

**SODYUM DİASETAT İLAVESİNİN YONCA
SİLAJLARININ FERMANTASYON
ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Fatma HIŞMAN AKCA

**Yüksek Lisans Tezi
Zootekni Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Fisun KOÇ

Tekirdağ-2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SODYUM DİASETAT İLAVESİNİN YONCA SİLAJLARININ FERMANTASYON
ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Fatma HIŞMAN AKCA

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. FİSUN KOÇ

TEKİRDAĞ – 2019

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Fisun KOÇ danışmanlığında, **Fatma HIŞMAN AKCA** tarafından hazırlanan “**Sodyum Diasetat İlavesinin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri ve Aerobik Stabilitesi Üzerine Etkileri**“ konulu bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından, Zootekni Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. M. Levent ÖZDÜVEN

İmza :

Üye: Dr. Öğretim Üye Hande Işıl AKBAĞ

İmza :

Üye: Prof. Dr. Fisun KOÇ (Danışman)

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SODYUM DİASETAT İLAVESİNİN YONCA SİLAJLARININ FERMANTASYON ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Fatma HIŞMAN AKCA

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fisun KOÇ

Bu araştırma, sodyum diasetat kullanımının yonca silajlarında fermantasyon gelişimi ve aerobik stabiliteyi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada katkı maddesi olarak bileşiminde (asetat ve asetik asit içeren) sodyum diasetat (E262) kullanılmıştır. Araştırma, katkı maddesi ilave edilmeyen kontrol, 3, 5 ve 7 g/kg sodyum diasetat ilave edilerek oluşturulan 4 grupta yürütülmüştür. Kontrol grubuna diğer muamele gruplarına eşdeğer 20 ml çeşme suyu ilave edilmiştir. Katkı maddelerinin ilavesinden sonra, yaklaşık 500g örnek plastik torbalara konularak sıkıştırılmış ve vakumla içindeki hava alınmıştır. Her grup için 10'ar tane olmak üzere toplam 40 paket silaj laboratuvar şartlarında (25-30 °C) 45 gün fermantasyona bırakılmıştır. Silolamadan 45 gün sonra açılan tüm silajlarda kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Silolama döneminin sonunda (45. gün) tüm silajlara 7 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır. Ayrıca silajlarda fermantasyonun 45. gün ve aerobik stabilite dönemi sonrası laktik asit bakterilerinin tanımlaması yapılmıştır. Sonuç olarak, yonca silajına ilave edilen sodyum diasetat silajlardaki laktik ve asetik asit içeriklerini artırırken, proteolizi de önlemiştir. Ayrıca sodyum diasetat yüksek anti bakteriyel aktivite göstererek silajların 7 günlük aerobik dönem boyunca maya ve küf popülasyonları ile CO₂ üretimlerini düşürmüş ve aerobik stabiliteyi geliştirmiştir.

Anahtar kelimeler: Aerobik stabilite, laktik asit bakterileri, sodyum diasetat, tanımlama

2019, 42 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

THE EFFECTS OF SODIUM DIACETATE ADDITION ON THE FERMENTATION CHARACTERISTICS AND AEROBIC STABILITY OF ALFALFA SILAGES

Fatma HIŞMAN AKCA

Tekirdag Namık Kemal University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Fisun KOC

This study was carried out to determine the effects of sodium diacetate on the fermentation characteristics and aerobic stability in alfalfa silages. In the study, sodium diacetate (E262) was used as an additive in its composition (containing acetate and acetic acid) was used. The study was carried out in 4 groups formed by the addition of 3, 5 and 7 g / kg sodium diacetate. To the control group, 20 ml of tap water equivalent to the other treatment groups was added. After the addition of the additives, approximately 500 g of sample was placed in plastic bags and compressed. A total of 40 packages, 10 for each group, were allowed to ferment for 45 days in laboratory conditions (25-30 °C). All silages were sampled for chemical and microbiological analyses on day 45 after ensiling. All silages were opened at the end of the ensiling period (45 days) and subjected to an aerobic stability test for 7 days. In addition, after silage fermentation and aerobic stability period, lactic acid bacteria were identified. As a result, sodium diacetate that applied to alfalfa increased lactic and acetic acid concentrations and prevented proteolysis in the silages. However, sodium diacetate showed a high antibacterial activity in alfalfa. During the 7 days aerobic period, sodium diacetate decreased yeast and moulds populations and production of CO₂ and improved aerobic stability of alfalfa silage.

Key Words: Aerobic stability, lactic acid bacteria, identification, sodium diacetate

2019, 42 pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
RESİM DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Silaj Materyali	12
3.1.2. Silajların Hazırlanması	12
3.1.3. Silaj katkı maddesi ve uygulama şekli	13
3.2 YÖNTEM	13
3.2.1. SİLAJ KALİTESİ BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	22
4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler	22
4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri.....	23
4.2.1. Yonca silajlarının fermentasyon özellikleri ile ilgili bulgular.....	23
4.2.2. Yonca silajlarının mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili bulgular	28
4.3. Silajların Aerobik Stabiliteleri.....	29
4.4. LAB 16SrRNA Dizi Analizi sonuçları.....	30
5. SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	41
TEŞEKKÜR	42

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Başlangıç materyaline ilişkin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları	22
Çizelge 4.2. Yonca silajlarının kimyasal analiz sonuçları	24
Çizelge 4.3. Yonca silajlarının mikrobiyoloji analiz sonuçları (log ₁₀ kob/g KM)	29
Çizelge 4.4. Yonca silajlarının 7. gün aerobik stabilite sonrası analiz sonuçları	30
Çizelge 4.5. İzole edilen LAB'lerinin 16SrRNA dizi analiz sonuçları	31

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Vakum Makinesi	12
---------------------------------	----

SİMGELER DİZİNİ

AA	: Asetik asit
BA	: Bütirik asit
Bc	: Tampon kapasitesi
KOB	: Koloni oluşturan birim
HP	: Ham protein
KM	: Kuru madde
LA	: Laktik asit
LAB	: Laktik asit bakterileri
NH ₃ -N	: Amonyaka bağlı nitrojen
PA	: Propiyonik asit
SÇK	: Suda çözünebilir karbonhidratlar
SDA	: Sodyum diasetat
TM	: Taze materyal
TN	: Toplam nitrojen

1. GİRİŞ

Ruminant hayvanların rasyonlarında yer alan kaba yem kaynaklarının önemli bir kısmı yeşil yemler ya da bunların değişik metotlar aracılığı ile saklanmış formlarından oluşmaktadır. Çeşitli bitkisel materyallerden elde edilen silajlar da bu grup içerisinde yer alır. Genel anlamda, yeşil yemlerin fermantasyona tabi tutulması olarak tanımlanabilecek olan silajın yapımında amaç taze materyalin en az besin madde kaybı ile saklanabilmesidir (Kutlu 1995).

Birçok koşul (iklim, bitki çeşidi, kimyasal içerik, silolama tekniği vb.) silaj yapımında fermantasyon olaylarının kontrolsüz bir biçimde gelişmesine neden olabilmektedir. Fermantasyonun arzu edilen yönde gelişiminin sağlanabilmesi bakımından hasat, silolama koşulları gibi temel unsurların iyileştirilmesinin yanı sıra, değişik katkı maddelerinin kullanımı sıklıkla başvurulan yollardan birisidir. Katkı maddeleri, etki mekanizmaları ve kullanım amaçlarına göre farklı gruplar içerisinde incelenebilir. Arzu edilme-yen reaksiyon gelişimlerini önleyici etkilere sahip katkı maddeleri (asitler, tuz vb.) ile arzu edilen yönde fermantatif reaksiyonların gelişimini destekleyici katkı maddeleri (karbonhidrat kaynakları, mikrobiyal katkı maddeleri vb.) olmak üzere iki ana grupta değerlendirilebilir (Yurtman ve ark. 1997).

Hayvan beslemede büyüme ve gelişimi etkileyen en önemli unsurlardan biri sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmaların varlığıdır. Uzun yıllar ticari işletmelerde bu mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemek, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve performansı iyileştirmek amacıyla yem katkı maddelerinden yararlanılmıştır (Islam et al. 2008). Bu bağlamda 2006 yılına kadar, karma yemlerde kullanılan antibiyotikler, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde en çok kullanılan katkı maddesi olmuştur. Ancak zaman içinde patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı çapraz direnç geliştirdiğinin anlaşılması ile antibiyotiklerin büyüme faktörü olarak hayvan beslemede kullanımı AB tarafından yasaklanmıştır (Joerger 2003, Can ve Çelik 2008). AB ülkeleri başta olmak üzere, dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizde de antibiyotik kullanımını konusunda paralel kararlar alınmış ve bunların karma yemlerden çıkarıldığında verimin devamının sağlanabilmesi için doğal, güvenilir ve kalıntı bırakmayan alternatif ürünler araştırılmaya başlanmıştır. Bu bağlamda, organik asit, esansiyel yağ ve bakteri-

yosinler hayvan beslemede kullanımını en çok araştırılan doğal koruyucular olarak karşımıza çıkmaktadır. Organik asitler ve tuzları, yemlerde küf gelişimini engelleyen, yem ve yem hammaddelerinin depolama sürelerini uzatan, sindirim ve emilime yardımcı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler antimikrobiyel etkilerini, mide/bağırsak içeriğini veya ilave edildikleri yemlerin pH'sını düşürerek bazik ortamda yaşayan zararlı mikroorganizmaların gelişimini inhibe etme yoluyla gösterirler (Dibner ve Buttin 2002).

Doğada saf halde bulunan veya fermantasyon sonucu açığa çıkan organik asitler; laktik, sitrik, malik asit gibi genellikle karboksil grubuna (-COOH) dahil yağ asitleri ile Ca-format, Ca-propiyonat gibi tuz formlarından oluşan bileşikleridir. Karma yem sanayide özellikle peletleme aşamasındaki sıcaklığın etkisiyle, organik asitlerde oluşabilecek bozulmaları önlemek ve etkinliklerini artırmak amacıyla karmalara, doğal organik asitler yerine daha az koku ve uçucu olan tuz formları dahil edilmektedir. Yeme veya suya ilave edilerek kullanılan organik asitler, çözünmeyen kısımları ile antibakteriyel etki göstermektedirler. Bu nedenle, organik asitlerin etkinliği ve gücü ayrışma sabiti olan pKa değerine bağlı olup, bu değer düştükçe asidin çözünmeme miktarı, dolayısıyla antimikrobiyel etkinliği artmaktadır. Kullanılan asidin zincir uzunluğu, doymuşluk derecesi, ortam mikroflorası (rumen veya bağırsak), bakteri türü gibi kimyasal ve çevresel faktörler de organik asitlerin kuvvetli ya da zayıf etki göstermelerine sebep olmaktadır (Ricke 2003, Theobald 2015, Mirza ve ark. 2016). Organik asitler, etki şekillerine göre iki grupta kategorize edilirler. Buna göre, laktik, fumarik, sitrik asidin dahil olduğu I. grup midede pH'yı düşürerek aside karşı duyarlı bakteri popülasyonunu azaltıp indirekt yoldan karakterize olmaktadır. Formik, asetik, propiyonik ve sorbik asidin dahil olduğu II. grup ise, Gram (-) bakterilerin hücre çeperinden içeri girme ve hücre içi pH'yı düşürme suretiyle direk bakteri üzerinde etki göstermektedirler (Papatsiros ve ark. 2013).

