinesiyle bağlanırken makineye ait ilaç deposundan silajda kullanılması planlanan katkı maddelerinden PJF, ^{ho}LAB ve ^{het}LAB inokulantlar ve katkı maddelerindeki suya eşdeğer düzeyde olmak üzere kontrol grubuna su ilave edilerek, karıştırılıp püskürtme yöntemiyle uygulanmıştır. Yonca balyaları kontrol, PJF, ^{ho}LAB ve ^{het}LAB gruplarının her birinden 3'er adet olmak üzere 12 adet balya olacak şekilde bağlanmıştır (Şekil 3.1. Yonca balya silajları)

Yonca balyaları poşetli, hava almayacak şekilde bağlandıktan sonra kapalı alanda bekletilmiştir. Bütün muamele grupları bağlandıktan, 150 gün sonra toplu olarak açılmış ve analizler laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Yonca balya silajları

3.1.3. Silajlarda kullanılan katkı maddeleri

1. Kontrol
2. PJF: Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı
- 3.^{ho} LAB: İnokulant 1188 (Pioneer® 1188, USA). *Lactobacillus plantarum* ve *Enterococcus faecium* içermektedir.
- 4.^{het} LAB: İnokulant 11A44 (Pioneer® 1188, USA). *Lactobacillus buncheri* içermektedir.

3.1.4. Katkı maddelerinin kullanım şekli

1. grup kontrol grubu olup inokulant veya PJF içermemektedir. Kontrol silajlarına 5 ml/kg düzeyinde saf su ilave edilmiştir.
2. grupta, PJF (Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı)
3. grupta, inokulant 1188 (Pioneer®, USA) kullanılmıştır. Yapılan bu inokulant uygulamaları sonucunda taze materyale 10^6 cfu/g LAB katılmıştır.
4. grupta, inokulant 11A44 (Pioneer® 1188, USA) kullanılmıştır. Yapılan bu inokulant uygulamaları sonucunda taze materyale 10^6 cfu/g LAB katılmıştır.

3.1.4.1. PJF (Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının hazırlanması)

PJF'nin hazırlanmasında, bitki materyali olarak yonca kullanılmıştır. PJF Masuka ve ark. (2001) tarafında bildirilen yöntemle göre hazırlanmıştır. Bu amaçla 200 gram bitki

materyali üzerine 1000 ml distile su ilave edilip, blender yardımıyla ile 2 dakika süre ile parçalanmıştır. Elde edilen sıvı 2 kat tülbent bezinde süzülerek şişeler konarak ve üzerine 3 gr/100 ml (w/v) melas ilave edilerek 30 °C inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Yonca balya silajlarına PJF 5 ml/kg (%0.5) düzeyinde hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Silaj kalitesi belirlenmesi için kullanılan yöntemler

Araştırmada kullanılan yemlerin silolama öncesinde pH, KM, SÇK, mikrobiyolojik analizler, silolama sonrası örneklerde pH, SÇK, NH₃-N, laktik asit ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. pH analizleri

Silolama öncesi taze materyalde ve açım sonrası elde edilen örneklerde pH ölçümleri için 50 g' lık örneklere 125 ml saf su ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat süre ile zaman zaman karıştırılarak tutulmuştur. Daha sonra örnekler süzölmüş ve elde edilen süzükte pH metre aracılığı ile okuma gerçekleştirilmiştir (Anonymous 1986).

3.2.1.2. SÇK analizi

Başlangıç ve silaj örneklerinde SÇK analizi Anonymous (1986)' a göre yapılmıştır. Analize tabi tutulacak örnek 102°C sıcaklıkta 2 saat süre ile kurutulmuştur. Kurutulup öğütölmüş örnekten 0,2 g tartılarak bir şişe içerisine konulmuş, üzerine 200 ml saf su ilave edilerek 1 saat süre ile çalkalanmıştır. Örneklerin ilk birkaç damlası ihmal edilecek şekilde süzölerek 50 ml'lik berrak ekstrakt elde edilmiştir. Standart eğrilerin hazırlanmasından sonra 2 ml ekstrakt alınarak 150x25 mm'lik borosilikat test tüplerine konulmuştur. Ön hazırlığı takiben absorbans değeri 620 nm'de 30 dakika içerisinde spektrofotometre aracılığı ile okunmuştur. Örnek ve kör denemeler sonrası tespit edilen absorbans değerlerine denk gelen mg glikoz değerleri arasındaki farklılık 500 katsayısı ile çarpılmıştır. Sonuç, örnek içerisinde yer alan g/kg SÇK miktarı olarak kaydedilmiştir.

3.2.1.3. NH₃-N Analizi

Silaj örneklerinde NH₃-N, silaj örneklerinden elde edilen ekstraktlarda mikro distilasyon metotlarına (Anonymous 1986) göre gerçekleştirilmiştir. Yüzelli günlük süre sonrasında elde edilen örneklerde NH₃-N tespiti için 20 g'lık taze örnek üzerine 100 ml saf su ilave edilerek çalkalama makinesinde 1 saat süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra süzölerek elde edilen ekstrakte mikro distilasyon metodu aracılığı ile söz konusu parametre saptanmıştır.

3.2.1.4. Laktik Asit Analizi

Laktik asit miktarlarının tespitinde Koç ve Coşkuntuna (2003)'nin bildirdikleri spektrofotometrik yöntemine göre saptanmıştır.

Derin dondurucuda -20 °C'de saklanan örnekler analizin yapılacağı gün çıkartılarak çözülünceye kadar oda sıcaklığında bir süre bekletilmişlerdir. Çözündürülen örnekler daha sonra 1:100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltilen örneklerden otomatik pipet yardımıyla 1 ml sıvı tüplere aktarılmış üzerine 0.1 ml bakır sülfat (5g CuSO₄/100 ml saf su) ile 6 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan tüpler 30 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra 5 dakika soğuk banyoda tutularak soğumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 0.1 ml parahidroxy biphenol (%0,5 NaOH/1000 ml saf su +2,5 g PHBP) eklenerek, tüpler 30 saniye tekrar vortekste karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 90 saniye kaynar su içerisine daldırılıp çıkartılmış ve soğuması beklendikten sonra 565 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okunmuştur.

3.2.1.4.1. Standart eğrinin oluşturulması

213 mg lityum laktat 500 ml saf su içerisinde çözündürülmüş ve üzerine 0.5 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiştir (400 µg/ml). Elde edilen çözelti, önce 1:9 (40 µg/ml) daha sonra 1:1 (20 µg/ml, stok çözelti) oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Daha sonra stok çözeltilerden 2,5, 5,0, 10,0,15,0 µg/ml lityum laktat içerecek şekilde yeni karışımlar elde edilmiştir. 1 ml seyreltik bulunan tüplerin içerisine 0,1 ml bakır sülfat ile 6 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiş, 30 saniye vortekste karıştırılmış ve 5 dakika soğuk banyoda tutularak soğumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 0.1 ml parahidroxy biphenol eklenerek, tüpler 30 saniye tekrar vortekste karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 90 saniye kaynar su içerisine daldırılıp çıkartılmış ve soğuması beklendikten sonra 565 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okunmuş ve standart eğri Microsoft Excel bilgisayar programında oluşturulmuştur.

3.2.1.4.2. Hesaplama

Standart eğriden, örneklerin µg/ml' leri okunarak saptanmıştır. Elde edilen örneklerin KM miktarlarına bölünmüş ve silajların % KM'de % laktik asit içerikleri saptanmıştır.

3.2.1.5. Mikrobiyolojik analizler

Çalışmada gerek silolama öncesi taze materyalde ve gerekse de son ürünler üzerinde toplam mezofilik bakteri (TMAB), LAB, koliform bakteri, maya ve küf yoğunluklarının saptanmasına yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 25 g'lık örnekler peptonlu su aracılığı ile 2 dakikadan az olmamak koşulu ile karıştırılıp mikroorganizmaların mümkün

olduğu ölçüde materyalden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen stok materyalden logaritmik seride dilüsyonlar hazırlanarak 1 saati aşmayan zaman zarfında ekim işlemi yapılmıştır.

3.2.1.5.1. Toplam Mezofilik Bakteri Sayımı

Silaj örneklerinde TMAB sayımı için Plate Count Agar (PCA) besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan çift petri plağına yüzeye ekim yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petri plakları sayılmıştır (Marshall 1992).

3.2.1.5.2. LAB' nin Sayılarının Belirlenmesi

MRS agarda gelişen LAB'leri sayımı için Man Ragosa Sharpe Agar (MRS agar) (Merck) kullanılmıştır. Yüzeye ekim yöntemi uygulandıktan sonra petri plakları $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 3 gün inkübe edilmiş ve koloni içeren petri plakları sayılmıştır (Baumgart ve ark. 1986).

M17 agarda gelişen LAB'leri sayımı için M17 agara (Merck) yüzeye ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri plakları $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petri plakları sayılmıştır (Gilliand ve ark. 1984).

3.2.1.5.2.1. LAB' nin İzolasyonu, Tanımlanması ve Muhafazası

Silaj örneklerinden LAB'leri izolasyonu için, hazırlanan uygun dilüsyonlardan MRS agar ve M17 agara yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS agara ekim yapılan plaklar 30°C 'de 72 saat, M17 agar'a ekim yapılan plaklar ise 30°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Centeno ve ark. 1996). İnkübasyon sonucu her iki besiyerinde gelişen tipik görünüşlü kolonilerin (1-2 mm çaplı konveks, yuvarlak ya da buğday tanesi şekilli, beyaz veya krem renkli koloniler) mikroskopik morfolojileri incelenmiş ve ayrıca katalaz testi ile Gram boyama testine tabi tutulmuştur. Gram pozitif, katalaz negatif, kok veya çubuk şekilli bakterilerden alınmış, MRS ve M17 broth'a ekim yapılmış ve 30°C 'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tekrar MRS ve M17 agara çizim usulü ekim yapılmış ve 30°C 'de 24- 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda Gram boyama, mikroskopik görünüm, katalaz testi tekrar edilmiş ve homojen görünümlü Gram pozitif, katalaz negatif kok veya basil şeklindeki muhtemel laktik asit bakterileri seçilmiştir.

3.2.1.5.2.2. Gram Boyama

İzolatların 24 saatlik genç kültürlerinden Gram boyama yapılmış ve menekşe renkli koloniler Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2008).

3.2.1.5.2.3. Katalaz Testi

Katalaz testi için MRS ve M17 agarlarda geliştirilmiş olan koloniler üzerine % 3'lük H₂O₂ damlatılmış ve kolonilerin etrafında gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2008).

3.2.1.5.2.4. API 50 (Karbonhidrat) Testi

API 50 CHL, 50 adet test tüpüğü içindeki 49 karbonhidratın fermentasyonunun gerçekleşmesini aynı anda mümkün kılan kullanıma hazır bir sistemdir (BioMeri ux 2001). Bu sistem API 50 CHL (besin ortamı), API 50 test t p g  ve parafin yağından ibarettir. MRS agar üzerine anaerobik şartlarda 30-37 C'de 24 saat süreyle geliştirilen laktik asit bakteri grubuna dahil olan (gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan) kolonilerden (steril  ze ile alınarak 5 ml'lik ampullerdeki besiyerine aşılama yapılmıştır (Lopez-Diaz et.al. 2000). Ampul içindeki besiyeri vortex mikserde iyice karıştırıldıktan sonra 50 adet test tüpüne doldurulur. Tüplerin ağız kısmı içerisinde hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilip tüpler sıvı parafin ile kapatılmıştır. İnkubasyon 30 C'de 48 saat devam etmiştir. Test sonucu (+) kabul edilecek asit oluşumu gerçekleşmiş tüplerde, bromeresol purple indikatöründen dolayı mor olan rengin sarıya dönüşmesi gerekmektedir. Esculin testinde renk sarı yerine siyaha dönüşmelidir. Karbonhidrat içermeyen kontrol tüpünde renk değişimi olamamalıdır. Tüplerdeki renk değişimi gözlenmiş ve sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil 3.2. Ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 50 CHL test kiti

3.2.1.5.2.5. Koliform Grubu Bakteri Sayımı

Silaj örneklerinde koliform grubu bakteri sayımı için Violet Red Bile agar (VRBA) (Merck) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan çift petri plağına dökme plak yöntemiyle ekim

yapılmış plaklar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çapı 0,5 mm'den daha büyük olan koloniler sayılmıştır (Marshall 1992).

3.2.1.5.2.6. Maya – Küf Sayımı

Maya ve küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck) kullanılmıştır. PDA'nın otoklavda steril edildikten sonra % 10'luk steril tartarik asit ile pH'sı 3,5 25°C 'de 5-7 ayarlanmış ve yüzeye ekim yöntemiyle yapılmıştır. Ekim yapılan plaklar 25°C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyondan sonra koloniler sayılarak maya ve küf sayısı bulunmuştur (Marshall 1992).

3.2.2. Ham madde analizleri

3.2.2.1. Ham besin madde analiz yöntemleri

Kuru madde miktarı; belli miktarda alınan silaj örneğinin 60°C sıcaklıkta 48 saat süreyle kurutulması ve HK miktarı da 550°C sıcaklıkta bir gece yakılması ile bulunmuştur. Yemin OM miktarı ise, KM ile HK arası farktan hesaplanmıştır. OM'yi oluşturan HP, belli miktardaki yem örneğinin önce kuvvetli asitle yakılarak azotun amonyum sülfata, daha sonra da baz ile muameleye tabii tutularak amonyak formuna dönüştürülmesi ve bu amonyağın belli normalitedeki bir asitle titrasyonu sonucu elde edilen sarfiyattan hesaplanmıştır. Organik maddeleri oluşturan diğer komponentlerden HS; yemin önce belli konsantrasyonlardaki asit ve alkali ile kaynatılıp süzülmesi ve en son asetonla yıkanıp kurutularak yakılması sonucu elde edilmiştir (Akyıldız ve ark. 1984).

3.2.2.2. Enzimde OM çözünebilirliği analiz yöntemleri

Çalışmada silaj örneklerindeki *in vitro* enzimde OM çözünebilirlik düzeyinin saptanması Naumann ve Bassler (1993) tarafından önerilen selülaz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre, kurutularak öğütülmüş materyalden alınan 0.3 g'lık örnek daha önce altı kapatılmış olan süzgeçli cam kaplara (80°C ısıya dayanıklı, por. 1, altı ve üstü kapaklı, 50 ml'lik Gooch krozeler) tartılır. Her biri 3'er paralel olacak şekilde tartılan yem örnekleri üzerine 40°C sıcaklıktaki pepsin+HCl çözeltisinden 30 ml ilave edilir ve cam kabın üst kısmı kapatılır. Cam kaplar 40°C sıcaklığa ayarlı inkübatör dolabına konur ve 5 saat sonra kaplar iyice karıştırılır. Burada enzim aktivitesinde herhangi bir yetersizliğe neden olmamak için, çözelti sıcaklığının $39-40^\circ\text{C}$ sıcaklıkta tutulmasına dikkat edilmiştir. Cam kaplar 24 saat inkübatör dolabında kaldıktan sonra 80°C sıcaklıktaki su banyosunda 45 dakika bekletilerek nişastanın hidrolizi sağlanır. Bu işlemin ardından cam kaplar açılarak içindeki çözelti vakum pompası yardımı ile emilir ve içinde kalan kısım sıcak su ile yıkanır. Alt kısmından kapatılan cam kaplara selülaz+buffer çözeltisinden 30 ml ilave edilir ve 40°C sıcaklıktaki inkübatör

dolabında 24 saat bekletilir. Bu işlem sonrası cam kapların kapakları açılır, çözeltiler süzülür ve sıcak su ile yıkanır. Süzme işleminden sonra 105 °C sıcaklığa ayarlı kurutma dolabında bir gece boyunca kurutulup, tartım işlemi yapılır. Cam kaplar 550 °C sıcaklığa ayarlı kül fırınında en az 90 dakika yakılmış ve tartım gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonrası elde edilen sonuçlardan yararlanılarak enzimde çözünen OM miktarları aşağıdaki eşitlikler yardımı ile bulunmuştur.

Organik madde sindirilebilirliği, % = $[B1-(A1-A2) \times 100]/B1-C1$

A0: Ghoch krozesinin darası, g

A1: 105 °C'de kurutulduktan sonraki dara+örnek ağırlığı, g

A2: 550 °C'de yandıktan sonraki dara+örnek ağırlığı, g

B1: Analize alınan örnek miktarı, g/KM

C1: Analize alınan örnekteki kül miktarı, g/KM

Enzimatik (selüloz) yöntemde kullanılan çözeltiler; pepsin- HCl çözeltisi: 2 g pepsin+0.1 N HCl; asetat buffer çözeltisi: 5.9 ml asetik asit+ 1 litre destile su (çözelti A) ve 13.6 g sodyum asetat + 1 litre destile su (çözelti B) hazırlandıktan sonra 400 ml çözelti A ile 600 ml çözelti B karıştırılır; selüloz buffer çözeltisi: 3.3 g selüloz enzimi (trichoderma viride; onozuka R-10, 1 U/mg aktivite)+1 litre asetat buffer çözeltisi.

3.2.2.3. Hücre duvarı içerikleri analiz yöntemleri

Çalışmada silaj örneklerinde NDF, ADF ve asit ADL analizleri Van Soest analiz yönteminde öngörülen prensipler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Close ve Menke 1986).

NDF analizi, hücrenin çözünebilir materyalinin sodyum lauryl sülfat içeren nötral çözücü ile kaynatılarak ekstraksiyonundan sonra hücre duvarı bileşenlerinin filtrasyon aracılığı ile ayrılması esasına dayanır (Close ve Menke 1986). 1 mm' lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş yem numunesinden 0.5-1 g bir cam kaba tartılmıştır. Sırasıyla oda sıcaklığındaki 100 ml nötral çözücü solüsyonuna 93 g EDTA ve 34 g sodyum tetra borat tartılarak birlikte geniş bir kaba konmuştur. Distile su ilave edilmiş ve hafifçe ısıtılarak çözülmüştür. Bu çözeltiliye 150 g sodyum lauryl sülfat ve 50 ml 2-etoksietanol ilave edilmiştir. İkinci bir cam kaptaki 22.8 g susuz di sodyum hidrojen sülfat tartılır, distile su ilave edilir ve hafifçe ısıtılarak çözülmüştür. İlk çözeltiliye ilave edilmiş, karıştırılmış ve 5 litreye seyreltilmiştir. Çözelti pH'sı 6.9-7.1 arasında kontrol edilmiştir. Birkaç damla dekalın, 0.5 g sodyum sülfat katılmış ve geri soğutucuya takılmıştır. Çözelti hızla kaynama durumuna

getirilmiş ve bir saat kaynatılmıştır. Ateşten alınıp 10 dakika tutulmuştur. Darası alınmış cam krozeden düşük vakum aracılığıyla filtre edilmiştir. Kalıntı iki kısım kaynamaya yakın sıcaklıktaki su ve iki kısım asetonla yıkanmıştır. Cam kroze kurutma dolabında 103 °C sıcaklıkta 4 saat veya 100 °C sıcaklıkta bir gece tutulmuştur. Sonra desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır.

Hesaplama: $NDF (g/kg KM) = a-b/N \times 1000$

a = NDF içeren kuru cam krozenin ağırlığı, g

b = cam krozenin darası alınmış ağırlığı, g

N = örneğin ağırlığı, g

ADF analizinde, yem örneği cetil trimetil amonyum bromidin (CTAB)-H₂SO₄ solüsyonu ile kaynatılmıştır. Filtrasyon sonrasında başlıca lignoselüloz ile silikadan oluşan ve ADF olarak adlandırılan çözünmeyen materyal kalır (Close ve Menke 1986). Bir mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş numuneden 0.5 g kadar behere tartılmıştır. 100 ml soğuk H₂SO₄ - CTAB solüsyonu (100 g CTAB 5 litre 1 N H₂SO₄ çözülür, gerekirse filtre edilir) ve birkaç damla dekalin ilave edilmiştir. Isıtıcıya konmuştur. Solüsyon hızla kaynama durumuna getirilmiş ve 1 saat hafifçe kaynatılmıştır. Düşük bir vakum ile darası alınmış cam krozeden sıcakken filtre edilmiştir. Kalıntı kaynamaya yakın su ile köpük oluşumu bitene kadar yıkanmıştır. Daha sonra asetonla yıkanmıştır. Kroze kurutma dolabında 103 °C sıcaklıkta bir gece tutulmuştur. Desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır.

Hesaplama: $ADF (g/kg KM) = a-b /N \times 1000$

a = ADF içeren kuru cam kroze ağırlığı, g

b = Darası alınmış cam krozenin ağırlığı, g

N = numune miktarı, g

ADL analizinde, %72'lik sülfirik asit içeren çözücü solüsyonun (%72'lik H₂SO₄- CTAB) selülozu ayrıştırması ile elde edilen kalıntının kül fırınında yakılması ile kütünü de içeren lignin miktarı saptanmıştır (Close ve Menke 1986). Bir mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş numuneden 0.5 g kadar behere tartılır. 100 ml'lik soğuk %72'lik H₂SO₄- CTAB (100 g CTAB 5 litre %72'lik sülfirik asitte çözdürülmüştür, gerekirse filtre edilmiştir) ve

birkaç damla dekalin ilave edilerek ısıtıcıya konmuştur. Solüsyon hızla kaynama durumuna getirilmiş ve bir saat hafifçe kaynatılmıştır. Düşük bir vakum ile darası alınmış cam krozeden sıcakken filtre edilmiştir. Kalıntı kaynamaya yakın sıcaklıktaki su ile köpük oluşumu bitene kadar yıkanmıştır. Daha sonra asetonla yıkama işlemine devam edilmiştir. Cam kroze yarıya kadar hazırlanan asit çözücü solüsyonu ile doldurulmuş ve asit uçana kadar karıştırılmıştır. Bu işlem üç defa tekrarlanmıştır. Oda sıcaklığında 3 saat muhafaza edilmiştir. Daha sonra düşük vakumla süzölmüştür. Kroze 103 °C sıcaklıkta 4 saat kurutulmuş veya 100 °C sıcaklıkta bir gece tutulmuştur. Desikatörde alınmış, soğutulmuş ve tartılmıştır. Yakma fırınında 500-550 °C sıcaklıkta 3 saat süre ile yakılmıştır. Desikatöre alınmış, soğutulmuş ve tartılmıştır.

$$\text{Hesaplama: ADL (g/kg KM)} = a-b / N \times 1000$$

a = Krozenin kurutmadan sonraki ağırlığı, g

b = Krozenin yakmadan sonraki ağırlığı, g

N = Numune miktarı, g

Yem materyallerinin selüloz ve hemiselüloz içeriklerinin saptanmasında NDF, ADF, ADL analizleri sonrasında elde edilen değerlerden yararlanılmış olup (Close ve Menke 1986), hesaplamada kullanılan formüller aşağıda verilmektedir;

$$\text{Selüloz (g/kg KM)} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

$$\text{Hemiselüloz (g/kg KM)} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

3.2.3. Aerobik bozulmaya dirence ilişkin analizler

Ashbell ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak hazırlanan silajlar silolamanın 90. günün sonunda açılan silajlara 5 gün süre ile aerobik stabilite testine tabi tutulmuşlardır. Aerobik stabilitenin 5. günündeki silaj örneklerinin pH'ları ölçülmüş, CO₂ üretimleri ve mikrobiyal kompozisyonu saptanmıştır.