Silajların organik asit yoluyla doğrudan asitleştirilmesi pH'da ani düşüşe neden olarak istenmeyen bakterilerin büyümesini inhibe eder ve böylece besin madde kaybını azaltır. Organik asitlerin kullanımındaki dezavantajlardan biri, keskin ve rahatsız edici kokuya sahip olmalarıdır. Bu nedenle alternatif silaj katkı maddesi olarak daha güvenli olan organik asit tuzlarının kullanımı önerilmektedir. Bir asetat türevi ve gıda koruyucu olan sodyum diasetat bileşiminde (sodyum asetat ve asetik asit) içerir. Enterobakteri ve maya gelişimini engellediği kanıtlanmış olan sodyum diasetat, etkili bir mikrobiyal in-

hibitör ve silajların kullanım süresini uzatmak için antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır (Wen ve ark. 2017, Yuan ve ark. 2017).

Bu çalışmanın amacı, yonca silajına farklı dozlarda sodyum diasetat ilavesinin silaj fermantasyonu ve aerobik stabilite üzerine etkilerini ortaya koymaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yeşil yemlerin silaj yapılarak saklanması ile %60-70 oranında nem içeren yemlerin kalitesindeki kayıp önlenerek uzun süreli depolama sağlanabilmektedir. Bu yeşil yemlerin silolanması, onların anaerob şartlarda laktik asit bakterileri (LAB) ile fermente edilip pH değerinin 4.2 ya da daha düşük seviyelere düşürülmesi ile gerçekleşmektedir. Hemen hemen bütün yeşil ve sulu yemlerden silaj yapılabilir ancak buğdaygiller, baklagillere göre silolanması daha kolay olmaktadır. Bu kolaylığın sebepleri arasında, buğdaygillerin suda çözünen karbohidrat içeriğinin (SÇK) baklagillere göre daha fazla olması, buğdaygillerin üzerinde bulunan epifitik LAB sayısının yüksek olması ve baklagillerin tampon kapasitesinin yüksek olması gibi nedenler sıralanabilir (Pitt ve ark. 1990, Singh ve ark. 1996, Davies ve ark. 1998).

Ruminant beslemede yoncanın önemli bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ülkemizin iklim koşullarının uygun olmasından dolayı yonca daha çok kurutularak kuru ot olarak değerlendirilmektedir. Ancak kuru ot yapımı sırasında, mekanik kayıplar ve uzun soldurma süresine bağlı olarak solunum kayıpları nedeniyle besin madde kayıpları önemli boyutlara ulaşmaktadır (Kılıç 1986, Avcıoğlu ve ark. 2009). Yonca iyi arazi ve iklim şartlarında ve düzenli sulanması halinde yılda 6-7 kez biçilebilir. Yoncanın özellikle 1. biçimi bölgelere göre değişmekle birlikte bol yağış alan Nisan ve Mayıs aylarında yapılmaktadır. Yağış tehlikesi nedeniyle biçim, kurutma, balyalama ve depolama işlemlerinde sık sık güçlüklerle karşılaşmaktadır. Aynı şekilde iklim özelliklerinden dolayı Ekim-Kasım aylarında yeterince kurutma imkânı olmayan son biçim yoncalarda da benzer güçlüklerle karşılaşmaktadır (Çiftçi ve ark. 2005). Bu nedenle yoncanın silolanmasının, kalite açısından potansiyel olarak kuru ottan daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Hancock ve Collins 2006).

Yonca, tampon kapasitesi ve protein içeriğinin yüksek, karbohidrat içeriğinin ise düşük olması nedeniyle güç silolanmış yemler sınıfında yer almaktadır (Kılıç 1986, McDowell 1989, Ergün ve ark. 1999). Bu nedenle yonca silolanırken genellikle ortamın karbohidrat düzeyini yükseltmeye yönelik çeşitli karbohidrat kaynakları (Lindgren ve ark. 1983, Kurtoğlu 1998, Çiftçi ve ark. 2005, Canbolat ve ark. 2010) ya da mikrobiyal florayı iyileştirmeye yönelik çeşitli inokulantlar (Lindgren ve ark. 1983, Seale ve ark. 1986, Haigh ve ark. 1987, Kung ve ark. 1991b, Sheperd ve ark. 1995, Kurtoğlu 1998) veya antimikrobiyal katkı maddelerinden (Haigh ve ark. 1987, Kung ve ark. 1991a, Martinsson 1991, Sheperd ve ark. 1995) yararlanılmaktadır.

Ohsima ve ark. (1997), yaptıkları çalışmada; yonca materyalinin fermente yonca suyu ile silolanması sonucunda oluşan yonca silajının laktik asit (LA) içeriğinin yükseldiğini ve pH sının da düştüğünü bildirmiştir.

Esmail ve Muwalla (1997) yaptıkları bir çalışmada, yonca materyalini formik asit ve enzim ile silolamıştır. Silaj katkı maddeleri oluşan silajların kompozisyonunda önemli farklılıklara neden olmamıştır. Formik asit ile birlikte silolanan silajların LA içerikleri yüksek, pH'ları ise düşük bulunmuştur. Formik asit muamelesi amonyağa bağlı nitrojen (NH₃-N) ve etanol içeriklerini azaltmıştır. Formik asit muamelesi yem tüketiminin azalmasına sebep olmasına rağmen canlı ağırlık kazancı bakımından diğer silajlarla aynı bulunmuştur.

Konu ile ilişkili bir başka çalışmada yonca materyali şeker (%1), LA (% 0.5, 1, 2) ve *Lactibacillus delbrueckii* bakterisi ile silolanmıştır. Bakteri inokulantı ile silolama sonrasında silajların kalitesinde önemli bir gelişme olmamıştır. Yalnız şeker ile silolama asetik asit (AA) fermantasyonunu teşvik etmiştir. Bakteri inokulantı ve şekerin birlikte kullanılması ise silajların pH'sını düşürmüş, LA içeriğini arttırmış, etanol ve NH₃-N içeriğini azaltmıştır. % 1 ve 2 oranında LA kullanımı silaj kalitesini yükseltmiştir (Ostrowski 1999).

Zhu ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada; yonca materyalinin hücre duvarını parçalayan enzimlerle birlikte silolanmasının, LA üretimini teşvik ettiğini ve pH'yı düşürdüğünü, bununla birlikte hücre çeperi fraksiyonlarının üzerinde önemli bir değişiklik yaratmadığını bildirmektedirler.

Hasat edilen yonca materyali, enzim ve bakteri inokulantı, formik asit, formalin ve melas ile silolanmıştır. Çalışmada yoncanın melas ve bakteri inokulantı ile birlikte silolanmasında uygun olmadığı, formik asit ve formalin kullanımının yoncanın silolanmasının daha uygun olduğu vurgulanmıştır (Pena ve ark. 2000).

Kurtoğlu ve Coşkun (2004)'un, yaptıkları çalışmada; yonca materyali Pioneer 1174, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecum*, % 5 melas, % 5 arpa, % 1.5 tuz ile silolanmıştır. Kullanılan silaj katkı maddeleri oluşan silajın ham protein (HP), asit çözücüde çözünmeyen lif (ADF) ve ham kül içeriğinde önemli bir etkiye sahip olmazken, kuru madde (KM), ham selüloz, nötral çözücüde çözünmeyen lif (NDF), pH ve kuru madde kayıplarını azaltmıştır. Araştırmacılar kullanılan silaj inokulantının uygun bir şekilde kullanılmasının silaj kalitesine olumlu katkı yapacağını bildirmektedirler.

Yonca materyalinin değişik dozlarda (4, 6 ve 8 g/kg yaş materyal) AA ile silolanması sonucu, silaj pH'sı düşmüş ve proteolitik aktivitenin azaltmasına rağmen AA'in etkin bir koruyucu olmadığı bildirilmiştir (Djordjevic ve ark. 2004).

Yonca materyalinin melas, formik asit, *Lactobacillus* ve enzim ile birlikte silolanması sonucu oluşan silajların, duyusal özellikler, KM içeriği ve pH bakımından kontrol grubuna göre daha iyi olduğu bildirilmiştir. Melas katkılı silajların LA içeriğini yükseltmiştir. *Lactobacillus* ise silaj LA içeriğini azaltmış diğer taraftan AA içeriğini yükseltmiştir. Formik asit silaj AA içeriğini düşürmüş diğer taraftan NDF sindirim derecesini yükseltmiştir (Xian ve ark. 2004).

Çiçeklenme döneminde hasat edilen yonca materyali formik asit, daha önce fermente edilen materyalin suyu + glikoz ve fermente suyu + formik asit ile silolanmıştır. Katkı maddeleri silaj pH'sını ve asit deterjan çözünmeyen lif (ADF) içeriğini düşürmüştür. HP içeriğini ise yükseltmiştir. Katkı maddeleri aynı zamanda silajların fermantasyon kalitesini ve besleme değerini yükseltmiştir. En iyi silaj kalitesi 5.5 ml formik asit, 2.5 ml fermente suyu +5.5 ml formik asit/kg ve 5.0 ml fermente suyu + 5.5 ml formik asit kullanılmasıyla elde edilmiştir (Ruixia ve ark. 2005).

Dorszewski ve ark. (2006), yapmış oldukları bir çalışmada; yoncanın enzim ve *L. buchneri* ile silolanmasının, silaj AA miktarını ve ince bağırsağa ulaşan amino asit miktarını arttırdığını bulmuşlardır.

Yeşil yonca bitkisinin bakteri inokulantı ile birlikte silolanması, oluşan silajlarda organoleptik ve beslenme değerlerinde önemli iyileşmelere sebep olmuştur (Huai Rong ve ark. 2006).

Öztürk ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada; yoncanın mısır ile birlikte silolanmasının, oluşan silajların kompozisyonunda önemli değişikliklere sebep olduğunu saptamışlardır. Karışımındaki mısır bitkisinin artmasıyla birlikte oluşan silaj pH sı düşmüş buna karşılık HP içeriği azalmıştır. Ayrıca yoncanın mısır ile birlikte silolanması organik madde ve metabolik enerji içeriğinde iyileşme- neden olmuştur.

Yonca materyali, formik asit (1 kg KM 0, 15 ve 20 ml) ve sülfürik asit (1 kg kuru maddeye 0 ve 4 ml) kullanılarak silolanmıştır. Asitle muamele silajların HP içeriklerini yük-

seltmiş aynı zamanda NH₃-N kayıplarını ise azaltmıştır. Ancak asitle muamelenin ineklerin süt verimleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Behgar ve ark. 2007).

Wang ve ark. (2007), yapmış oldukları araştırmada; yeşil yoncanın LAB inokulanı ile silolanmasının oluşan silaj pH ve NH₃-N içeriğini azalttığı ve LA içeriğini yükselttiğini bildirmişlerdir.

On dört çeşit mikrobiyal inokulant kullanarak yapılan yonca silajında, genel olarak inokulantların silaj kalitesi üzerinde olumlu etki ettiği, pH'yı düşürdüğü ve LA üretimini artırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte *in vitro* kuru madde sindirim derecesi silaj inokulantlarından etkilenmemiştir (Filya ve Sucu 2007).

Yonca materyali 3 farklı silaj bakterisi ile inokule edilerek silolanmıştır. Silaj bakterileri oluşan silajların pH, NH₃-N ve bütirik asit (BA) içeriğini azaltmıştır. Silaj katkı maddeleri istenmeyen bakterilerin silaj materyali içerisinde çoğalmasını önleyerek kaliteli silaj üretimine neden olmuştur (Tao ve ark. 2007).

Yonca silajı yapımında en önemli sorunlardan birisi proteolizisdir. Proteolizi önlemek için yonca materyali formik asit (4 g/kg kuru madde), formaldehit (1 g/kg kuru madde) ve tannik asit (20 ve 50 g/kg kuru madde) ile silolanmıştır. Formik asit silo içerisinde oluşan proteolizi etkilemede en etkili katkı maddesi olarak bulunmuştur (Guo ve ark. 2007).

Yonca materyali selülaz enzimi, glikoz gibi farklı silaj katkı maddeleri ile silolanmıştır. Silaj katkı maddeleri silaj pH ve NH₃-N düzeyini azaltmış buna karşın LA içeriğini yükseltmiştir (Liqiang ve ark. 2007a).

Filya ve ark. (2004)'nın yaptığı bir araştırmada kullanılan formik asit temeline dayalı koruyucu (FAT) mısır silajlarının KM ve OM parçalanabilirliklerini artırmıştır. FAT antimikrobiyal özelliği sayesinde silajlarda başta maya ve küf olmak üzere enterobakteri ve clostridia sporlarının gelişimini engellemiş ve bu da silajların KM ve OM parçalanabilirliklerinin artmasına yol açmıştır.

Polan ve ark. (1998)'nin yonca silajlarında formik asit kullanarak yaptıkları bir çalışmada NH₃-N konsantrasyonlarını düşürdüğü belirlenerek benzer etki gösterdiğini saptamıştır.

Liqiang ve ark. (2007b), yaptıkları çalışmada; farklı oranlarda (0, 8 ve 32 saat) soldurulmuş yonca materyalini LA ve glikoz kullanılarak silolanmışlardır. % 38.45 ve % 50.8 KM

içeren yonca materyalinin 10⁷ kob/g LA ve 10 g/kg glikoz ile silolanmasının en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır.

Gaiying ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada; yonca materyalini % 0, 5 ve 10 melas, %20 buğday kepeği, %20 pirinç samanı ve %20 pirinç kepeği ile silolamışlardır. Melas, oluşan silajların kokusu ve yapısını önemli derecede iyileştirmiş, silaj pH'sını ve NH₃-N içeriğini azaltmıştır.

% 5 Çiçeklenme döneminde hasat edilen yonca materyali, formik asit, selüloz enzimi, silyanaze enzimi, selüloz/silyanaz enzimi karışımı ve laktik asit inokulantı kullanarak silolanmıştır. Toplam serbest amino asit içeriği ve pH en düşük formik asit ile muamele edilen yonca silajında elde edilmiştir. LAB inokulantı kullanılarak elde edilen yonca silajının LA içeriği diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Katkı maddelerinin silajların *in vitro* sindirim derecesi üzerinde önemli bir etkisi olmamasına rağmen formik asit uygulaması NDF sindirim derecesini yükseltmiştir (Kozelov ve ark. 2008).

Silaj fermentasyonunun ilk evrelerinde pH değerinin hızlı bir şekilde 4.2'nin altına düşmesi, silajın kalitesi ve korunabilmesi için oldukça önemlidir. LA üretimi hızı ne kadar yüksek olursa proteolisis o oranda azalır ve bu silajın pH değerinin düşmesine neden olur. Hızlı LA üretiminde, silolanacak bitkideki epifitik mikrofloranın yanı sıra, bitkinin kimyasal kompozisyonu etkin olmaktadır (Weinberg ve Muck 1996, Kızıllı ve ark. 2007).

Virtanen (1993), Silajın pH değerinin 4'ün altına düştüğünde proteolisisin tamamen durduğunda belirlemiştir. Bu durum pH değerini hızla 4 civarına çekmenin önemini göstermektedir. Bu amaca ulaşabilmek için organik asit ve organik asit ilavesi yaygın bir uygulamalardır (Stokes 1992, Yuan ve ark. 2016, Yuan ve ark. 2017).

Gıda maddelerinin mikrobiyolojik güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü arttırmak için organik asitler ve türevleri doğal alternatifler olarak gösterilmektedir (Koos 1992, Cubina 1995).

Laktik asit ve tuzu olan laktatlar, ette ve bir o kadar da fermente gıdalarda doğal olarak bulunmaları, yüksek etkiye gücüne sahip olmaları, tüketicilerin sağlıkları üzerine herhangi bir risk oluşturmamaları, ürünün duyu niteliklerini değiştirmemeleri gibi özellikleri nedeniyle ürünlerin mikrobiyolojik güvenilirliğini arttırmak amacı ile katkı maddesi olarak önerilmektedir (Koos 1992). L(+) laktik asidin tuzu olan laktatlar ilave edildiği gıda maddesinin

su aktivitesini (aw) düşürerek ve spesifik etki göstererek koruyucu olarak etkili olmaktadır (Cubina 1995, Wit ve ark. 1990).

Laktatların antimikrobiyal etkisi et ve et ürünlerinde denenmiş; bir çok patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Brewer ve ark. 1995). Laktatların antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra ürünlerin renk, lezzet ve tekstür gibi duyuşal özelliklerini iyileştirdiği ve antioksidan olarak etkili olduğu da ileri sürülmektedir (Papadopaulos ve ark. 1991).

Öksüztepe (2010) taze gökkuşuğı alabalıklarıyla (*Oncorhynchus mykiss*W.) yaptığı çalışmasında; hazırlanan köftelerin üretiminde sodyum laktatın kullanılmasıyla ürünün duyuşal özelliklerinin (renk, koku ve lezzet) etkilenmediği ancak mikrobiyal gelişmeyi yavaşlatarak raf ömrünü arttırdığı ve köfte hamuruna %2 oranında sodyum laktat ilavesinin ürünün duyuşal özelliklerinde istenmeyen bir değışime neden olmadığını ve balık köftelerinin 4±1°C’de 16 gün boyunca yenilebilir niteliğini koruduğunu gözlemlemiştir.

Sodyum laktat ve sodyum diasetat, özellikle *Listeriamonocytogenes*’in inhibisyonu amacıyla gerek tek gerekse de kombine şekilde kullanılmaktadır (Tompkin 2002).

Günümüzde sodyum laktat, güvenli olarak kabul edilmekte ve kullanılmaya hazır gıdaların dekontaminasyonunda %4,8’e kadar, sodyum diasetatın ise %0,25’e kadar kullanımına izin verilmektedir (FDA 2000).

Kung ve ark (1991a) % 44.9 KM içeren soldurulmuş yonca materyali kullanarak yaptıkları bir çalışmada silaj KM düzeyleri kontrol, inokulant ve inokulant+antibiyotik ilaveli silajlarda sırasıyla % 42.3, % 39.6 ve % 39.2 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada 56. günde pH değerlerini kontrol grubunda 4.29, inokulant ilave edilen silajlarda 4.10, inokulant+antibiyotik ilaveli silajlarda 4.10 ve sadece antibiyotik ilavesi yapılan silajlarda ise 4.26 olarak belirlemişlerdir (P<0.01).

Kung ve ark. (1991b), soldurulmadan (% 20 KM) ve % 43.7 KM düzeyine kadar soldurulmuş yonca materyali kullanılarak yapılan bir çalışmada) kuru madde düzeylerini soldurulmamış silajlarda kontrol grubunda % 21.3, enzim ilaveli silajlarda % 20.9 ve enzim+inokulant ilaveli silajda ise % 20.5 olarak belirlerken soldurulmuş silajlarda ise sırayla % 43.7, % 43.0, % 44.2 düzeylerinde belirlemişlerdir (P>0.05).

Organik asitler özellikle formik asit, yapılarındaki hidrojen iyon konsantrasyonunun ve çözünmemiş asidin seçici bakterisidal etkisi nedeniyle antibakteriyal etki göstermektedir (Henderson 1993).

Antibiyotik uygulamalarında silajlarda total mikroorganizma, LAB ve maya sayıları önemli düzeyde etkilenirken, maya ve küf değerlerini çok düşük düzeylerde etkilenmektedir (Kurtoğlu 2011).

Silajda bulunması istenen LAB koruyucu etkilerinden dolayı silolamada istenen tek mikroorganizma grubudur. Mikroaerofilik, gram-pozitif ve spor oluşturmeyen bu mikroorganizmalar yem bitkisinde bulunan SÇK'lı başta LA olmak üzere AA, etanol ve karbondioksit parçalarlar. Silaj fermentasyonu açısından en fazla önem LAB *Streptococci*, *Pediococci* ve *Leuconostocs*, *Lactobacilli* düzgün veya kıvrımlı, uzun çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, hareketsiz, çoğu mikroaerofilik veya anaerobik olan bu mikroorganizmaların homofermentatif ve heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Bunlardan *Streptococcus faecium* bakterileri hızlı çoğalmakta ve pH değerini kısa sürede düşürmektedir. *Lactobacillus plantarum* diğer bakteri türlerine göre daha yavaş çoğalır fakat çok fazla sayıda LAB oluşturur. Ayrıca çok düşük pH değerinde sadece *Lactobacillus plantarum* yaşayabilir (Pitt 1986).

Silaj kalitesi bakımından silo içerisinde anaerobik mikroorganizmalardan olan LAB etkin olması istenirken, silajların aerobik bozulmasını başlatan *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, *Bacilli*, *Listeria* gibi bakterilerle mayalar ve küf mantarları istenmez (Lindgren ve ark. 1985).

Mayalar, silo yapılacak olan bitkide LAB'den sayı olarak daha fazla bulunurlar. Karbohidratları, alkol, karbondioksit ve organik asitlere fermente ederler (Woolford 1990). Silaj içerisinde maya popülasyonu iki temel sebepten dolayı istenmez. Bunlardan biri, silajın niteliği açısından oldukça önem taşıyan aerobik dayanıklılık üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmaları, diğeri ise LAB ile rekabete girerek ortamdaki karbohidratları kullanmaları ve bunları silajın saklanması üzerinde hemen hemen hiç bir etkisi olmayan etanole dönüştürmeleridir (Basmacıoğlu ve Ergül 2002). Clostridialar da silaj kalitesini bozucu yönde etkilidirler, şekerleri, organik asitleri veya proteinleri parçalarlar. Yemin değerini düşürmeleri, enerji kaybına ve ortam pH'sının artmasına neden olmalarından dolayı silaj fermentasyonu açısından istenmeyen mikroorganizmalar grubunda yer alırlar (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002). Bütrik asit oluşumuna yol açan clostridial bakteriler, LAB göre daha yavaş çoğalırlar. Yemdeki karbohidratları parçalayarak uçucu yağ asitlerine ve meydana gelen LA'yi bütrik aside çevirirler. *Clostri-*

dialar %70 den fazla nem içeren silajlarda üreme ve gelişmesi gösterirler (McDonald ve ark. 1981, Pitt 1986, Bolsen ve ark. 1996).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Silaj Materyali

Bu araştırmada silaj materyali olarak Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezinde yetiştirilen yonca (*Medicago sativa*) bitkisi kullanılmıştır.

3.1.2. Silajların Hazırlanması

Çiçeklenme başlangıcında (yaklaşık %10-20 çiçeklenme) hasad edilerek 24 saat süreyle soldurulan yonca, araştırmanın başlangıç yem materyalini oluşturmuştur. Soldurma işleminin sonunda yonca, silaj makinesinde yaklaşık 1.5-2.0 cm boyutlarında parçalanmış, sonrasında ise sodyum diasetat (SDA) ilave edilmiştir. Araştırma, katkı maddesi ilave edilmeyen kontrol, 3g/kg, 5g/kg ve 7g/kg düzeyinde SDA, yaş materyele ilave edilerek oluşturulan 4 grupta yürütölmüştür. Parçalanan materyaller yaklaşık 500 g olacak şekilde torbalara koyularak laboratuvar tipi CAS CVP 260 PD marka vakum makinesinde 10' ar paralelli olarak silolanmıştır (şekil 3.1). Kırk beşinci gün açılan silajlara 7 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır.