Araştırmada, aerobik stabilite testinin uygulanması için 1 atm ve 25 °C de 24 saatteki CO₂ geçirgenlik oranı 15-25 ml /mil/254 m olan stabil, aşınmaya dirençli gaz sızdırmaz özellikteki 1,5 L' lik polietilen (PET) şişeler kullanılmıştır. Bir test ünitesinin oluşturulması için pet şişe 1L ve 0.5L olmak üzere ikiye kesilmiştir. 1L'lik PET şişenin kapak kısmına hava sirkülasyonunu sağlamak için 1 cm çapında delik açılıp üzeri telle kapatılmıştır. Daha sonra 0,5 L' lik kesilen kısmın üzerine yerleştirilmiştir. 250-300 g arasında taze silaj örnekleri,

ünitenin üst kısmına sıkıştırılmadan yerleştirilmiş ve %20'lik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinden 100 ml ünitenin alt kısmına konulmuştur. Hazırlanan söz konusu ünite laboratuvar şartlarında 5 gün süre ile 20 ± 2 °C bekletilmiştir. Bu sayede aerobik aktivite sonucu silaj örneklerinde oluşan ve havadan 1,5 kat daha yoğun olan CO₂ gazı altta çökerek tabanda tutulmuştur. Çözeltiden 10 ml alınarak 1N'lik %37'lik hidroklorik asit çözeltisiyle titre edilmiştir. pH'nın 8,1-3,6 arasında harcanan HCl miktarı saptanmış ve CO₂ gazı miktarı aşağıda belirtilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$CO_2 = 0,044 \times T \times V / (A \times TM \times KM)$$

T= titrasyonda harcanan 1 NHCl asit miktarı (ml)±

V= %25 KOH çözeltisinin toplam hacmi (ml)

A= ünitenin alt kısmına ilave edilen KOH miktarı (ml)

TM= taze materyalin ağırlığı (kg)

KM= taze materyalin kuru madde miktarı(g/kg)

3.2.4. İstatiksel analizler

Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde varyans analizi, gruplar arasında farklılığın belirlenmesinde ise Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (Soysal 1998). Bu amaçla SPSS (1999) paket programı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler

Araştırmada kullanılan yonca silajlarına ait kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Uygun saklama koşullarının gerçekleşmesi sonrasında elde edilecek silo yeminde kalite ve bağlamında da besleme değeri üzerinde etkili olabilecek temel faktörler silaj yapılacak taze materyalin kimi özelliklerce sahip olduğu değerlerle ilişkilidir. Bitkisel materyalin sahip olduğu ham besin maddeleri miktarı bir tarafa bırakılacak olursa, KM içeriği, pH, SÇK kapsamı ve çoğu durumda epifitik mikroorganizma yoğunluğunun bu anlamda ön plana çıktığı söylenebilir.

Çizelge 4.1. Yoncanın silolanmadan önceki özelliklerine ilişkin değerler

Özellikler	İçerik /değer
pH	5,75
KM, % TM	60,23
HP, %KM	18,19
NDF, %KM	36,79
ADF, %KM	31,32
HK, %KM	2,14
SÇK, g/kg KM	42
LAB log ₁₀ cfu/g TM	3,52
Maya log ₁₀ cfu/g TM	2.47

TM: Taze materyal; KM: Kuru madde; HP: Ham protein; NDF: Nötral çözücülerde çözünmeyen karbonhidratlar; ADF: asit çözünmeyen karbonhidratlar; HK: Ham kül; SÇK: Suda çözünebilir karbonhidratlar; LAB: Laktik asit bakterisi; cfu: Koliform ünite

Çizelgede verildiği gibi silaj yapılmadan tarlada 24 saatlik soldurma sonrasında alınan taze yonca otu numunelerinin sırasıyla KM içeriği 60,23; pH değeri 5,75; HP içeriği 18,19 %KM, NDF içeriği 36,79 % KM; ADF içeriği 31,32 % KM; HK değeri 2,14 %KM; SÇK içeriği 42 g/kg KM; LAB sayısı 3,52 log₁₀ cfu/g TM ve maya sayısı 2.47 log₁₀ cfu/g TM olarak bulunmuştur.

Melasla hazırlanmış PJF’nin başlangıç pH ve LAB kompozisyonu ise sırasıyla 6,03 ve 5.39, log₁₀ cfu/g TM olarak bulunmuştur.

Ohshima ve ark. (1997)'nin yonca silajlarına fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısını katkı maddesi olarak uygulandığı bir çalışmada başlangıç materyaline ilişkin değerleri KM içeriğini %76,80; pH 6,16 ve SÇK içeriğini % 48,5 g/kg KM, LAB sayısını $3,0 \times 10^5$ cfu/g TM olarak bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar PJF'ye ilişkin sonuçları dikkate alındığında pH değerini 4,20 ve LAB sayısını $4,4 \times 10^7$ cfu/g TM olarak tespit etmişlerdir.

Çiftçi ve ark. (2005) yonca silajlarında elmanın karbonhidrat kaynağı olarak katılma olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında yoncada başlangıç materyaline ilişkin değerlerinden KM içeriğini % 34,25; HP içeriğini % 14,35 KM; HS içeriğini % 24,72 KM; olarak bildirmişlerdir. Benzer şekilde McAllister ve ark.(1998)'nin yonca silajlarında inokulant kullanarak yaptıkları çalışmada başlangıç materyalinde bildirdikleri değerler pH 6,56; KM %30,10; HP % 16,70 KM; SÇK 36 g/kg KM; LAB $4,86 \log_{10}$ cfu/g TM şeklindedir. Cai ve ark. (1999) izole laktik asit bakterileri kullanarak silajı yapılan yem bitkilerinde fermantasyon özellikleri ve aerobik bozulmaya etkilerini inceledikleri çalışmalarında kullanmış oldukları yoncanın başlangıç değerlerini KM % 45,65; HP % 15,83; HS % 34,56; HK % 39,48; SÇK 38,70 g/kg KM ve LAB '0' olarak bildirmişlerdir. Canbolat ve ark. (2010) üzüm posasının yonca silajlarında karbonhidrat kaynağı olarak kullanılma olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında başlangıç materyaline ilişkin yonca değerlerini KM % 25,10, HK % 7,13; SÇK % 1,34 ve HP % 19,35 olarak bildirilmiştir. Kent ve ark. (1988) bakteriyel inokulantların yonca silajına etkilerini araştırdıkları çalışmalarında başlangıç materyaline ilişkin pH ve HP değerlerini sırasıyla 6,39 ve % 19,90 KM olarak bildirmişlerdir.

4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri

4.2.1. Yonca silajlarının fermantasyon özellikleri ile ilgili bulgular

Yonca silajlarında açım sonrası silaj örneklerinde bazı özelliklere ait saptanan bulgular Çizelge 4.2.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Yonca silajlarında kimyasal analiz sonuçları

Özellikler	Muameleler				P
	Kontrol	PJF	^{ho} LAB	^{het} LAB	
pH	5,44±0,05b	5,63±0,14a	5,43±0,05b	5,40±0,35b	<0.05
KM, %	60,60±0,60	61,43±5,93	59,72±0,45	57,50±0,45	Ö.D
SÇK, g/kg KM	21,50±0,50a	15,00±3,00b	17,00±0,00ab	22,00±0,00a	<0.05
NH ₃ -N, g/kg	0,85±0,24	0,80±0,17	0,37±0,02	0,65±0,14	ÖD
NH ₃ -N, g/kg TN	2,77±0,79	2,89±0,83	1,30±0,21	1,97±0,42	ÖD
HP, %KM	19,11±0,05d	19,34±0,02c	20,67±0,01b	19,71±0,01a	<0.01
HK, %KM	8,58±0,04d	9,38±0,02c	9,67±0,03b	11,44±0,02a	<0.01
LA, %KM	1,64±0,01c	1,85±0,09bc	2,58±0,12a	2,03±0,08b	<0.01

PJF: (Pre-Fermented Juice), Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı; ^{ho}LAB: Homofermentatif laktik asit bakterisi; ^{het}LAB: Heterofermentatif laktik asit bakterisi; KM: Kuru madde; SÇK: Suda çözünebilir karbonhidrat; NH₃-N: Amonyaga bağlı nitrojen; HP: Ham protein; HK: Ham kül; LA: Laktik asit.

Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.

Silaj fermantasyonu sırasında oluşan pH, NH₃-N ve laktik asit miktarı fermantasyonun kalitesini belirlemektedir. Özellikle pH ve NH₃-N miktarları düşük, laktik asit/asetik asit oranları yüksek silajlar iyi fermente olmuş silajlar olarak kabul edilebilirler (Filya 2007).

4.2.1.1. pH

Anaerobik fermantasyonun ilk aşamalarında, amaca uygun laktik asit fermantasyonunun gelişebilmesi bakımından önem taşıyan taze materyalinin pH'sındaki değişimlerin yanı sıra, son ürünün sahip olduğu pH değeri de silaj KM tüketimi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Stallings ve ark. (1981) 'nın bildirdiğine göre yonca silajlarında silaj yapılmadan önce 5,8 ve 6,0 oranlarında tespit edilen pH değerinin silaj yapıldığı durumda 4,5 – 4,7 arasında değişim göstermesi beklenmektedir.

Araştırmada başlangıç materyalinde 5,75 olarak saptanan pH seviyeleri silolama sonrasında tüm muamele gruplarında düşüş göstermiştir. pH değeri bakımından muamele grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli (P < 0,05) olup, PJF grubu 5,63 değeri ile en yüksek pH'ya sahip olan gruptur. En düşük pH değeri ise 5,40 değeri ile Kontrol ve ^{het}LAB katkılı grupta tespit edilmiştir.

4.2.1.2. KM

Çizelge 4.2.'den de görüldüğü gibi muamele gruplarında gözlenen KM düzeyleri % 57,50 ile % 61,43 arasında değişim göstermektedir.

KM düzeyleri bakımından muamele grupları arasındaki fark istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur. En düşük KM değeri % 57,50 ile ^{het} LAB grubunda, en yüksek KM değeri ise % 67,43 ile PJF katkılı grupta tespit edilmiştir.