şekil 3.1. Vakum makinesi

3.1.3. Silaj katkı maddesi ve uygulama şekli

Araştırmada katkı maddesi olarak, (E 262) nolu gıda koruyucusu olarak kullanılan bileşimi (sodyum asetat ve asetik asit) oluşan ticari katkı maddesi kullanılmıştır.

Katkı maddesinin uygulama şekli: 10 kg parçalanmış taze materyal 1x4 m temiz bir alana yayılmıştır. 1. grup kontrol grubu olup katkı maddesi içermemektedir. 2. grupta, sodyum diasetat 3 g/kg tartılarak üzerine 20 ml çeşme suyu konarak iyice karışması sağlandıktan sonra taze materyal üzerine homojen bir şekilde el pülverizatörü ile püskürtülmüştür. 3. grupta 5 g/kg sodyum disetat, 4. grupta 7 g/kg. 2. grupta açıklandığı gibi taze materyale uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise diğer muamele gruplarına eşdeğer 20 ml çeşme suyu ilave edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1. Silaj Kalitesi Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler

Araştırmada kullanılan yemlerin silolama öncesinde pH, Bc, SÇK, mikrobiyolojik analizler, silolama sonrası örneklerde pH, SÇK, NH₃-N, organik asitler (laktik, asetik asit, bütrik ve propiyonik asit) ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. pH ve Bc (Tampon kapasitesi) Analizleri

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

Silolama öncesi alınan örnekte Bc'nin saptanabilmesi için 20 gram örneğe, 250 ml saf su ilave edilerek mekanik karıştırıcı aracılığı ile 1 dakika süre ile karıştırılmıştır. Karışım dört katlı gazlı bezden geçirilerek elde edilen süzüğün pH'sı 0.1 N HCl ile 3,00'e ayarlanmıştır. Daha sonra 0.1 N NaOH kullanılarak süzüğün pH'sı 4.00 e standardize edilmiştir. Süzük aynı yoğunluğa sahip NaOH ile karışımın pH'sı 4.00 den 6.00 ya çıkıncaya kadar işleme tabi tutulmuştur. pH'nın 4.00'den 6.00'ya yükselmesi için gerekli alkali miktarı meq/kg KM olarak kaydedilmiştir (Playne ve Mc Donald 1966).

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 öğütülmüş 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 süzülerek 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. Amonyaga Bağlı Nitrojen (NH₃-N) Analizi

Silaj örneklerinde NH₃-N, silaj örneklerinden elde edilen ekstraktlarda mikro distilasyon metotlarına Anonymous (1986) göre gerçekleştirilmiştir. Kırk beş günlük süre sonrasında günlük 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 süzülerek 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)'nın bildirdikleri spektrofotometrik yöntemle 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'eri okunarak saptanmıştır. Elde edilen örneklerin KM miktarlarına bölünmüş ve silajların %KM'de % laktik asit içerikleri saptanmıştır.

3.2.1.5. Asetik, Bütirik ve Propiyonik Asit Analizleri

Asetik asit (AA), Bütirik asit (BA) ve Propiyonik asit (PA) düzeyleri ise 1/5 (hacim/hacim) oranında %25'lik metafosforik asit katılmış silaj süzüntüsünde gaz kromatografisi (GC-15A, Shimadzu, Japonya) ile belirlenmiştir (Supelco 1998).

3.2.1.6. Mikrobiyolojik Analizler

Çalışmada silaj örneklerinde LAB, maya ve küf yoğunluklarının saptanmasına yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 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. Laktik asit bakterileri için besi ortamı olarak MRS Agar, maya ve küfler için Malt Ekstrakt Agar kullanılmıştır. Örnekler için LAB sayımları 30 °C 3 günlük, maya ve küfler için 30 °C de 5 günlük sıcaklıkta inkübasyon dönemlerini takiben gerçekleştirilmiştir (Seal ve ark. 1990).

Örneklerde saptanan LAB, maya ve küf sayıları logaritma koliform üniteye (kob/g) çevrilmiştir.

3.2.1.7. Silaj Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Dizi Analizleri

3.2.1.7.1. LAB' nin İzolasyonu, Tanımlanması ve Muhafazası

MRS agarda gelişen LAB'leri sayımı için Man Ragosa Sharpe agar (MRS agar) (Merck) kullanılmıştır. Steril edilmiş MRS agar ile uygun dilüsyonlardan 0,1 ml ilave edilerek yüzeye ekim yöntemi yapılmıştır. Petri kutuları 30 ± 1 °C'de 3 gün inkübe edilmiş ve koloni içeren petriler sayılmıştır.

M17 agarda gelişen LAB'leri sayımı için steril edilmiş M-17 agara (Merck) uygun dilüsyonlardan 0,1 ml ilave edilerek yüzeye ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri kutuları 30 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petriler sayılmıştır.

Silaj örneklerinden *Lactobacillus* ve *Lactococcus* izolasyonu için, hazırlanan uygun dilüsyonlardan MRS agar (lactobaciller) ve M17 agar'a (lactococlar) yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS agar'a ekim yapılan plaklar 30 °C'de 72 saat, M17 agar'a ekim yapılan plaklar ise 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 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) mikroskobik morfolojileri incelenmiştir. İnkübasyondan sonra tekrar MRS ve M17 agar'a tek koloniye düşürme çizim usulü ekim yapılmış ve 30 °C'de 24- 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.7.2. LAB'lerinin DNA İzolasyonu ve 16S rRNA Bölgesinin PCR'da Çoğaltılması

DNA izolasyonu; bakterilerin lizize edilmesi, proteinlerinin uzaklaştırılması, DNA'nın çöktürülmesi ve temizlenmesi aşamalarından oluşmaktadır. İzolasyonu gerçekleştirmek için Genomic DNA Purification KIT (Fermentas) kullanılmıştır. Saf bakteri kültürü sıvı besiyerinde (18 saat) geliştirilmiştir. Daha sonra 5 ml sıvı besiyerine 500 µl aşılı olarak 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. (DNA izolasyonunda 5 ml sıvı besiyerine 500 µl kültür aşılı olarak (%10'luk) 3-4 saatlik taze kültür en uygundur). 1000 µl örnek alınır ve santrifuj edilmiştir. (10.000 devirde 10 dk) Çıkan tüplerden süpernatant atılarak 500 µl Tris- EDTA buffer ilave edilerek tüp yıkanmıştır ve 10.000 devirde 15 dk santrifuj edilmiştir. Çıkan ependorflardan buffer dökülüp ve içerisine 200 µl lizozim ilave edilmiştir. 38 °C'de 30- 45 dk su banyosunda

bekletilmiştir. (Bu aşamada artık hücre parçalanmaya başlamaktadır). Su banyosundan çıkarılıp 400 µl lysis solusyonu ilave edilmiştir. El ile çalkalama yapılmıştır. (Hücre parçalandığı için vortex yapılmamalıdır). 65 °C’de 10 dk su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılıp acele bir şekilde 600 µl kloroform ilave edilmiştir. 1-2 dk bekletilip 10.000 devirde 2-4 dk santrifuj edilmiştir. Yeni ependorfların içerisine 720 µl steril su ve üzerine 80 µl precipitation çözeltisi ilave edilmiştir. Santrifujdan sonra çıkan tüplerden üst faz yani DNA alınmıştır. Ara fazda hücre kalıntıları vardır alınmamaya özen gösterilmelidir. Lizozim kullanılmıyorsa yaklaşık 600 µl, kullanılmıyorsa 200 µl DNA alınabilmektedir. Hazırlanan yeni ependorflara aktarılmıştır. 10.000 devirde 2 dk santrifuj edilmiştir. Üst taraftaki çözelti akıtılarak 100 µl NaCl çözeltisi ilave edilmiştir ve dipteki DNA çözündürülmüştür. Üzerine 300 µl soğuk saf etanol ilave edilmiştir. Ependorflar – 20 °C’de bir gece depolanmıştır. -20 °C’de çıkarılan ependorflar 10.000 devirde 10 dk santrifuj edilmiştir. Daha sonra içerisindeki alkolün steril kabinde iyice uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alkol tamamen uzaklaştığında 50 µl steril saf su ile yıkanmış ve iyice çözündürülmüştür.

16S rDNA yöntemi ile bakterilerin tanımlanmasında genel bakteriyel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesinin homolojisinden yararlanılmıştır. Çalışmalarda ileri primer olarak 5’ AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3’ ve geri primer olarak 5’- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT – 3’ kullanılmıştır.

Çalışmada 500 µl’lik PCR tüplerine toplam hacim 50 µl olacak şekilde sırasıyla 17,5 µl moleküler çalışmalar için üretilmiş steril su, 2,5 µl Buffer (MgCl₂ içermez), 0,5 µl (deoksinükleotidtrifosfat) dNTP miks (dATP, dCTP, dGTP, dTTP’lerden her birinin konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde hazırlanan karışım), 0,5 µl 16S ileri ve 0,5 µl 16S geri primerleri, 2 µl MgCl₂ ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve son olarak 1 µl DNA ilave edilmiş ve (negatif kontrol için 1 µl çalışmada kullanılan sterli su kullanılır) tüpler PCR haznesine yerleştirildikten sonra PCR reaksiyon parametreleri 94 °C’de 5 dk Initial Denaturation (denaturasyonun başlaması) , 94 °C’de 45 sn Denaturation (çift zincirin açılması), 53 °C’de 1 dk Annealing (primerlerin bağlanması), ve 72 °C’de 1 dk Extension (zincir uzaması) olarak programlanmıştır ve bu işlem 30 defa tekrarlanmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzama aşaması için 72 °C’de 10 dk Final Extension (son uzama) eklenmiştir ve 4 °C’ye soğutulmuştur. PCR’den çıkarılan tüpler – 40 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.7.3. DNA'nın izolasyonu ve agaroz jelde analizi

DNA örneklerinin elektroforezi, % 1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır. Yatay jel sistemleri için agaroz, 100 ml tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde ve kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45 °C'ye kadar soğutulan ortam elektroforez plakalarına 30 – 50 ml olacak şekilde aktarılmıştır ve jel tarakları yerleştirilerek 60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti, jeli kapatacak şekilde elektroforez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar çıkartılmıştır. - 40 °C'den çıkartılan PCR'lanmış DNA örneklerinden 1 µl alınarak temiz bir parafilm üzerinde 2 µl boya çözeltisi (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir. DNA'nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna da 5 µl marker (6x Loading Dye Solution) yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmıştır. Elektroforez, 100 voltta – 325 mA'de 30- 60 dakika süre ile yapılmıştır. Yükleme boyası jelin ¾ ve 4/5'lik kısmını geçtikten sonra elektroforez işlemi sona erdirilmiştir. Ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0,2 µg/ml etidyum bromit içeren çözeltisinde 30 dakika boya işlemine tabi tutulmuştur. Boyama işlemi biten jel ultraviyole ışıkta incelenerek fotoğrafları alınmıştır.

3.2.1.7.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR'da çoğaltılan ve agaroz jelde görüntülenen PCR ürünleri PEG (polietilenglikol) pürifikasyonu yapılarak saflaştırılmıştır.

- PEG solusyonu 1:1 oranında PCR ürünü ile karıştırılmıştır.
- Hızlı şekilde vortekslenmiştir.
- 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 14000rpm de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst faz atılmıştır.
- 100 µl %70'lik alkol eklenmiştir.
- 14000rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst faz atılmıştır.
- 20 µl hacimde (distile su ile) çözülmüştür.
- Çözünen örnekten 2 µl %2'lik jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

3.2.1.7.5. 16SrRNA Dizi Analizi

Saflaştırılan PCR ürünleri Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar ve Uygulama Merkezi bünyesinde bulunan Beckman Coulter Marka GenomeLab GeXP cihazının Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit protokolüne uygun olarak sekans reaksiyonu kurulur ve yine bu kitin protokolünde yer alan Ethanol ile çöktürme basamağı ile örnekler dizi analizine uygun hale getirilerek cihaza yüklenmiştir.

Ethanol ile çöktürme (sekans ürünlerinin prüfikasyonu)

- 0,5 lik steril ependorflara örnekler etiketlenmiştir.
- Taze stop solüsyon hazırlanır. (3 molar sodyum asetattan (pH 5,2) 2 µl, 100ml molar sodyum edtan (pH 8,0) 2µl, 20 mg/ml glikojenden 1µl)
- 5µl stop solüsyon örnekler üzerine paylaştırılmıştır.
- %100 lük ethanolden 60 µl örnek üzerine eklenmiştir.
- 14000 rpmde 4°C sıcaklıkta 15 dakika santrifüjlenmiştir.
- Üst kısım alınarak atılır. %70'lik soğuk ethanolden 170 µl ilave edilmiştir.
- 14000 rpmde 4 C de 3 dakika çevrilmiştir.
- Üst faz atılır 10 dakika karanlıkta bekletilmiştir.
- Sekans reaksiyonu için hazırlanmıştır.

3.2.1.7.6. BLAST Tarama

BLAST (Basic Alingment Search Tool), aranan dizi sırasını (nükleotid veya amino asit) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % yaklaşımla veren bir bilgisayar programıdır. BLAST, moleküler biyoloji ile bilgileri bir kaynakta toplamayı ve genom verilerinin bilgisayar ortamında analiz edilmesi için bilgisayar programları geliştirmeyi amaçlayarak, 1988 yılında kurulan National Center for Biotechnological Information adlı kuruluş tarafından geliştirilmiş bir veri tabanıdır. Baz sırası belirlendikten sonra, bu sıra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adlı internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenir.

3.2.1.8. Aerobik Bozulmaya Dirence İlişkin Analizler

Ashbell ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak silajların silolamanın 45. gününde açılarak 7 gün aerobik stabilite testine tabi tutulmuşlardır. Aerobik stabilitenin 7. günündeki silaj örneklerinin pH'ları ölçülmüş ve CO₂ üretimleri 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 5 gün 20 °C, 30 °C ve 37 °C'de 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 N HCl 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).

Silajlardaki görsel küflenmenin saptanmasında ise Filya ve ark (2000) tarafından geliştirilen değerlendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem silajların küflenme durumlarını görsel olarak 1'den 5'e kadar olan sayılarla değerlendirilmesidir. 1: hiç küf içermeyen bir silaj. 2: noktalar halinde çok az düzeyde küf içeren bir silaj. 3: noktalar halinde yüzeye yayılmış bir şekilde küf içeren bir silaj. 4: yüzeyi kısmen küf ile kaplı, bölge bölge küflenmiş yüzeyleri olan silaj. 5 yüzeyi tamamen küf ile kaplı, ağır bir kokuya sahip ve partikülleri birbirine yapışmış bir silaj. Bu değerlendirmeler üç kişi tarafından yapılmakta ve daha sonra üçünün ortalaması alınmaktadır.

3.2.1.9. Silajların Kuru Madde Kayıplarının Belirlenmesi

Silajların KM kayıpları, 45. günlerde torbalarında hesaplanan silaj KM'si ağırlığının, torbalara konulan taze materyalin KM ağırlığına oranlanması ile hesap edilmiştir (Kleinschmit ve Kung 2006).

3.2.1.10. İstatiksel Analizler

Araştırma sonunda elde edilen veriler SPSS v.16 istatistik paket programının (SPSS Inc. 2007) GLM prosedüründe değerlendirilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır (Efe ve ark. 2000).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler

Taze yonca silajına ait kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yonca bitkisinin başlangıç materyaline ilişkin değerler sırası ile pH, Bc değeri, KM'deki HP, SÇK, LAB ve maya içerikleri 7.80, 478 meq NaOH/kg KM, 31.08 %20.25, 15.60 g/kg, 5.35 log₁₀ kob/g, 8.00 log₁₀ kob/g olarak saptanmıştır.

Çizelge 4. 1. Başlangıç materyaline ilişkin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

İçerik	Miktar
pH	7.80
Bc (Tampon kapasitesi), Meq NaOH kg/KM	478
KM, % TM	31.08
HP, % KM	20.25
SÇK g/kg KM	15.60
LAB, log ₁₀ kob/g	5.35
Maya, log ₁₀ kob/g	8.00
Küf, log ₁₀ kob/g	0.00

KM: Kuru madde, TM: taze materyal, HP: Ham protein, SÇK: Suda çözünebilir karbonhidrat LAB. Laktik asit bakterisi, kob: colony formic unit

Uygun saklama koşullarının gerçekleşmesi sonrasında elde edilecek silo yeminde besleme değerliliği üzerinde etkili olan temel faktörler silajı yapılacak olan materyalin pH, KM ve SÇK içeriği ile epifitik mikroorganizma yoğunluğu gibi özellikler bakımından sahip olduğu değerlere bağlıdır.

Yonca silajlarının başlangıç materyalinin pH değerine ilişkin veriler değerlendirildiğinde, başlangıç materyaline ilişkin pH değerini, Filya ve ark. (2001) 6.50, Moravkova ve ark. (2003) 5.78 -5.94 arasında, Koc ve ark. (2017) ise 5.75 olarak bildirmişlerdir. Araştırmamızda saptanan başlangıç pH değerinin, diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Wen ve ark. (2007) farklı organik asit tuzlarının yonca silajına etkilerini araştırdıkları çalışmalarında başlangıç materyaline ilişkin HP ve SÇK değerlerini sırasıyla 210 g/kg KM ve 50.5 g/kg KM olarak bildirmişlerdir.

Yuan ve ark. (2017) yonca silajlarına farklı katkı maddesi ilavesinin etkilerini araştırdıkları çalışmada, LAB ve maya değerini sırası ile 5.29, 3.58 kob/g TM olarak bildirmişlerdir. Araştırmada yonca silajlarında tespit edilen epifitik LAB ve maya yoğunluğunun söz konusu sınırlardan daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür.

4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri

4.2.1. Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri İle İlgili Bulgular

Fermantasyonun 45. gününde açılan yonca silajlarına ait kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.2 verilmiştir. Yonca bitkisine farklı düzeylerde SDA ilave edilmesi genel olarak yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini olumlu yönde etkilemiştir. Kontrol grubu ile SDA kullanılan gruplar arasında önemli farklılıklar oluşmuştur.

Çizelge 4.2. Yonca silajlarının kimyasal analiz sonuçları

Özellikler	Muameleler				P
	Kontrol	SD 3	SD 5	SD 7	
pH	5.80±0.10 ^a	5.75±0.15 ^a	5.60±0.00 ^a	5.35±0.15 ^b	<0.01
KM% TM	28.04±1.30 ^c	28.45±0.57 ^{bc}	29.72±0.35 ^{ab}	29.98±0.18 ^a	<0.05
HP,% KM	19.72±0.10 ^c	19.80±0.01 ^{bc}	19.92±0.09 ^b	20.28±0.01 ^a	<0.001
NH ₃ -N, g/kg KM	4.51±0.21 ^a	4.27±0.02 ^a	3.95±0.08 ^a	2.94±0.74 ^b	<0.005
NH ₃ -N/TN, g/kg KM	142.16±6.60 ^a	133.97±1.26 ^b	125.20±3.06 ^c	111.98±1.29 ^d	<0.001
SÇK, g/kg KM	9.96±1.01	8.72±2.70	8.00±0.29	6.60±0.53	Ö.D
LA, g/kg KM	6.77±1.43 ^c	26.56±1.82 ^b	64.96±1.54 ^a	70.04±7.88 ^a	<0.001
AA, g/kg KM	13.10±3.20	17.13±0.48	18.54±3.17	19.52±3.31	Ö.D
BA, g/kg KM	1.92±0.46 ^a	1.90±4.09 ^a	1.48±3.71 ^{ab}	1.22±0.32 ^b	<0.05
PA, g/kg KM	4.96±0.39 ^a	3.82±0.84 ^{ab}	2.75±0.97 ^{bc}	1.57±0.25 ^c	<0.01
KM Kaybı %	2.97±0.03 ^a	2.78±0.02 ^b	2.69±0.02 ^c	2.63±0.03 ^d	<0.001

KM: Kuru madde, HP: Ham protein, NH₃-N: Amonyaga bağlı nitrojen, SÇK: Suda çözünebilir karbonidrat; LA: Laktik asit, AA: Asetik asit, BA: Bütrik asit, PA: Propiyonik asit.
^{abc}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

4.2.1.1. KM

Taze yoncanın KM içeriğinin % 31.08 olarak saptandığı bu çalışmada, fermantasyon sonunda KM içerikleri 28.04-29.98 arasında değişmiştir. Çalışmada, fermantasyonun 45. gününde SD5 ve SD7 silajların KM düzeyinin kontrol grubu silajlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Silaj materyalinin KM içeriğini yükseltmek için pratikte uygulanan iki yöntem mevcuttur. Bunlardan birincisi, KM düşük olan silaj materyali KM içeriği yüksek saman gibi materyallerle birlikte silolamaktır (Philips ve Pendlum 1984). Fakat bu yöntemle elde edilen silajların sindirim derecesi tek başına silolanan silaj materyalinden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Jakhmola ve ark. 1990). Silolanacak materyalinin KM içeriğini yükseltmek için kullanılan diğer metot ise soldurmadır. Hasattan sonra yapılan soldurmanın silolama sırasında oluşan proteolizisi azalttığı bildirilmiştir (Muck 1987, Makoni ve ark. 1991). Ayrıca soldurma ile proteinlerin *in vivo* parçalanmasının azalttığı da bildirilmiştir (Narasimhahau ve ark. 1989, Teller ve ark. 1992). Fakat bazı durumlarda soldurmanın proteolizis engellemek için yeterli olmadığı ve proteolizis üzerinde pH'nın önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Slottnner ve Bertilsson 2006). Aşırı soldurmanın, bazı besin maddelerin kaybından dolayı silajın besinsel değerinin düşmesine neden olduğu da bildirilmiştir (Muck 1988). Araştırmamızdan elde edilen KM değerleri ile diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur. KM değerlerinin yüksek olmasının sebebi yonca silajlarının silolanmadan önce 24 saat soldurma yapılmasından kaynaklanmaktadır.