Kır ve Soya (2008), vejetasyonun %10-25 çiçeklenme döneminde hasat ettikleri mera tipi 5 yonca çeşidi (Osam, Victoria, Cinna, Mielga, Kayseri)'nin KM sırasıyla %19.15-21.52 arasında saptamışlardır. Akbari ve Avcıoğlu (1992) ise yonca çeşitlerinin KM içeriklerinin %19.8-25.1 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Aksoy ve Yılmaz (2003) yapmış oldukları bir araştırmada; birinci ve ikinci biçim dönemlerinde hasat ettikleri sekiz yonca varyetesinin, *in vitro* KM ve organik madde sindirilme derecesinin ise sırasıyla % 45.65-58.50 ve % 39.04-54.21 arasında değiştiğini bildirirken, Rihawi ve ark. (1983) de, *Vicia sativa*, *Lathyrus sativus*, *Pisum sativum* ve *Medicago rigudula*'da çiçeklenme başlangıcı döneminde, *Medicago rigudula*'da KM veriminin 795 kg/ha; *Vicia sativa*'da KM veriminin 825 kg/ha; *Lathyrus sativus*'ta KM veriminin 445 kg/ha; *Pisum sativum*'da ise KM oranları 630 kg/ha olduğunu tespit etmişleridir. Açıkgöz (1995), yoncanın çok genç biçim devresinde KM içerikleri %15,0; genç devrede %18,9; tam çiçeklenme devresinde ise % 24,0; bakla bağlama devresinde ise % 28,0 içerdiğini saptadığı gözlenmiştir. Araştırmamızda saptanan KM değerleri ile diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur. KM değerlerinin yüksek olmasının sebebi yonca silajlarının balyalanmadan 24 saat soldurma yapılmasından kaynaklanmaktadır.

4.2.1.3. NH₃-N

Silajı yapılacak bitkinin kapatılması sonrasında da, proteinlerin bitkisel enzimler aracılığı ile parçalanımı devam eder. Proteolitik aktivitenin boyutları ve bu bağlamda da proteinlerin yıkım miktarı ortamdaki asidik koşullarla ilişkili olup, silolamanın başlangıcındaki kritik dönemde pH değerindeki düşüşün hızı önemli bir faktördür (Pettersson 1988, McDonald ve ark. 1991, Davies ve ark. 1998). Çalışmada protein parçalanımının bir ölçütü olarak ele alınan NH₃-N içerikleri bakımından, muamele gruplarına değerlendirildiğinde en düşük NH₃-N değerinin % 0,37g/kg ile ^{ho}LAB grubunda olduğu saptanmıştır. En yüksek değer ise % 0,85 g/kg ile kontrol grubundadır. Muameleler arasındaki fark ise istatistiksel anlamda önemli değildir (P>0,05). Bu parametre kullanılan katkı

maddelerinin özel bir etki yaratmadığını görüşünü ön plana çıkarmakta olup, konuya ilişkin bildirilişlerle de uyum göstermektedir (Chen ve ark. 1994).

4.2.1.4. SÇK

SÇK içerikleri bakımından Çizelge 4.2.'de de görüldüğü gibi silolama öncesi taze yonca otunda SÇK değeri 42,00 g/ kg KM olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarında SÇK değerlerinde düşüş saptanmıştır. En düşük SÇK değeri 15,00 g/kg KM ile PJF katkılı grupta, en yüksek SÇK içeriği ise ^{het}LAB karışım grubunda 22,00 g/kg KM değeri ile bulunmuştur. SÇK içeriği bakımından muamele grupları arasındaki fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P<0,05).

SÇK miktarları için elde edilen bulgular literatür bildirişleriyle karşılaştırıldığında; Cai ve ark. (1999)'nın bazı yem bitkilerinde laktik asit bakterileri kullanarak yaptıkları çalışmada biçilmiş yoncada saptadıkları SÇK miktarını 38,7 g/kg KM olarak bildirmişlerdir. Filya ve ark. (2001) yapmış oldukları bir çalışmada bildirdikleri değer 32 g/kg KM değeri ile çalışmada saptadığımız değerler ile benzerlik göstermektedir.

4.2.1.5. HP

HP içeriği bakımından Çizelge 4.2.'de de görüldüğü gibi silolama öncesi taze yonca otunda HP değeri KM 'de % 18,19 olarak bulunmuştur.

Silolama dönemi sonrasında muamele gruplarında. HP değerleri sırasıyla Kontrol, PJF, ^{ho}LAB ve ^{het}LAB KM'de de %19,11, 19,34, 20,67 ve 19,71 olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarında, HP içeriği bakımından fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P<0,01). En yüksek HP içeriği % 20,67 KM değeri ile ^{ho}LAB grubunda saptanırken, en düşük HP içeriği ise %19,11 KM ile kontrol grubunda tespit edilmiştir.

Saptanan bulgular diğer literatürlerle karşılaştırıldığında; Nadeau ve ark. (2000)'nın yoncada farklı çiçeklenme dönemlerinde hasat edilen yoncada HP içeriklerini KM' de % 23,3, 18,6 ve 16,3, Elizalde ve ark. (2009) yonca hasıllarında HP değerini %15,80 olarak, Cai ve ark. (1999) izole laktik asit kullanılarak silajı yapılan yem bitkilerinde fermantasyon özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada yonca hasıllarında HP değerini % 15,83 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Denek ve ark. (2012) fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının yonca silaj kalitesine etkileri konulu araştırmasında HP değerini muamele gruplarında % 22,9-23,36 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmada saptanan HP değerleri ile diğer araştırmalardan elde edilen değerlerin uyumlu olduğu görülmektedir.

4.2.1.6. LA

Çizelge 4.2.' de de görüldüğü gibi LA içerikleri bakımından gözlenen değerler %1,64 KM ve % 2,58 KM aralığında değişmektedir.

En yüksek LA içeriğinin % 2,58 KM ile ^{ho}LAB, en düşük laktik asit içeriğinin %1,64 KM ile PJF katkılı grupta elde edildiği çalışmada muamele gruplarının LA değeri üzerindeki etkisinin istatistiksel anlamda önemli düzeyde olduğu saptanmıştır (P<0,01). Filya ve ark. (2007), yapmış oldukları bir çalışmada birinci ve ikinci biçim dönemlerinde yapılan yoncanın kontrol ve 14 farklı LAB katkısı gruplarında sırasıyla birinci biçim dönemi için laktik asit içeriklerini sırasıyla 40.5 ve 45.9-83.5 g/kg KM, ikinci biçim döneminde ise laktik asit içeriklerini aynı sıra ile 86.5 ve 61.5-86.0 g/kg KM; Nadeau ve ark. (2000)'nın yonca bitkisine *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus cereviseae* ile selülaz enziminin (2, 10 ve 20 ml selülaz /kg) farklı dozlarını içeren LAB+enzim inokulantını uyguladıkları çalışmalarında silolamanın 60. gününde çiçeklenme öncesi dönemi için kontrol ve inokulant gruplarındaki silajların laktik asit içeriklerini 49.9 ve 71.7-74.9 g/kg KM, çiçeklenme başlangıcında 30.9 ve 50.1-67.1 g/kg KM, çiçeklenme sonunda ise 47.5 ve 62.9-64.4 g/kg KM olduğunu bildirmektedirler.

Silaj katkı maddesi olarak eklenen PJF'nin yonca silajlarında katkı maddesi olarak kullanıldığı bazı araştırmalarda LA üretimin artırarak silaj kalitesini yükselttiği görülmüştür (Ohshima ve ark. 1997, Cao ve ark. 2002, Wang ve ark. 2009, Denek ve ark. 2012). Yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini temsil eden LA ile ilgili olarak araştırmalardan elde edilen veriler, benzer konuda yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar ile uyum içerisindedir (Weinberg ve ark. 1993, Filya ve ark. 2000, Filya ve ark. 2001).

4.2.2. Yonca silajlarının mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili bulgular

Araştırmanın 150. gününde gerçekleştirilen açım sonrası silaj örneklerinde mikrobiyolojik analizlere ait bulgular Çizelge 4.3'de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Yonca silajlarında mikrobiyolojik analiz sonuçları, log₁₀ cfu/g TM

Özellikler	Muameleler			
	Kontrol	PJF	^{ho} LAB	^{het} LAB
TMAB	5,31±0,70	5,17±1,69	5,22±0,50	5,47±0,77
LAB	5,19±0,65	5,01±1,71	5,20±0,42	5,25±1,12
Koliform	0	0	0	0
Maya ve küf	2,65±0,34	3,30±0,30	2,15±1,15	2,15±1,15

PJF: (Pre-Fermented Juice), Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı; ^{ho}LAB: Homofermentatif laktik asit bakterisi; ^{het}LAB: Heterofermentatif laktik asit bakterisi; LAB: Laktik asit bakterisi; TMAB: Toplam mezofilik bakteri; cfu/g:

En yüksek TMAB 5,47 log₁₀ cfu/g ile ^{het}LAB kullanılan grupta, en düşük TMAB sayısı ise 5,17 log₁₀ cfu/g ile PJF grubunda elde edilmiştir. Muamele grupları arasındaki farklılıklarda istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05).

Çalışmada silaj kalitesi bakımından önem taşıyan LAB sayısına ilişkin olarak saptanan değerler incelendiğinde, en yüksek değer 5,25 log₁₀ cfu/g ile ^{het}LAB grubunda, en düşük değer ise 5,01 log₁₀ cfu/g ile PJF grubunda elde edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05).

Araştırmada 90 günlük silolama dönemi sonrasında açılan silajlarda koliform bakterisi tespit edilmemiştir.

En yüksek maya ve küf sayısı 3,30 log₁₀ cfu/g ile PJF kullanılan grupta, en düşük maya ve küf sayısı ise 2,15 log₁₀ cfu/g ile ^{ho}LAB ve ^{het}LAB grubunda elde edilmiştir. Muamele grupları arasındaki farklılıklarda istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05).

Silajlarda görülen mikrobiyal büyüme oldukça normal olup, silajların içerdiği maya ve küf sayıları oldukça düşük düzeyde bulunmuştur. Weinberg ve ark. (1993), başlangıç pH'sı 5,9 olan ve KM'si %40,6 mısır bitkisine laktik asit bakteri inokulantının uyguladıkları çalışmalarında, silolamanın 45. gününde kontrol ve LAB içeren gruplarda lactobacilli sayılarını 4,0 ve 5,5 cfu/g; maya sayılarını 4,7 ve 5,4 cfu/g; küf sayılarını ise 0 ve 5,0 cfu/g olarak saptamışlardır. Bunun yanında LAB inokulantlarının maya sayılarını düşürdüğü sonucuna varan Filya ve ark. (2000), süt olum döneminde hasat edilen buğday silajlarının,

silolamanın 65. gününde kontrol, *L. Plantarum* + *Enterococcus faeaceum* ve *L. Pentosus* içeren gruplarda maya sayıları ile ilgili verilerin 3,4, 0,0 ve 0,0 log₁₀ cfu/g şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Filya ve ark. (2001)'nın farklı düzeylerde enzim kullandıkları yoncalarda silolamanın 50. gününde lactobacilli sayılarını kontrol ve enzim grupları için sırasıyla 7,1 ve 7,2-7,4 log₁₀ cfu/g, maya sayılarını 4,3 ve 4,2-4,5 log₁₀ cfu/g, küf sayılarını 4,1 ve 3,9-4,1 log₁₀ cfu/g arasında saptadıklarını bildirmektedirler.

Yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini temsil eden mikrobiyolojik analizler sonuçları ile ilgili olarak araştırmalardan elde edilen veriler, benzer konuda yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar ile uyum içerisindedir (Weinberg ve ark. 1993, Filya ve ark. 2000, Filya ve ark. 2001).

4.3. LAB'lerinin İdentifikasyon Testi

4.3.1. Karbonhidrat metabolizmaları (API 50 CHL) sonuçlarına göre LAB izolatlarının tanımlanması

Araştırmada elde edilen tüm laktik asit bakterileri gram pozitif ve katalaz negatif olarak belirlenmiştir.

Ek 1'de fenotipik özellikleri verilen izolatlardan 15 adedi seçilerek API 50 CHL testi uygulanmıştır. API 50 testi sonuçlarına göre izolatlardan 7 adedi *Lactobacillus plantarum*, 5 adedi *Lactobacillus pentosaceus*, 3 adedi *Lactobacillus collinoides* olarak tanımlanmıştır.

Santos ve ark. (2011) (*Brachiaria decumbens* cv. *Basiliski*) tropikal otlardan izole ettikleri LAB sonuçlarında ağırlıklı olarak *Lactobacillus plantarum* tespit etmişlerdir. Lin ve ark. (1992) ve Tjandraatmadja ve ark. (1994) yaptıkları çalışmalarda mısır ve yoncalarda izole ettikleri LAB izolatlarında homofermantatif dominant olarak *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosaceus* türlerini tespit etmişlerdir.

4.3.2. Silajların aerobik stabiliteyi

Silolamanın son döneminde açılan silajlara ait 5 günlük aerobik stabilite testi sonuçları Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Yonca silajlarının aerobik dayanıklılık test sonuçları

Özellikler	Muameleler				P
	Kontrol	PJF	^{ho} LAB	^{het} LAB	
pH	5,54±0,05b	5,56±0,03b	5,45±0,03b	5,83±0,08a	<0.05
CO ₂ , g/kg KM	11,50±1,66a	5,18±1,43bc	4,72±0,62c	10,57±1,76ab	<0.05
TMA, log ₁₀ cfu/g	7,34±0,01a	6,39±0,54ab	5,91±0,02b	7,40±0,79a	<0.05
LAB, log ₁₀ cfu/g	3,84±0,48	4,64±0,43	4,43±0,11	4,70±0,63	ÖD
Koliform, log ₁₀ cfu/g	3,72±0,05ab	3,48±0,30b	3,80±0,48ab	4,59±0,11a	<0.05
Maya ve Küf, log ₁₀ cfu/g	5,13±0,06b	3,80±0,10d	4,55±0,34c	5,37±0,35a	<0.01

PJF: (Pre-Fermented Juice), Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı; ^{ho}LAB: Homofermentatif laktik asit bakterisi; ^{het}LAB: Heterofermentatif laktik asit bakterisi; TMA: Toplam mezofilik bakteri; LAB: Laktik asit bakterisi. Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.

Araştırma da kullanılan katkı maddeleri yonca silajlarının aerobik stabilitelelerini üzerinde etkili olmuşlardır. Beş gün boyunca doğrudan havanın oksijenine maruz bırakılan silajların pH değerlerinde bir miktar yükselme görülmüştür. Silajların hava ile temas ettikleri 5 günlük dönem süresince silajların pH değerleri, ürettikleri CO₂ miktarı ve TMA, koliform bakterileri açısından muamele grupları arasında fark istatistiki anlamda önemli bulunmuştur (P<0.05). Maya ve küf değerleri açısından, muamele grupları arasında fark ise (P<0.01) seviyesinde önemli bulunmuştur.

LAB inokulantların silajların aerobik dayanıklılığı (silo ömrü) üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırma sonuçlarında, bazı araştırmacılar LAB inokulantların silajların aerobik dayanıklılıklarını arttırdığını bildirirken (Weinberg ve ark. 1993, Meeske ve Basson 1999), bazı araştırmacılar ise etkilemediğini (Moran ve ark. 1996) veya aerobik dayanıklılığı düşürerek, silajlarda gözle görülür bir küflenme ve yoğun karbondioksit gazı üretimine neden olduklarını bildirmişlerdir (Stokes ve Chen 1994, Meeske ve Basson 1998, Filya ve ark. 2001, Filya 2002b, Polat ve ark. 2005).

4.3.3. Yonca silajlarının hücre duvarı bileşenlerine ait bulgular

Araştırmanın 90. gününde gerçekleştirilen açım sonrası silaj örneklerinde hücre duvarı bileşenleri analizlerine ait bulgular Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Yonca silajlarında hücre duvarı bileşenlerine ait analiz sonuçları, % KM

Özellikler	Muameleler			
	Kontrol	PJF	^{ho} LAB	^{het} LAB
NDF	37,08±0,21a	37,37±0,34a	35,96±0,91a	37,08±1.05
ADF	28,71±2.00	32,96±1,57	31,56±0.80	31,02±0,02b
ADL	4,86±0,82	5.01±0,50	5,37±0,05	6,98±0,58
HEMİSELÜLOZ	23,71±1,18	27,18±0,75	26,00±0,79	30,02±0,47
SELÜLOZ	23,68±0,02	23,21±0.00	24,06±0,03	21,66±0.01

PJF: (Pre-Fermented Juice), Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı; ^{ho}LAB: Homofermentatif laktik asit bakterisi; ^{het}LAB: Heterofermentatif laktik asit bakterisi; NDF: Nötral çözücülerde çözünmeyen karbonhidratlar; ADF: Asit çözünmeyen karbonhidratlar; ADL: Asit çözücülerde çözünmeyen lignin; Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.01).

Çizelge 4.5.' de de görüldüğü gibi NDF içerikleri bakımından gözlenen değerler %37,37 KM ve %31,02 KM aralığında değişmektedir.

En yüksek NDF içeriğinin %37,37 KM ile PJF, en düşük NDF içeriğinin %31,02 KM ile ^{het}LAB katkılı grupta elde edildiği çalışmada muamele gruplarının NDF değeri üzerindeki etkisinin istatistiksel anlamda önemli düzeyde olduğu saptanmıştır (P<0,01).

ADF, ADL, hemiselüloz ve selüloz değerleri incelendiğinde bu parametreler açısından muamele grupları arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

Elde edilen bulgular literatür bildirişleri ile karşılaştırıldığında, çiçeklenme başlangıcı dönemlerinde hasat edilen yoncanın NDF ve ADF içeriklerinin Filya (2001)'nin bildirdikleri sırasıyla KM' %39,1 ve 29,2 ile benzerlik göstermiştir.

Kaba yemlerde vejetasyonun ilerlemesine bağlı olarak sadece NDF fraksiyonunda bulunan hemiselülozun miktarının nispi olarak azaldığı, NDF ve ADF fraksiyonunun da bulunan selüloz ile NDF, ADF ve ADL fraksiyonunda bulunan lignin miktarlarının ise arttığı ifade edilirken, hemiselülozun miktarının selülozdan az olmasına rağmen sindirilebilirliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Ligninin ise, hemiselüloz ve selülozdan miktar bakımından az olmasına rağmen kendisi sindirilmediği için bu iki komponentle oluşturduğu bağlar nedeniyle bunların sindirilebilirliklerini de düşürdüğü bilinmektedir (Kirchgessner 1980, Ögün ve ark. 2003).

Nadeau ve ark. (2000) yonca bitkisinde *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus cereviseae* ile selüloz enziminin (2, 10 ve 20 ml selüloz /kg) farklı dozlarını içeren LAB+enzim inokulantının fermantasyon süresince etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 60. günlük silolama sonrasında çiçeklenme öncesi dönemi için kontrol ve LAB+enzim gruplarındaki silajların NDF miktarlarını sırasıyla %35,1 ve 28,4-32,5, selüloz miktarlarını %19,9 ve 15,6-17,8, hemiselüloz miktarlarını %8,1 ve 6,4-7,1; çiçeklenme başlangıcında aynı sırayla NDF miktarlarını %37,9 ve 33,8-34,9, selüloz miktarlarını %21,2 ve 18,4-19,6, hemiselüloz miktarlarını %8,8 ve 7,4-8,2; çiçeklenme sonunda ise yine aynı sırayla NDF miktarlarını %43,6 ve 37,9-40,9, selüloz miktarlarını %19,9 ve 15,6-17,8, hemiselüloz miktarlarını %8,7 ve 7,8-8,8 olarak bildirdikleri değerler ile araştırmamızdan elde edilen bulguların uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

4.3.4. Yonca silajlarının enzimatik yöntem ile OM sindirilebilirliğine ait bulgular

Araştırmanın 90. gününde gerçekleştirilen açım sonrası silaj örneklerinde *in vitro* OM sindirilebilirliğine ait analiz sonuçları Çizelge 4.6’de sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Yonca silajlarının *in vitro* OM sindirilebilirlik özellikleri, (%)

Uygulama	OMS
Taze materyai	76,75
Kontrol	71,54±1,02b
PJF	72,56±1,32b
^{ho} LAB	71,65±1,14b
^{het} LAB	77,03±0,55a

PJF: (Pre-Fermented Juice), Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı; ^{ho}LAB: Homofermentatif laktik asit bakterisi; ^{het}LAB: Heterofermentatif laktik asit bakterisi; OMS: Organik madde sindirilebilirliği.

Aynı sütünde farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

Çizelge 4.6’da verildiği gibi, uygulama gruplarında sırasıyla, kontrol, PJF, ^{ho}LAB, ^{het}LAB katkı maddesi kullanılan gruplarda *in vitro* OM sindirilebilirliği sırasıyla, %71,54, %72,56, % 71,65 ve % 77,03 olarak bulunmuştur.

Organik madde sindirilebilirliğine ilişkin olarak saptanan değerler incelendiğinde, en yüksek OM sindirilebilirliği %77,03 ile ^{het}LAB grubunda, en düşük değer ise %71,54 ile

kontrol grubunda elde edildiği çalışmada, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Laktik asit bakterileri inokulantları ve PJF yonca silajlarında in vitro OM sindirilebilirliğini özellikle ^{het}LAB olumlu düzeyde etkilemiştir.

Denek ve ark. (2011) birinci biçim yonca silajlarına PJF ilavesinin silaj fermantasyonu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, PJF içeren grupların in vitro OM sindirilebilirliğini kontrol grubuna göre ($P<0.05$) daha yüksek tespit etmişlerdir.

Nadeau ve ark. (2000) yonca bitkisinde, sellülaz enzimi, *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus cereviseae* ile selülaz enziminin (2, 10 ve 20 ml selülaz /kg) farklı dozlarını içeren LAB+enzim inokulantının fermantasyon süresince etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 60. günlük silolama sonrasında çiçeklenme öncesi dönemi için kontrol, enzim ve LAB+enzim gruplarındaki silajların in vitro KM sindirilebilirliğini sırasıyla %67,4, 67,6 ve 67,7-67,9; çiçeklenme başlangıcında aynı sırayla %64,8, 63,9 ve 64,7-64,9; çiçeklenme sonunda ise yine aynı sırayla %60,8, 61,0 ve 60,8-61,4 olarak bildirdikleri değerler ile araştırmamızdan elde edilen bulguların daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada melasla hazırlanmış PJF (fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı) ve iki ticari inokulant katkı maddesi olarak yonca balya silajlarına ilave edilmiştir.