4.2.1.2. pH

Yonca bitkisine SDA katılması ile silajların pH'ları önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.01$). Silaj yapımı sırasında bitkisel ve mikrobiyal kökenli enzimler yem materyali içeri-
sindeki proteinlerin aşırı bir şekilde amonyağa kadar parçalanmasına (proteolizis) neden olmaktadır. Çoğu durumda gerçek proteinlerin % 80'ni amonyağa kadar parçalanmaktadır (Winters ve ark. 2000). Bitki proteaz enzimlerin aktiveleri pH 6 civarında optimumdur. Düşük pH'larda bitki proteaz enzim aktiviteleri önemli derecede azalmaktadır (Brady 1961, Finley ve ark. 1980, McKersie 1985). Bundan dolayı, silo materyalinin pH'sının hızlı bir şekilde düşürülmesi gerekmektedir. Bunun için LA üreten bakterilere yeterli miktarda SÇK sunulması gerekmektedir. Silo içerisinde meydana gelen proteolizis olayını etkileyen en önemli faktörler, KM içeriği, pH, sıcaklık ve yem içerisinde bulunan bazı engelleyici faktörler olarak sıralamak mümkündür (Slottnner ve Bertilsson 2006). Silaj pH'sının 4 ün altına indiği zaman

proteolizis tamamen durduğu bildirilmiştir. (Virtanen 1993). Bundan dolayı silaj pH'sını hızlı bir şekilde 4 civarına çekilmesi gerekmektedir. pH'yı 4 civarına çekmek için pratikte bazı silaj katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan katkı maddesi organik asit ve tuzları gibi kimyasallardır. Bu kimyasallar tek başına kullanıldığı gibi birlikte de kullanılarak uygulamanın etkinliği artırılmaya çalışılmıştır (Carpintero ve ark. 1979, Fishman ve ark. 1983). Ancak kullanılan katkı maddesi pH değerlerinin 4 değerine düşmesi için yeterli olmamıştır. pH değeri 5.85-5.35 arasında değişim göstermiştir.

4.2.1.3. HP

Araştırma gruplarını HP içerikleri incelendiğinde, kontrol %19.72, SD3 %19.80, SD5 %19.92 ve SD7 %20.28 bulunmuştur. SDA ilavesi yonca silajlarında HP miktarını yükseltmiştir ($P < 0.001$). Araştırmadan elde edilen veriler, Liu ve ark. (2016), Yuan ve ark. (2017) ve Liu ve ark. (2018)'nin yapmış oldukları çalışmalarında da benzer bulgular elde edilmiştir.

4.2.1.4. NH₃-N

Araştırmada NH₃-N miktarlarının 4.51-2.94 g/kg KM arasında değiştiği bulunmuştur. En düşük NH₃-N miktarı 7g/kg SDA ilavesiyle sağlanmıştır ($P < 0.005$). Amonyaka bağlı nitrojenin toplam nitrojene olan oranına (NH₃-N/TN) bakıldığında bu değer 142.16-111.98 g/kg TN arasında değişmiştir. Fermantasyonun 45. gününde SDA kullanılan silajlarda NH₃-N/TN miktarları kontrol silajına göre önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur ($P < 0.001$). Kaliteli bir silaj için NH₃-N miktarının toplam nitrojen (TN)'de 100 g/kg düzeyinin altında olması gerektiği bildirilmektedir (McDonald ve ark. 1998). Araştırmamızda yapılan tüm silajlardan elde edilen NH₃-N/TN oranının iyi kalitede olması gereken değerden daha yüksek olduğunu görülmektedir.

Silaj amonyak içeriği genel olarak silolama sırasında meydana gelen proteoliz olayının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

4.2.1.5. SÇK

SÇK içerikleri kontrol, SD3, SD5 ve SD7 gruplarında sırasıyla 9.96 g/kg KM, 8.72 g/kg KM, 8.00 g/kg KM ve 6.60 g/kg KM olarak bulunmuştur. Muamele gruplarının SÇK içeriği kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda SÇK içeriği 14-18.9 g/kg KM (Wen ve ark. 2017), bir başka çalışmada ise 17.1-39.3 g/kg KM olarak tespit edilmiştir (Yuan ve ark. 2017).

Haigh ve Parker (1985)'ın çeşitli silaj katkı maddeleri kullanarak yapmış oldukları 33 çalışmanın sonucunda başarılı bir silaj fermantasyonu için materyalin SÇK içeriğini, katkısız silajlar için 30 g/kg KM, formik asit ilave edilen silajlarda ise 25 g/kg KM olarak belirlemiştir. Genel olarak başarılı bir silaj fermantasyonu için silolanacak taze materyalin en az % 3 SÇK içeriğine sahip olması gerekmektedir (Haigh ve Parker 1985, Jones 1995). SÇK miktarları için elde edilen bulgular literatür bildirişleriyle karşılaştırıldığında; araştırmanın gerek başlangıç materyaline ilişkin veriler, gerekse fermantasyon dönemi sonrası elde edilen SÇK değerleri bu konuda yapılan çalışmalardan daha düşük tespit edilmiştir (Filya ve ark. 2001, Vatansever ve ark. 2009).

4.2.1.6. Organik asitler (LA, AA, BA ve PA)

En yüksek LA içeriği SD7 grubunda 70.04 g/kg KM olarak belirlenirken en düşük ise kontrol grubunda 6.77 g/kg KM olarak belirlenmiştir. Yonca silajlarına SDA ilavesi silajların LA içeriklerini önemli düzeyde artırmıştır ($P<0.001$).

Yuan ve ark. (2017), yapmış oldukları bir çalışmada yoncanın kontrol ve 4 farklı dozda sodyum diasetat ilave edilmiş gruplarında LA içeriklerini sırasıyla 15.9, 25.4, 33.5, 37.9 ve 28.3 g/kg KM, AA içeriklerini 117.2, 21.7, 25.6, 33.7 ve 40.2 g/kg KM olduğunu bildirmektedirler.

En yüksek AA içeriği SD7 grubunda 19.52 g/kg KM olarak belirlenirken en düşük ise kontrol grubunda 13.10 g/kg KM olarak belirlenmiştir. AA silajın aerobik bozulmasını engelleyen bir özellik taşımasına karşın, KM kaybına, hayvan performansında azalmaya ve yem tüketiminin düşmesine yol açtığından, silaj içerisinde fazla miktarda bulunması arzu edilmez (Danner ve ark. 2003).

Özdüven ve Çelebi (2017), çiçeklenme başlangıcı döneminde hasat edilen yonca bitkisine LAB, E ve LAB+E inokulantı ilavesinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında 45. günde açılan silajları LA içeriklerini 33.06-52.47 g/kg KM, AA içeriklerini 10.26-24.38 g/kg olarak saptamışlardır. Yonca silajların fermantasyon kalitesini belirleyen LA ve AA miktarları için farklı literatürlerden elde edilen sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların kısmen uyum içerisinde olduğu söylenebilir.

PA içerikleri kontrol, SD3, SD5 ve SD7 gruplarında sırasıyla 4.96 g/kg KM, 3.82 g/kg KM, 2.75 g/kg KM ve 1.57 g/kg KM olarak bulunmuştur. Muamele gruplarının PA içeriği kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur ($P<0.01$).

Yonca silajlarının BA içerikleri 1.92- 1.22 g/kg KM arasında değişmiştir. Yonca silajlarında artan SDA oranına bağlı olarak silajların, BA içerikleri kontrol grubu silajlara oranla daha düşük tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Yuan ve ark. (2016) yapmış oldukları bir çalışmada yoncanın kontrol ve 4 farklı dozda sodyum diasetat ilave edilmiş gruplarında PA içeriklerini sırasıyla 2.91, 2.88, 2.74, 2.56 ve 2.34 g/kg KM, BA içeriklerini 1.59, 1.71, 1.66, 1.48 ve 1.53 g/kg KM olduğunu bildirmektedirler. Araştırma sonuçları dikkate alındığında silajların PA önceki çalışmalardan daha yüksek, BA değerlerinin ise benzer olduğunu söylenebilir.

4.2.1.7. Kuru madde kaybı%

Yonca silajlarının KM kaybı % 2.97-2.63 arasında değişmiştir. Yonca silajlarında artan SDA oranına bağlı olarak silajların, KM kaybı kontrol grubu silajlara oranla daha düşük tespit edilmiştir ($P<0.001$). Bu konuda yapılan benzer bir çalışmada KM kaybı % 8.75-13.6 olarak tespit edilmiştir (Yuan ve ark. 2016).

4.2.2. Yonca Silajlarının Mikrobiyolojik Özellikleri İle İlgili Bulgular

Yonca silajlarının mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir. Silajlarda LAB sayısı başlangıç materyaline oranla SDA ilavesiyle artmıştır. Kontrol grubunda 5.60 log₁₀ kob/g bulunurken SD3, SD5 ve SD7 gruplarında sırasıyla 5.68 log₁₀ kob/g, 5.95 log₁₀ kob/g ve 6.12 log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur ($P<0.001$). Özdüven ve Çelebi Çam (2017)’in çiçeklenme başlangıcı döneminde hasat edilen yonca bitkisine LAB, E ve LAB+E inokulanti ilavesinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında LAB sayılarını kontrol, LAB, E ve LAB+E silajlarında sırasıyla 5.47, 6.06, 5.06 ve 5.59 log₁₀ kob/g KM olarak bildirdikleri sonuçlar ile çalışmamızdan elde edilen LAB sayılarının uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Yonca silajlarında SDA uygulamasına bağlı olarak silajların maya sayıları artış göstermiştir. En yüksek maya sayısı 6.16 log₁₀ kob/g olarak SD7 grubunda tespit edilmiştir ($P<0.001$). Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda da SDA ilave edilmiş silajların LAB ve maya sayıları daha yüksek tespit edilmiştir (Yuan ve ark. 2016).

Kızılşimşek ve ark. (2016), fermantasyon süresi ilerledikçe maya sayılarında önemli azalmalar görülebildiğini, silajın fermantasyon döneminde mayaların varlığını sürdürmesinin anaerobik şartların devamlılığına, silajın pH değerine, organik asitlerin yoğunluğuna ve maya türüne bağlı olarak değiştiğini bildirmektedirler. Nitekim taze materyal ile karşılaştırıldığında fermantasyon süresince tüm silajların maya sayılarında azalma gözlenmiştir. Yonca silajlarında sadece kontrol gruplarında 2.00 log₁₀ kob/g düzeyinde küf tespit edilmiştir. Silo ortamında küflerin üremesi istenmez. Küflerin siloda bulunması yem alımının azalmasına, gebe hayvanlarda düşük yapmaya ve hormonal dengesizliklere yol açabilir (Kızılşimşek ve ark. 2016).

Çizelge 4.3. Yonca silajlarının mikrobiyoloji analiz sonuçları (log₁₀ kob/g KM)

Muameleler	LAB	MAYA	KÜF
TM	5.35	8.00	0.00
KONTROL	5.60±0.00 ^d	5.73±0.01 ^c	2.00±0.01 ^a
SD 3	5.68±0.02 ^c	5.78±0.10 ^c	0.00±0.00 ^b
SD 5	5.95±0.05 ^b	5.98±0.02 ^c	0.00±0.00 ^b
SD 7	6.12±0.05 ^a	6.16±0.04 ^a	0.00±0.00 ^b
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

SD3: 3g/kg sodyum diasetat, SD5: 5g/kg sodyum diasetat, SD7: 7g/kg sodyum diasetat,

LAB: Laktik asit bakterisi

^{abc}: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.001).

4.3. Silajların Aerobik Stabiliteyi

Araştırmada, silolamanın 45. günü açılan yonca silajlarına uygulanan 7 günlük aerobik stabilite testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Aerobik stabilitenin 7 gününde KM içerikleri kontrol, SD3, SD5 ve SD7 gruplarında sırasıyla %28.81, 30.52, 30.21 ve %32.62 olarak bulunmuştur. Yonca silajlarına SDA ilave edilmesi KM kaybını önlemiştir (P<0.001).

Yonca silajlarında aerobik stabilitenin 7. gününde kontrol, SD3, SD5 ve SD7 gruplarında belirlenen pH değerleri sırasıyla 6.45, 6.40, 6.00 ve 5.55 olarak bulunmuştur. Ancak SDA ilavesinin aerobik dönemde pH değeri üzerine istatistiki anlamda herhangi bir etkisi olmamıştır. Söz konusu dönemlerde belirlenen CO₂ miktarları ise gruplarda sırasıyla 43.25, 23.51, 21.73 ve 16.12 g/kg KM’dir. Yonca silajlarına SDA ilave edilmesi CO₂ üretimini düşürmüştür (P<0.001). Aerobik stabilitenin 7. gününde kontrol, SD3, SD5 ve SD7 gruplarında

belirlenen maya içerikleri 6.89 log₁₀ kob/g, 6.80 log₁₀ kob/g, 6.69 log₁₀ kob/g ve 6.38 log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur. Yonca silajlarına SDA ilave edilmesi maya içeriklerini önemli ölçüde düşürmüştür (P<0.001). Araştırma sonuçlarında en yüksek CO₂ miktarına sahip kontrol grubu silajların maya içerikleride buna paralel olarak daha yüksek tespit edilmiştir. Silajların aerobik bozulmasında birçok mikroorganizma rol almakla birlikte başlıca sorumlu olan mikroorganizmalar mayalar ve küflerdir. Mayalar organik asitleri tüketip ortam sıcaklığını arttırarak bozulmayı başlatırlar ve böylece silajın korunma özelliğini azaltırlar (Kurtoğlu 2011). Yonca silajlarına SDA ilave edilmesi küflenmeyi önlemiştir. Muamele gruplarında sadece kontrol grubu silajlarda 6.62 log₁₀ kob/g, düzeyinde küf tespit edilmiştir (P<0.001).

Çizelge 4.4. Yonca silajların 7. gün aerobik stabilite sonrası analiz sonuçları

Muameleler	KM	pH	CO ₂ ¹	Maya ²	Küf ²	Görsel Küflenme ³
KONTROL	28.81±0.50 ^c	6.45±0.85	43.25±1.11 ^a	6.89±0.00 ^a	6.62±0.00 ^a	4
SD 3	30.52±0.39 ^b	6.40±0.30	23.51±0.48 ^b	6.80±0.04 ^b	0.00±0.00 ^b	1
SD 5	30.21±0.11 ^b	6.00±0.10	21.73±0.73 ^b	6.69±0.03 ^c	0.00±0.00 ^b	1
SD 7	32.62±0.99 ^a	5.55±0.15	16.12±1.57 ^c	6.38±0.08 ^d	0.00±0.00 ^b	1
P	<0.001	Ö.D	<0.001	<0.001	<0.001	

¹CO₂ g/kg KM ² log₁₀ kob/g TM, KM: Kuru madde, SD3: 3g/kg sodyum diasetat, SD5: 5g/kg sodyum diasetat, SD7: 7g/kg sodyum diasetat

^{abc}: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.001).

³Silajlarda küflenme durumlarını görsel olarak 1'den 5'e kadar olan sayılarla değerlendirilmesidir. 1: hiç küf içermeyen bir silaj. 2: noktalar halinde çok az düzeyde küf içeren bir silaj. 3: noktalar halinde yüzeye yayılmış bir şekilde küf içeren bir silaj. 4: yüzeyi kısmen küf ile kaplı, bölge bölge küflenmiş yüzeyleri olan silaj. 5: yüzeyi tamamen küf ile kaplı, ağır bir kokuya sahip ve partikülleri birbirine yapışmış bir silaj. Bu değerlendirmeler üç kişi tarafından yapılmakta ve daha sonra üçünün ortalaması alınmaktadır.

4.4. LAB 16SrRNA Dizi Analizi Sonuçları

16SrRNA Dizi Analizi ile yapılan sonuçlarına göre popülasyon çeşitliliği fermentasyon dönemi sonrasında (45. gün) *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus brevis* ağırlıklı olmak üzere *Pediococcus pentosaceu* olarak belirlenmiştir. Aerobik stabilite dönemi sonrasında ise *Weissella paramesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.* *Bacillus megaterium* olarak belirlenmiştir.

Silajda en çok rastlanan LAB, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinslerine ait türlerdir ve silajda LA fermentasyonu çoğunlukla bu türler tarafından gerçekleştirilir. *Streptococcus faecium* bakterileri hızlı çoğalmakta ve pH değerini kısa sürede düşürmektedir (Pitt 1986).

Silaj içerisinde anaerobik mikroorganizmalardan olan *Lactobacillus brevis* veya *Lactobacillus buchneri* gibi LAB etkin olması istenirken, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, *Bacilli* ve *Listeria* gibi bakteriler, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia* ve *Saccharomyces* türü mayalar, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Pencillium* türü küf mantarları istenmemektedir. Bu tür bakteri, maya ve küflerin gelişimi silajın pH'sını arttırarak silaj kalitesinin düşmesine ve dolayısıyla da stabilitenin azalmasına neden olmaktadır (Basmacıoğlu ve Ergül 2002, Danner ve ark. 2003). Araştırma sonucu veriler değerlendirildiğinde fermantasyon dönemi istenen özelliklere sahip LAB'leri aerobik stabilite döneminde silajda arzu edilmeyen türdeki bakterilere dönüşmüştür.

Çizelge 4.5. İzole Edilen LAB'lerinin 16SrRNA Dizi Analizi sonuçları

Muameleler	45. gün	AS
KONTROL	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
SD 3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
SD 5	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus sp.</i>
SD 7	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>

SD3: 3 g/kg sodyum diasetat, SD5: 5 g/kg sodyum diasetat, SD7: 7 g/kg sodyum diasetat, AS: aerobik stabilite

5. SONUÇ

Silaj katkı maddesi olarak kullanılan asitlerin olumlu etkilerinin yanı sıra, silaj ekipmanları üzerine olan çürütücü etkileri nedeniyle bu asitlerin tuzlarının kullanılmasına olan ilgi artmıştır. Araştırmada kullanılan sodyum diasetat yonca silajlarının fermantasyonu özelliklerini aerobik stabilitesini olumlu yönde etkilemiştir. Laktik asit bakterilerinin gelişimini teşvik ederek LAB sayılarını ve etkinliğini artırmıştır. Buna bağlı olarak şekerlerin laktik aside dönüşümü artmış ortamda yüksek oranda bulunan LA, pH'yı düşürerek proteinleri parçalayan enzimleri inhibe etmiş ve proteinlerin amonyağa parçalanmasını düşürmüştür.

Araştırma sonuçları, yoncanın sodyum diasetat ilave edilerek silolanmasının kontrol grubundan daha avantajlı olduğunu ortaya koymuştur. Ancak bu konudaki çalışmaların laboratuvar koşulları dışında, gerek saha gerekse hayvan materyali ile desteklenmesinin gerekli olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Anonymous (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 Study The Aerobic Deterioration of Silages. Canadian Agricultural Engineering, 33, 391-393.
- Avcioğlu R, H Geren, A Tamkoç ve Y Karadağ (2009). Yonca (*Medicago sp. L.*). Baklagil Yembitkileri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir, Cilt II:290-333.
- Basmacıoğlu H, Ergül M (2002). Silaj Mikrobiyolojisi. Hayvansal Üretim Dergisi 43 (1): 12-24.
- Behgar M, Mesgaran MD, Moghadam HN, Rad SS (2007). Chemical composition, dry matter and crude protein degradability of alfalfa silage treated with formic asit and sulphuric asids and its effect on performance of early lactating Holstain cows. Journal of science and technology of agriculture and natural resources, 11, (40(B)): 339-350.
- Bolsen K, Ashbell G, Weinberg Z (1996). Silage fermentation and silage additives (a review). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 9(5), 483-494.
- Brdy CJ (1961). The leaf proteases of *Trifolium repens*. Biochemical Journal, 78: 631-640.
- Brewer MS, Rostogi BK, Argoudelis L, Sprouls GK (1995). Sodium lactate / Sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. J. Food Sci, 1995; 60(1): 58-62.
- Can HY, Çelik TH (2008). Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. Vet. Hekim Der. Derg., 79(4): 35-40.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ (2010). Üzüm Posasının Yonca Silajlarında Karbonhidrat Kaynağı Olarak Kullanılma Olanakları. Kafka Üniv. Vet. Fak. Derg. 16(2): 269-276.
- Cubina I (1995). Natural lactic acid L(+) and lactates in the food industry. 5th International Congress on Food Industry New Aspects on Food Processing. Kuşadası, Turkey, 23-28 April, Proceeding; 106-108.

- Çiftçi M, Çerçi İH, Dalkılıç B, Güler T, Ertaş ON (2005). Elmanın Karbonhidrat Kaynağı Olarak Yonca Silajına Katılma Olanasının Araştırılması. YYÜ Vet. Fak. Derg. 16 (2):93-98.
- Davies D, Merry R, Williams A, Bakewell E, Leemans D, Tweed J (1998). Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. Journal of Dairy Science, 81, 444–453.
- Dibner JJ, Buttin P (2002). Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. J App Poult Res, 11:483-463.
- Djordjevic N, Grubic G, Glamocic D (2004). Effects of the use of acetic acid as the conservant in lucerne ensiling. Journal of Agricultural Sciences, Belgrade, 49, (1): 59-64.
- Dorszewki P, Grabowicz M, Mikoajczak J, Piat J, Szterk P, Sucharska I, Simko M (2006). Usefulness of various biological additions for ensiling green fodder of alfalfa. Polish Journal of Natural Sciences, Supplement, 3: 45-51.
- Efe E, Bek Y, Şahin M (2000). SPSS’te Çözümleri ile İstatistik Yöntemler II. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları, Kahramanmaraş, 223s.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ, Yalçın S, Yıldız G, Küçükerşan MK, Küçükerşan S, Önal AG, Muğlalı ÖH, Şehu A (1999). Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Basımevi, 57-58.
- Esmail SH, Muwalla MM (1997). Effects of formic acid and enzyme treatments on chemical composition, fermentation characteristics, and nutritive value of alfalfa silages fed to Awassi lambs. Wirtschaftseigene Futter, 43, (3): 223-233.
- FDA (2000). Code of Federal Regulations, Available at <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/99-028DF.htm>.
- Filya I, Sucu E (2007). The effect of bacterial inoculants and a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of whole crop cereal silages. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 20(3), 378–384.
- Filya İ, Sucu E, Hanoğlu H (2004). Biyolojik Silaj Katkı Maddeleri Kullanılarak Yapılan Küçük Plastik Balya Mısır Silajının Kalite Özellikleri, Yem Değeri ve Kuzu Besisinde Kullanımı Üzerine Bir Araştırma. A.Ü. Zir. Fak. Tarım Bilimleri Dergisi, 10 (2) 158-162.