Araştırmada katkı maddelerinin yonca balya silajlarının kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile hücre duvarı bileşenleri ve aerobik stabilite üzerine etkileri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra söz konusu katkıların in vitro OM sindirilebilirliğini nasıl etkiledikleri araştırılmıştır. Aynı zamanda kullanılan katkı maddelerinin LAB tanımlanması yapılmıştır.

Fermantasyon dönemi süresince PJF'li silajların özellikle pH değerleri ve maya sayıları daha yüksek kalırken, buna karşın SÇK değerleri ve LAB sayıları daha düşük tespit edilmiştir. Uygulanan katkı maddesi hücre çeperi bileşenleri ve OM sindirilebilirliği açısında ise herhangi bir etki yaratmamıştır.

Aerobik stabiliteye ilişkin değerlendirme sonuçları dikkate alındığında; PJF'li silajların CO₂ üretimi, koliform bakteri sayıları ve maya değerlerinin az olması dikkat çekicidir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, taze PJF'nin doğrudan homofermantatif özellikte LAB kaynağı olarak kullanılabilmeğini göstermektedir. Ancak bu çalışmada, yonca silajlarına soldurma yapılmış olmasının silaj kalitesini olumlu yönde etkilemiş olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Açıkgöz E (1995). Yembitkileri (II. Baskı). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi No: 7-025-0210, Bursa.
- Adams MR, Moss MO (2000). Food Microbiology. 2nd ed. The Royal Society of Chemistry.
- Akbari N, Avcıoğlu R (1992). Ege Bölgesine Uygun Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Agronomik Özellikleri ile Yem Kaliteleri Üzerinde Araştırma, Doktora Tezi, Bornova-Izmir.
- Aksoy A, Yılmaz A (2003). Bazı Yonca Varyetelerinde Kuru Madde ve Organik Madde Sindirilebilirlikleri ve Metabolik Enerji Değerleri. Tarım Bilimleri Dergisi 9 (4) 440-444.
- Akyıldız AR (1984). Yemler Bilgisi Laboratuvar Kılavuzu. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 895, Ders Kitabı: 213, 236 s, Ankara.
- Anonymus (1986). The Analysis of Agricultural Material, Reference Book: 427, 428 p, London.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B (1991). A Simple System to Determine the Aerobic Determination of Silages. Can. Agric. Eng. 33: 391–395.
- Barry TN, Di Menna ME, Webb ME, Parle JN (1980). Some Observations on Aerobic Deterioration in Untreated Silages and in Silages Made with Formaldehyde-Containing Additives. J. Sci. Food and Agric. 31: 33–146.
- Baumgart J, Fiinhaber J, Spicher G (1986). Microbiologische Unthersuchung von Lebensmitteln. Behr's Varlag Hamburg, Germany.
- Bolsen KK, Bonilla DR, Huck GL, Young MA, Hartthakur RA, Joyeaux A (1996). Effect of a Propionic Acid, Bacterial Inoculant on Fermentation and Aerobic Stability of Whole-Palnt Corn Silage. J. Anim. Sci. 74 (Suppl. 1): 274.
- Bolsen KK, Lin C, Brent B.E, Feyerherm AM, Urban JE, Aimutis WR (1992). Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silage. Journal of Dairy Science Vol 75, Issue 11 November 1992, Pages 3066 – 3083.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M and Kumai S (1999). Effect of Applying Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops on Fermentation Characteristics and Aerobic Deterioration of Silage. J. Dairy Sci. 82: 520–526.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S and Nakase T (1998). Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from Forage Crops on Silage Fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2982–2987.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ (2010). Üzüm Posasının Yonca Silajlarında Karbonhidrat Kaynağı Olarak Kullanılma Olanakları. Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 (2): 269-276.
- Cao LM, Goto M, Karita S, Yamamoto Y, Mizutani M, Deguchi Y, Urakawa S, Maekawa Y, Yamamoto Y, Masuko T (2002). Effect of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on the fermentation quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage and its energy and nitrogen utilization by dry cows. Grassl Sci, 48, 227-235,

- Carpita N (1997). Structure and Biosynthesis of Plant Cell Walls. In: Plant Metabolism, D.T. Dennis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre, and D.B. Layzell (eds.). 2nd ed. Addison Wesley Longman, Essex, England. pp. 124–147.
- Chen J, Stokes MR, Wallace CR (1994). Effects of Enzyme-Inoculant Systems on Preservation and Nutritive Value of Hay Crop and Corn Silages, *J. Dairy Sci.*, 77: 501-512.
- Close W, Menke KH (1986). Selected Topics in Animal Nutrition Universitat, Pp; 170+85, Hohenheim.
- Cooke L (1995). New Strains Slows Silage Spoilage. *Agricult. Res.* 40: 17.
- Çiftçi M, Çerçi İH, Dalkılıç B, Güler T, Ertaş ON (2005). Elmanın Karbonhidrat Kaynağı Olarak Yonca Silajına Katılma Olanağının Araştırılması YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi. 16:2 93-98.
- Daeschel MA, Anderson RE, Fleming HP (1987). Microbial Ecology of Fermenting Plant Material. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 357–367.
- Daniel P, Honig H, Weise F, Zimmer E (1970). Wirkung von Propionsäure bei der Grünfuttersilierung. *Wirtschaftseigene Futter.* 16: 239–252.
- Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R (2003). Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 562–567.
- Davidson PM, DG Hoover (1993). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. and A. Von Wright (eds). p. 127, Marcel Decker Inc. New York.
- Davies OD (1996). The Effect of Inoculant Additives on the Fermentation Characteristics of Maize Silage. In: *Proc. 11th Int. Silage Conference*, Aberystwyth, Wales. pp. 156–157.
- Davies DR, Merry RJ, Williams AP, Bakewell EL, Leemans DK, Tweed JKS (1998). Proteolysis During Ensilage of Forages Varying in Soluble Sugar Content, *J. Dairy Sci.* 81, 444-453.
- Dawson KA, Newman KE, Boling JA (1990). Effects of Microbial Supplements Containing Yeast and Lactobacilli on Roughage-Fed Ruminant Microbial Activities. *J. Anim. Sci.* 68: 3392.
- Denek N, Can A, Avci M, Aksu T, Durmaz H (2011). The effect of molasses-based pre-fermented juice on the fermentation quality of first-cut lucerne silage. *Grass and Forage Science* Volume 66, Issue2 pp 243-250, June 2011.
- Denek N, Can A, Avci M, Aksu T (2012). The Effect of Fresh and Frozen Pre-Fermented Juice on the Fermentation Quality of Alfalfa Silage. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 18 (5): 785-790.
- Devriese LA, Collins MD, Wirth R (1992). The Genus *Enterococcus*. In: *The Prokaryotes*. A. Baalows, HG Truper, M Dworkin, W Harder, KH Schleifer (eds): 2nd ed. Springer-Verlag, New York. pp. 1465–1481.
- Dhiman TR, Wacek CM and Satter LD (1991). Inoculation of Alfalfa Silage with *Lactobacillus plantarum*. *United States Dairy Forage Research Center Research Summaries*. Madison, WI, USA. pp. 55.

- Driehuis F, Oude-Elferink SJWH and Spoelstra SF (1999). An Aerobic Lactic Acid Degradation During Ensilage of Whole Crop Maize Inoculated with *Lactobacillus buchneri* Inhibits Yeast Growth and Improves Aerobic Stability. *J. Appl. Microbiol.* 87: 583–594.
- Elizalde HF, Henriquez RI (2009). Effects of Alfalfa Haylage Harvesting Systems on Dry Matter Intake and Feeding Behaviour of Eaat Friesland Ewes in Late Pregnancy *Arch Med Vet.* 41, 107 – 113.
- Filya İ (2000). Bazı Silaj Katkı Maddelerinin Ruminantların Performansları Üzerindeki Etkileri *Hayvansal Üretim* 41: 76–83.
- Filya İ, Ashbell G, Hen Y and Weinberg ZG (2000). The Effect of Bacterial Inoculants on The Fermentation and Aerobic Stability of Whole Crop Wheat Silage. *Animal Feed Sci. Technology*, 88:39-46.
- Filya İ, Ashbell G, Weinberg ZG, Hen Y (2001). Hücre Duvarını Parçalayıcı Enzimlerin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri, Hücre Duvarı Kapsamı ve Aerobik Stabiliteleri Üzerine Etkileri. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Tarım Bil. Dergisi* 7 (3): 81-87.
- Filya İ (2001). Silaj Teknolojisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 16059, Görükle, Bursa.
- Filya İ (2002a). Laktik Asit Bakteri ve Laktik Asit Bakteri+Enzim Karışımı Silaj İnokulantlarının Mısır Silajı Üzerine Etkileri. *Turk J Vet Animal Sci*, 26:679-687.
- Filya İ (2002b). Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Mısır ve Sorgum Silajlarının Fermantasyon, Aerobik Stabiliteleri ve in situ Rumen Parçalanabilirlik Özellikleri Üzerine Etkileri. *Turk J Vet Animal Sci*, 26:815-823.
- Filya İ, Sucu E (2003). Formik Asit Temeline Dayalı Bir Koruyucunun Mısır ve Sorgum Silajlarının Aerobik Stabiliteleri Üzerine Etkisi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zotečni Bölümü*.
- Filya İ (2003). The Effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without Homofermentative Lactic Acid Bacteria, on the Fermentation, Aerobic Stability and Ruminal Degradability of Wheat, Sorghum and Maize Silages. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1080–1086.
- Filya İ, Sucu E ve. Hanoğlu H (2004b). Biyolojik Silaj Katkı Maddeleri Kullanılarak Yapılan Küçük Plastik Balya Mısır Silajlarının Kalite Özellikleri, Yem Değeri ve Kuzu Besisinde Kullanımı Üzerine Araştırma. *A.Ü Zir. Fak. Tarım Bilim. Derg.* 10 (2): 158–162.
- Filya İ, Sucu E and Karabulut A (2006). The Effect of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation, Aerobic Stability and Ruminal Degradability of Maize Silage. *J. Appl. Microbiol.* 101: 1216–1223.
- Filya İ (2007). Ülkemizde Silaj Yapımı ve Silaj Kalitesinin Artırılma Yolları. *Yem Magazin*, Mart, 2007, 47:37-44.
- Filya İ, Muck RE, Contreras-Govea FE (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. *J Dairy Sci*, 90(11): 5108-5114.
- Fitzsimons A, Hols P, Jore J, Leer RJ, M.O'connell, Delcour J (1994). Development of an Amyolytic *Lactobacillus plantarum* Silage Strain Expressing the *Lactobacillus amylovorus* α -amylase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3529–3535.