- Gaiying L, Pengyun G, Yalei T, Yinfeng W, Pengfei S (2008). Effects of molasses and other supplements on quality of Lucerne silage. *China Dairy Cattle*, 2: 20-23.
- Guo X, Zhou H, Yu Z, Zhang Y (2007). Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of Lucerne treated with different additives, *Grass and forage science*, 62, (1): 35-43.
- Haigh PM, Appleton M, Clench SF (1987). Effect of Commercial Inoculant and Formic Acid±Formalin Silage Additives on Silage Fermentation and Intake and on Liveweight Change of Young Cattle. *Grass and Forage Science* 42, 405-410.
- Haigh PM, Parker JWG (1985). Effect of Silage Additives and Wilting on Silage Fermentation, Digestibility and Intake and on Liveweight Change of Young Cattle. *Grass and Forage Science*. 40:429-436.
- Hancock DW, Collins M (2006). Forage Preservation Method Influences Alfalfa Nutritive Value and Feeding Characteristics. *Crop Sci.* 46: 688-694.
- Henderson N (1993). Silage additives. *Animal Feed Science Technology*, 45: 35-36.
- Huairong F, Long T, Cui W, Hou X, Zhang H (2006). The effect of using compound inoculant bacteria on ensilage of maize and alfalfa. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 43, (1): 75-77.
- Islam MZ, Khandaker ZH, Chowdhury SD, Islam KMS (2008) Effect of citric acid and acetic acid on the performance of broilers. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 6(2): 315–320.
- Joerger RD (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Sci.*, 82: 640–647.
- Jones R (1995). Role of Biological Additives in Crop Conservation. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. 465:479.
- Kılıç A (1986). Silo Yemi. *Bilgehan Basımevi Bornova İzmir*. 1986. 68-72.
- Kızıllı M, Erol A, Ertekin İ, Dönmez R, Katrancı B (2016). Silaj Mikro Florasının Birbirleriyle İlişkileri, Silaj Fermentasyonu ve Kalitesi Üzerine Etkileri. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 19 (2), 136-140.
- Kızıllı M, Schmidt R, Kung L (2007). Effects of a mixture of lactic acid bacteria applied as freeze-dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), 5698–5705.

- Koos JT (1992). Preservation of food products with natural ingredients. *Food Mark. Technol*; 3: 5-11.
- Kozelov LK, Lliev F, Hiristov An, Zaman S, Mcallister TA (2008). Effect of fibrolytic enzymes and an inoculant on in vitro degradability and gas production of low-dry matter alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, (14): 2568-2575.
- Kung LJr, Tung RS, Maciorowski K (1991a). Effect of Microbial Inoculant (Ecosyl-TM) and/or a Glcopeptide Antibiotic on Fermentation and Aerobic Stability of Wilted Alfalfa Silage. *Animal Feed Science and Technology* 35, 37-48.
- Kung LJr, Tung RS, Maciorowski KG, Buffum K, Knutsen K, Aimutis WR (1991b). Effects of Plant Cell-wall-degrading Enzymes and Lactic Acid Bacteria on Silage Fermentation and Composition. *Journal of Dairy Science* 74, 4284-4296.
- Kurtoğlu V (1998). Mikrobiyel İnokulant ile Hazırlanan Yonca Silajının Süt İneklerinde Süt ve Bileşimi ile İnokulasyonun Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Konya.
- Kurtoğlu V (2011). Silaj ve Silaj Katkıları. Aybil Yayınevi Konya.
- Kurtoğlu V, Coskun B (2004). Effects of microbial inoculation on alfalfa silage quality. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 14, (1/2): 78-84.
- Lindgren S, Lingvall P, Kaspersson A, Kartzow A, Rydberg E (1983). Effect of Inoculants, Grain and Formic Acid on Silage Fermentation. *Swedish Journal of Agricultural Research* 13, 91-100.
- Lindgren S, Pettersson K, Jonsson A, Lingvall P, Kaspersson A (1985). Silage Inoculation- Selected Strains, Temperature, Wilting and Practical Application. *Swedish Journal of Agricultural Research* 15, 9-18. .
- Liqiang W, Xianglin L, Xinping Z, Feng H (2007a). The effect of different water contents and additive mixtures on *Medicago sativa* silage, *Acta Prataculturae Sinica*, 16, (2): 40-45.
- Liqiang W, Xianglin L, Xinping Z, Feng H (2007b). Effect of adding lactic acid bacteria and glucose on alfalfa silage quality, *Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao/ Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 15, (3): 126-128.

- Makoni NF, Shelford JA, Fisher LJ (1991). The rate and extent of silage nitrogen degradation in the rumen as influenced by wilting and duration of regrowth. *Canadian Journal of Animal Science*, 71: 243-248.
- Martinsson K (1991). A Comparison Between Formic Acid and an Inoculant for the Preservation of Grass Silage for Dairy Cows. *Swedish Journal Agricultural Research* 21, 121-130.
- McDonald P, Edward R, Greenhalgh J (1981). Silage. In *Animal Nutrition*, Third Edition, (pp. 367–376).
- McDowell LR (1989). Vitamins in Animal Nutrition. Academic Press. INC. Santiago, California, 57-67.
- Mckersie BD (1985). Effect of pH on proteolysis in ensiled legume forage. *Agronomy Journal*, 77: 81-86.
- Mirza MW, Rehman ZU, Mukhtar N (2016). Use of Organic Acids as Potential Feed Additives in Poultry Production. *J. World's Poult. Res.* 6(3): 105-116.
- Muck RE (1987). Dry matter level effect on alfalfa silage quality. I. Nitrogen transformation. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 30: 7-14.
- Ohshima M, Liman C, Kimura E, Oshima Y, Yokoto H (1997). Influence of addition of previously fermented juice to alfalfa ensiled at different moisture contents. *Grassland Science*, 43, (1): 56-58.
- Ostrowski R (1999). Ensiling fresh lucerne supplemented with lactic acid, sugar and mass containing lactic fermentation bacteria. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 26, (1): 199-207.
- Ozturk D, Kızılsimsek M, Kamalak A, Canbolat O, Ozkan CO (2006). Effects of ensiling alfalfa with whole maize crop on the chemical composition and nutritive value of silage mixtures. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 19, (4): 526-532.
- Öksüztepe G, Çoban ÖE, Güran Ş (2010). Sodyum laktat ilavesinin taze Gökkuşuğu Alabalığından (*Oncorhynchus mykiss* W.) yapılan köftelere etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-A): S65-S72.

- Papadopoulos LS, Miller RK, Ringer LJ, Cross HR (1991). Sodium lactate effect on sensory characteristics, cooked meat color and chemical composition. *J. Food Sci.* 56(3): 621-635.
- Papatsiros VG, Katsoulos PD, Koutoulis KC, Karatzia M, Dedousi A, Christodoulouopoulos G (2013). Alternatives to antibiotics for farm animals. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. April, 2013.
- Pena MJ, Zea J, Diaz MD (2000). Effect of the additive type on the characteristic of alfalfa silage and on the young bulls growth. *Pastagens e Forragens*, 21: 633-637.
- Phillips WA, Pendlum LC (1984). Digestibility of wheat and alfalfa silage with and without wheat straw. *Journal of Animal Science*, 59: 476-482.
- Pitt R (1986) Microbial and enzymatic additives for ensiling. 54th, (pp. 137–147). Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. *Proc Cornell Nutr Conf Feed Manuf* 1992.
- Playne MJ, McDonald P (1966). The Buffering Constituent of Herbage and Silage, *J. Sci. Fd. Agric*, 17, 264-268.
- Polan CE, DE Stieve and JL Garrett (1998). Protein Preservation and Ruminant Degradation of Ensiled Forage Treated with Heat, Formic Acid, Ammonia, or Microbial Inoculant. *J. Dairy Sci.* 81:765-776.
- Ricke SC (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci.* 82: 632–639.
- Ruixia T, Yuan A, Jinfeng L, Guangwen W (2005). Effects of additives on quality of Lucerne silage. *Grassland of China*, 27, (4): 10-14.
- Seale DR, Henderson AR, Petterson KO, Lowe JF (1986). The effect of Addition of Sugar and Inoculation with Two Commercial Inoculants on The Fermentation of Lucerne Silage in Laboratory Silos. *Grass and Forage Science* 41, 61-70.
- 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.
- Sheperd AC, Maslanka M, Quinn D, Kung LJr (1995). Additives Containing Bacteria Enzymes for Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science* 78, 565-572.

- Singh K, Honig H, Wermke M, Zimmer E (1996). Fermentation pattern and changes in cell wall constituents of straw-forage silages, straw and partners during storage. *Animal Feed Science and Technology*, (pp. 137–153).
- Stokes M (1992). Effects of an enzymes mixture, an inoculant and their interaction on silage fermentation and dairy production. *Journal of Dairy Science*, 75, 764–773.
- Supelco (1998). Analyzing fatty acids by packed column gas chromatography, Sigma-Aldrich Corp, Bulletin 856, Bellefonte, PA.
- Tao Z, Li L, Zhang Y, Li S, Wu H, Hu Y (2007). The application effect of adding silage inoculants bacteria in *Medicago sativa* silages, *Acta Prataculturae Sinica*, 16, (1): 100-104.
- Theobald P (2015). Principles of using organic acids in animal nutrition. https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/Principles_of_using_organic_acids_in_animal_nutrition.pdf (29.06.2017).
- Tompkin RB (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 2002; 65: 709–725.
- Vatansever M, Polat C, Koç F, Özdüven ML (2009). Yonca balya silajlarında farklı katkı maddesi kullanımının silaj fermantasyonu ve aerobik stabilite üzerine etkileri. VI. Ulusal Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı), 30 Haziran-1 Temmuz 2009 Samsun.
- Virtanen AI (1993). The AIV. method of preserving fresh fodder. *Empire Journal of Experimental Agriculture*, 1: 143-155.
- Wang Y, Barbieri, LR Berg, BP Mcallister, TA (2007). Effects of mixing sainfoin with alfalfa on ensiling, ruminal fermentation and total tract digestion of silage. *Animal Feed Science and Technology*, 135, (3-4): 296-314.
- Weinberg ZG, Muck RE (1996). New Trends and Opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*. 19:53-68.
- Wen AY, Yuan XJ, Wang J, Desta ST, Shao T (2017). Effects of four short-chain fatty acids or salts on dynamics of fermentation and microbial characteristics of alfalfa silage. *Animal Feed Science Technology*. 223: 141-148.
- Woolford M (1990). The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Microbiology*, 68(2), 101–116.

- Xian L, Lujia H, Shinichiro H, Kazuhisa N (2004). Effects of different additives on the quality of alfalfa silage, *Journal of China Agricultural University*, 9, (3): 25-30.
- Yuan XJ, Wen AY, Wang J, Desta ST, Dong ZH, Shao T (2016). Effects of four short-chain fatty acids or salts on fermentation characteristics and aerobic stability of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage. *J.Sci Food Agric*; 98: 328–335
- Yuan XJ, Wen AY, Desta ST, Wang J, Shao T (2017). Effects of sodium diacetate on the fermentation profile, chemical composition and aerobic stability of alfalfa silage. *Asian-Australas J Anim Sci* 30: 804-810.
- Yurtman İY, Koç F, Özdüven ML, Erman S (1997). Silaj Üretiminde Mikrobiyal Katkı Maddelerinin Kullanımı. *Trakya Bölgesi II. Hayvancılık Sempozyumu*, 346-351, Tekirdağ.
- Zhu Y, Nishino N, Kishida Y, Uchida S (1999). Ensiling characteristics and ruminal degradation of Italianryegrass and Lucerne silages treated with cell-degrading enzymes. *Journal of the science of food and Agriculture*, 79, (14): 1987-1992.

ÖZGEÇMİŞ

1965 Erzincan'da doğdu. İlkokulu Erzincan Mehmetçik İlkokulu, ortaokulu Merkez Ortaokulu ve liseyi Erzincan Lisesi'nde okudu. 1987-1991 yıllarında Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümünde okudu. 1991-1993 yılında Tekirdağ Köy Kooperatifleri Birliğinde çalıştı. Ocak 1997 tarihinden beri sınıf öğretmenliği yapmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bana her konuda destek olan danışmanım Prof. Dr. Fisun KOÇ hocama her konuda desteğini esirgemeyen eşim Özkan AKCA'ya ve oğlum Anıl AKCA' ya çok teşekkür ederim.

2019-Tekirdağ

Fatma Hışman AKCA