- Fry SC (1985). Primary Cell Wall Metabolism. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology. 2: 1–42.
- Gilliand SE, Sandine WE, Vedamuthu ER (1984). Acid Producing Microorganism, Part 16, In: Compendium of Methods for The Examination of Foods, (APHA), Ed: M.L. Speck, Washington, D.C., USA, 184-196.
- Gordon FJ (1989). An Evaluation through Lactating Cows of a Bacterial Inoculant as an Additive for Grass Silage. Grass Forage Sci. 44: 169.
- Hammes WP, Weiss N, Holzappel W (1992). The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. In: The Prokaryotes, A. Baalows, H.G.
- Henderson N (1992). Silage additives. Proceeding of the Third Spring Conference. Edinburg, 41-60.
- Holzappel WH, Schillinger U (1992). The Genus Leuconostoc. In: The Prokaryotes, A. Baalows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (eds), 2nd ed. Springer-Verlag, New York. pp. 1508–1534.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H , Braun R (2003). The Role of Lactobacillus buchneri in Forage Preservation. Trends in Biotechnol. 21(6): 282–287.
- Johnson LM, Harrison JH, Davidson D, Mahana WC, Shinnors K (2003). Corn Silage Management: Effect of Hybrid, Maturity, Inoculation and Mechanical Processing on Fermentation Characteristics. J. Dairy Sci. 86: 287–308.
- Jones BA, Hatfield RD , Muck RE (1992). Effect of Fermentation and Bacterial Inoculation on Lucerne Cell Walls. J. Sci. Food Agric. 60: 147–153.
- Keady TWJ, Steen RWJ, Kilpatrick DJ, Mayne CS (1994). Effects of Inoculant Treatment on Silage Fermentation, Digestibility and Intake by Growing Cattle. Grass Forage Sci. 49: 284–294.
- Kent BA, Arambel MJ, Walters JL (1988). Effect Of Bacterial Inoculant on Alfalfa Haylage: Ensiling Characteristics and Milk Production Respons When Fed to Dairy Cows in Early Lactation. J Dairy Sci 71:2457-2561
- Kılıç A (1986). Silo Yemi (Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri). 327 s., İzmir.
- Kır B, Soya H (2008). Kimi Mer'a Tipi Yonca Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 45 (1): 11-19.
- Kim JG, Ham JS, Chung ES, Sed S, Lee JK (2005). Effect of New Microbial Strain as an Inoculant on the Quality of Maize Silage. In: Proc. 20th Int. Grassland Congress, Belfast, North Ireland, UK. pp. 478.
- Kirchgesner M (1980). Hayvan Besleme (Öğretim- Öğrenim- Uygulama Önerileri). Çev: Asım KILIÇ, 5. Ed. Ankara (Tübitak 1985).
- Kleinmans J, Hooper P (1999). The Effect of a Commercial Silage Inoculant (Pioneer® brand 1188) on Animal Performance. In: Proc. 12th Int. Silage Conference. Uppsala, Sweden, pp. 319–320.
- Kleinmans J, Hooper P (1999). The Effect of a Commercial Silage Inoculant (Pioneer® brand 1188) on Animal Performance. In: Proc. 12th International Silage Conference. 319-320 p, Uppsala, Sweden.

- Kleinschmit DH, Kung L JR (2006a). A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn, Grass and Small Grain Silages. *J. Dairy Sci.* 89: 4005–4013.
- Kleinschmit DH, Kung L JR (2006b). The Effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the Fermentation of Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 89: 3999–4004.
- Kleinschmit DH, Schmidt RJ and Kung L JR. (2005). The Effects of Various Antifungal Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 88: 2130–2139.
- Klijn N, Nieuwenhof FF, Hoolwerf JD, Van Der Waals CB, Weerkamp AH (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2919–2924.
- Kluyver AJ, Donker HJL (1924). The Unity in the Chemistry of the Fermentative Sugar Dissimilation Processes of Microbes. *Proc. Akad. Wetenschappen Amsterdam, I.*, 28, pp. 297–313.
- Koç F, Coşkuntuna L (2003). Silo Yemlerinde Organik Asit Belirlemede İki Farklı Metodun Karşılaştırılması. *Journal of Animal Production.* 44(2): 37-47.
- Kung L JR (1998). A Review on Silage Additives and Enzymes. In: *Proc. 59th Minneapolis Nutrition Conference, Minneapolis, MN.* pp. 121–135.
- Kung L JR, Chen JH, Kreck EM, Knutsen K (1993). Effect of Microbial Inoculants on the Nutritive Value of Corn Silage for Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 76: 3763–3770.
- Kung L JR, Muck RE (1997). Animal Response to Silage Additives, *Silage: Field to Feedbunk, Vol. NRAES–99. Northeast Regional Agric. Eng. Service, Hershey, PA.* pp. 200–210.
- Kung L JR, Schmidt RJ, Ebling TE and Hu W (2007). The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. *J. Dairy Sci.* 90: 2309–2314.
- Kung L JR, Stokes MR, Lin CJ (2003). Silage Additives. In: *Silage Science and Technology.* D. R. Buxton, R. E. Muck and J. H. Harrison (eds.). *Am. Soc. Agron., Madison, WI.* pp. 305–360.
- Kutlu HR (1995). Tüm Yönleriyle Silaj Yapımı ve Silajla Besleme Çukurova Üni. Ziraat Fakültesi Zootečni B. Adana 1995.
- Lin C, Bolsen K, Brent BE, Hart RA (1992). Epiphytic Microflora on Alfalfa and Whole-Plant Corn. *J. Dairy Sci.*, 75: 2484-2493.
- Lopez-Diaz TM, Alonso C, Roman C, Garcia-Lopez ML, Moreno B (2000). Lactic acid Bacteria Isolated From a Hand-made Blue Cheese. *Food Microbiolgy*, 17:23-32.
- Luther R M (1986). Effect of Microbial Inoculation of Whole-Plant Corn Silage on Chemical Characteristics, Preservation and Utilization by Steers. *J. Anim. Sci.* 63: 1329.
- Malik R, Sharma DD (1998). In Vitro Evaluation of Different Probiotics as Feed Supplement. *Indian J. Dairy Sci.* 51: 357–362.

- Marshall RT (1992). *Standart Methods for The Examination of Dairy Products*. (16th ed.), American Public Health Association, Washington, DC.
- McAllister TA, Feniuk R, Mir Z, Mir P, Selinger LB, Cheng KJ (1997). Noculants for Alfalfa Silage: Effect on Aerobic Stability, Digestibility and the Growth Performance of Feddlot Steers. *Livestock Production Science* 53 (1998) 171 -181.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD (1988). *Animal Nutrition*. 4 th Edition. Longman Scientific and Technical, 543 p.
- McDonald P, Henderson AR, Heron SJE (1991). *The Biochemistry of Silage*. Second Edition. 340 p., Chalcombe Publication, Marlow, England.
- Meeske R, Basson HM (1998). The Effects of a Lactic Acid Bacteria Inoculant on Maize Silage. *Animal Feed Sci. and Technology*, 70: 239-247.
- Middelhoven WJ, Van Baalen AHM (1988). Development of the Yeast Flora of Whole-Crop Maize During Ensiling and During Subsequent Aerobiosis. *J. Sci. Food Agric.* 42: 199.
- Moran J, Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Owen TR (1996). The Effects of Bacterial Inoculant on the Fermantation and Aerobic Stability of Whole Crop Wheat Silage. in: *Proc. 11th International Silage Conference*. 164-165 p, Aberystwyth, Wales.
- Muck RE (1993). The Role of Silage Additives in Making High Quality Silage. In: *Silage Production from Seed to Animal*. Northeast Reg. Agric. Eng. Serv., Syracuse, NY. 67: 106–116.
- Muck RE (1996). A Lactic Acid Bacteria Strain to Improve Aerobic Stability of Silages. In *Research Summaries*. U.S. Dairy Forage Res. Center, Madison, WI. pp. 42–43.
- Muck RE, Filya İ and Contreras-Govea FE (2007). Inoculant Effects on Alfalfa Silage: In Vitro Gas and Volatile Fatty Acid Production. *J. Dairy Sci.* 90: 5115–5125.
- Nadeau EMG, Russell JR, Buxton DR (2000). Intake, Digestibility, and Composition of Orchardgrass and Alfalfa Silages Treated with Cellulase, Inoculant, and Formic Acid Fed to Lambs. *J. Animal Sci.*, 78:2980-2989.
- Naumann C, Bassler R (1993). *Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln*. VDLUFA-Methodenbuch, Band III. 3. Erg., Verlag Naumann, Melsungen.
- Nishino N, Uchida S (1999). Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. *J Sci Food Agric*, 79, 1285-1288.
- Nsereko VL, Smiley BK, Rutherford WM, Spielbauer A, Forrester K.J, Hettinger GH, Harman EK, Harman BR (2008). Influence of Inoculating Forage with Lactic Acid Bacterial Strains that Produce Ferulate Esterase on Ensilage and Ruminant Degradation of Fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145(1–4): 122–135.
- Ohshima M, Cao L, Kimura E, Ohshima Y, Yokota H (1997). Influence of addition of previously fermented juice to alfalfa ensiled at different moisture contents. *Grassl Sci*, 43, 56-58,
- Ohyama Y, Masaki S, Hara S (1975). Factors Influencing Aerobic Deterioration of Silages and Changes in Chemical Composition After Opening Silos. *J. Sci. Food Agric.* 26: 1137–1147.

- Oude-Elferink SJWH, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF (1999). An Aerobic Degradation of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2 propanediol, a Novel Fermentation Pathway in *Lactobacillus buchneri*, Helps to Improve the Aerobic Stability of Maize Silage. In: Proc. Int. SilageConference. Swedish Univ. of Agric. Sci. Uppsala, Sweden. pp. 266–267.
- Öğün S, Şayan Y, Özkul H, Alçiçek A, Akbaş Y, Coşkuntuna L, Soycan S, Polat C, Çapçı T, Kılıç A, Özkan K (2003). Bazı Kaba Yemlerin Yem Değerlerinin Farklı Analiz Teknikleri İle Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi-272, Kesin Rapor, Edirne.
- Özdüven ML, Koç F, Polat C, Coşkuntuna L (2009). The Effects of Lactic Acid Bacteria and Enzyme Mixture Inoculants on Fermentation and Nutrient Digestibility of Sunflower Silage. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(2):157-161.
- Pahlow G (1991). Role of Microflora in Forage Conservation. In: Proc. Conference on Forage Conservation Towards 2000. G Pahlow, H. Honig (eds.). Braunschweig, Germany. pp. 26–36.
- Pahlow G and Honig H (1994). The Role of Microbial Additives in the Aerobic Stability of Silage. In Workshop Proc. the 15th General Meeting of the European Grassland Federation Wageningen, The Netherlands. pp. 149–151.
- Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, SJWH Oude-Elferink, Spoelstra SF (2003). Microbiology of Ensiling. In: *Silage Science and Technology*. DR Buxton, R.E. Muck, J.H Harrison (eds). Crop Sci. Soc. Am., Madison, WI. pp. 31–53
- Palalı H (2007). Laktik Asit Bakterilerinde Transkripsiyon Regülasyonu. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş.
- Pelhate J (1977). Maize Silage. Incidence of Moulds During Conservation. *Folia Veterinaria Latina*. 7: 1–16.
- Petterson K (1988). *Ensiling of Forages: Factors Affecting Silage Fermentation and Quality*, Sveriges Lantbruksuniversitet, 46 p, Uppsala,
- Phipps R, Wilkinson M (1986). *Maize Silage*. 48 p, Chalcombe Publition.
- Polat C, Koç F, Özdüven ML (2005). Mısır Silajında Laktik Asit Bakteri ve Laktik Asit Bakteri+Enzim Karışımı İnokulantların Fermentasyon ve Toklularda Ham Besin Maddelerinin Sindirilme Dereceleri Üzerine Etkileri. *Tekirdağ Zir. Fak. Derg.* 2(1): 13–22.
- Ranjit NK, L. Kung JR (2000). The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 83: 526–535.
- Ranjit NK, Taylor CC and L. Kung JR (2002). Effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation, Aerobic Stability and Nutritive Value of Maize Silage. *Grass Forage Sci.* 57: 73–81.
- Rihawi S, Williams PC, Somaro BH (1983). A Note of Changes in Potential Nutrition Efficiency of Different Legumes at Different Stages of Maturity. Progress Report. *Clovers and Special Purpose Legumes Res.* 16: 92-97.

- Rodrigues MAM, Fonseca AJM, Sequeira CA, Dias da Silva AA (2002). Digestion Kinetic Parameters from an In Vitro Gas Production Method as Predictors of Voluntary Intake of Forage by Mature Ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 95: 133–142.
- Rook AJ, Hatfield RD (2003). Biochemistry of Ensiling. In: *Silage Science and Technology*. DRBuxton, RE Muck, JH Harrison (eds). Crop Sci. Soc., Madison, WI. pp. 95–139.
- Sanderson MA (1993). Aerobic Stability and In Vitro Fiber Digestibility of Microbially Inoculated Corn and Sorghum Silages. *J. Anim. Sci.* 71: 505–514.
- Santos EM, Pereira O, Rasmø G, Ferreira G, Oliveira CLLF, Silva JS, TC Rosa LO (2011). Microbial populations, fermentation profile and chemical composition of signalgrass harvested of different growth ages. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Vol.40, No.4, (October 2010), pp.747-755, ISSN 1806-9290
- Schlatter LK, Smith K (1999). Effects of Mold Growth on Nutrient Availability in Animal Feeds. In: *Four-State Applied Nutrition and Management Conference*. MWPS-4SD5. Iowa State University- Extension, University of Illinois-Extension, University of Minnesota - Extension, University of Wisconsin-Extension. pp. 139–144.
- Schleifer KH and Ludwig W (1995). Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera System. *Appl. Microbiol.* 14: 461–467. 130
- Seale DR, Pahlow G, Spoelstra SF, Lindgren S, Dellaglio F, Lowe JF (1990). Methods for The Microbiological Analysis of Silage, *Proceeding of The Eurobac Conference*, 147. Uppsala.
- Sebastian S, Philip LE, Fellner V and Idziak ES (1989). Comparative Assessment of Bacterial Inoculation and Propionic acid Treatment on Aerobic Stability and Microbial Populations of Ensiled High Moisture Ear Corn. *J. Anim. Sci.* 74: 447–456.
- Shape M.E, Fryer TF, Smith DG (1966). Identification of the Lactic Acid Bacteria. In: *Identification Methods for Microbiologist*. Part A. Gibbs, M.M. and F.A Skinner (eds.). Academic Press, New York.
- Shayan JV, Vov SO, Kartavi AS (1996). Effect of Biological Additive on Quality of Maize Silage and Performance of Silage–Fed Steers. In: *Proc. 11th Int. Silage Conference*, Aberystwyth, Wales. pp. 174–175.
- Soysal Mİ (1998). *Biyometrinin Prensipleri (İstatistik I ve II Ders Notları)*, Yayın No:95, Ders Kitabı No: 64, T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi, 331 s, Tekirdağ.
- Spoelstra SF, Courtin MG, Van Beers JAC (1988). Acetic Acid Bacteria Can Initiate Aerobic Deterioration of Whole Crop Maize Silage. *J. Agr. Sci. Camb.* 111: 127–132.
- Stallings CC, Townes R, Jasse BW, Thomas JW (1981). Changes in Alfalfa Haylage During Wilting and Ensiling with and without Additives. *J. Animal Sci.* 1981 53: 765-773.
- Stokes M, Chen J (1994). Effects of an Enzyme-Inoculant Mixture on the Course of Fermentation of Corn Silage. *J. Dairy Sci.*, 77: 3401-3409.
- Taylor CC, L Kung JR (2002). The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of High Moisture Corn in Laboratory Silos. *J. Dairy Sci.* 85: 1526–1532.

- Temiz A (2008). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınları:96, Yükseköğretim Dizisi: 29:90-93, Ankara.
- Tjandraatmadja M, Norton BW, Macrae IC (1994). Ensilage characteristics of three tropical grasses as influenced by stage of growth and addition of molasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.10, No.9, (August 1994), pp.74-81, ISSN0959-3993.
- Uygur M (2005). Silaj Yapımında Kullanılan Katkı Maddeleri Çiftçi Broşürü.
- Vandenberg PA (1993). Lactic Acid Bacteria, Their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221–238.
- Wang J, Wang JQ, Zhou H, Feng T (2009). Effects of addition of previously fermented juice prepared from alfalfa on fermentation quality and protein degradation of alfalfa silage. *Anim Feed Sci Technol*, 151, 280-290.
- Weinberg ZG and Muck RE (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 53-68.
- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A, Szaka CS G. and Filya İ (2002). Ensiling Whole-Crop Wheat and Corn in Large Containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 28: 7–11.
- Weinberg ZG, Muck RE and Weimer PJ (2003). The Survival of Silage Inoculant Lactic Acid Bacteria in Rumen Fluid. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1066–1071.
- Weinberg ZG, Chen Y and Gamburg M (2004). The Passage of Lactic Acid Bacteria from Silage into Rumen Fluid, *In Vitro* Studies. *J. Dairy Sci.* 87: 3386–3397.
- Weinberg ZG, Shatz O, Chen Y, Yosef E, Nikbahat M, Benghedalia D, Miron J (2007). Effect of Lactic Acid Bacteria Inoculants on *In Vitro* Digestibility of Wheat and Corn Silages. *J. Dairy Sci.* 90: 4754–4762.
- Weiss N (1992). The Genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: *The Prokaryotes*, A. Baalows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (eds). 2nd ed. Springer-Verlag, New York. pp. 1502–1507.
- Whittenbury R (1961). An Investigation of the Lactic Acid Bacteria. Ph.D. Thesis. University of Edinburgh. Edinburgh, Scotland.
- Wieringa GW, Beck T (1964). Investigations on the Use of Cultures of Lactic Acid Bacteria in the Preparation of Silage in the Small Containers. 1. Obtaining Active *Lactobacillus* Cultures for Inoculation Trials. *Das Wirtschaftseigene Futter.* 10: 34–44.
- Wilkinson JM (1999). Silage and Animal Health. *Nat Toxins.* 7: 221–232.
- Wohlt JE (1989). Use of a Silage Inoculant to Improve Feeding Stability and Intake of A Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 72:545.
- Woolford MK, Bolsen KK, Peart LA (1982). Studies on the Aerobic Deterioration of Whole Crop Cereal Silages. *J. Agric. Sci. Camb.* 98: 529.
- Woolford MK (1984). The Chemistry of Silage. In: *The Silage Fermentation*. New York: Marcel Decker. pp. 71–132.

Woolford MK (1990). The Detrimental Effects of Air on Silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 101–116.

Woolford MK and Pahlow G (1998). The Silage Fermentation. In: *Microbiology of Fermented Foods*. Vol 1. Wood B.J.B. (ed.). Blackie Academic & Professional. London. pp. 73–102.

7. EKLER

Ek 1. LAB İzolatlarının API 50CHL Sonuçları ve Tanımlanmaları

Reaktif	İzolat No									
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GYL	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
ERY	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D- ARA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L- ARA	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- XYL	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
L- XYL	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
SBE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MAN	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
SOR	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+

MDM	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
ARB	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
ESC	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SAL	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CEL	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
MEL		+	+	+	-	+	-	-	+	-
SAC	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
TRE	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
TUR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-FUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-FUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D-ARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Tanımlama	Lb. collinoides	Lb. pentosus	Lb. collinoides	Lb. plantarum	Lb. pentosus	Lb. plantarum	Lb. pentosus	Lb. collinoides	Lb. plantarum	Lb. pentosus

+: pozitif reaksiyon; -: Negatif reaksiyon

EK 1'in devamı

LAB izolatlarının API 50 CHL testi sonuçları ve buna göre tanımlanmaları

Reaktif	İzolat No				
	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15
0	-	-	-	-	-
GYL	-	+	-	-	-
ERY	-	-	-	-	-
D-ARA	-	-	-	-	-
L-ARA	+	+	+	+	+
RIB	+	+	+	+	+
D-XYL	+	-	-	+	+
L-	-	-	-	-	-

XYL					
ADO	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+
SBE	-	-	-	+	-
RHA	-	+	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
MDM	+	+	+	+	-
MDG	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+
ARB	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+
MEL	+	-	+	+	-
SAC	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+

INU	-	-	-	-	-
MLZ	+	+	+	+	+
RAF	-	-	+	-	-
AMD	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-
GEN	+	+	+	+	+
TUR	+	-	+	+	-
LYX	-	-	-	-	-
TAG	-	-	+	-	-
D- FUC	-	-	-	-	-
L-FUC	-	-	-	-	-
D- ARL	-	+	-	-	-
L-ARL	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+	+
2KG	-	-	-	-	-
5KG	+	+	+	+	+
Tanımlama	Lb. plantarum	Lb. plantarum	Lb. plantarum	Lb. plantarum	Lb. pentosus

+: pozitif reaksiyon; -: Negatif reaksiyon

TEŞEKKÜR

Bu araştırma sırasında benden yardımlarını esirgemeyen eleştiri ve önerileriyle beni yönlendiren danışman hocam Doç.Dr. Fisun KOÇ'a, manevi desteklerinden dolayı Doç. Dr. M. Levent ÖZDÜVEN'e, Yrd. Doç. Dr. Levent COŞKUNTUNA'ya, mikrobiyolojik analizlerdeki yardımlarından dolayı Araş. Gör. Gülnaz ÇELİKYURT ve Gıda Yüksek Müh. Duygu KORUCU'ya, çalışma materyali sağlama konusunda gerekli desteği veren İbrahim ANAR ve Ender ANAR'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım esnasında sabrı ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan değerli eşim Mehmet Cem AKSOY'a ve kızım Naz AKSOY'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Sevin ÖZTÜRK AKSOY 01.12.1975 tarihinde Ardahan İli Hanak İlçesinde doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Hanak'ta tamamladı. 1993 yılında Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümüne başladı, stajını Malkara Karyem Fabrikasında yaptı ve 1997 yılında okulundan mezun oldu. 1997-1998 eğitim ve öğretim yılında İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesinde Öğretmenlik Pedagojik Formasyonu eğitimi aldı. 1997-1998 eğitim öğretim yılından itibaren çeşitli okullarda yaklaşık 9 yıl fen bilgisi ve sınıf öğretmenliği branşlarında vekil ve ücretli öğretmen olarak çalıştı. Bunun yanı sıra bir ekmek fabrikasında Sorumlu Müdür olarak görev yaptı. 2007 yılında Targel Projesi kapsamında Malkara Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğüne bağlı Deliller Köyü Tarım Merkezine Ziraat Mühendisi olarak atandı ve halen bu görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.