T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

"İN VİVO VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA OLUŞTURULAN SUBAKUT ASİDOZİS DURUMUNDA *MEGASPHAERA ELSDENİİ* İNOKULASYONUNUN RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ"

"Mustafa Selçuk ALATAŞ"

DOKTORA TEZİ

HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman
"Prof. Dr. Huzur Derya UMUCALILAR"

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİVO VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA OLUŞTURULAN SUBAKUT ASİDOZİS DURUMUNDA *MEGASPHAERA ELSDENİİ* İNOKULASYONUNUN RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

"Mustafa Selçuk ALATAŞ"

DOKTORA TEZİ

HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Huzur Derya UMUCALILAR

"BAP, 09102046"
Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102046 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ÖNSÖZ

Süt ineklerinin, özellikle geçiş dönemi olarak adlandırılan kuru dönemin son üç haftası ile doğumdan sonraki dört haftayı içerisine alan dönem ile besi hayvanlarının besi bitiş döneminde artan besin maddesi ihtiyaçlarını karşılamak için rasyonda kaba yem oranı ve miktarı azaltılırken, konsantre yem oranı arttırılmaktadır. Bu besleme yönteminin uygun bir şekilde yapılmaması sonucu rumen fermentasyonu bozularak subakut rumen asidozisi (SARA), ilerleyen durumlarda da akut asidozis ve bunların yol açtığı bazı önemli hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. SARA'dan kaynaklanan sorunlar klinik olarak gözden kaçtığından görülme sıklığı hakkındaki bildirimler gerçeği yansıtmamakla birlikte bütün sürülerde, SARA'nın sıklıkla oluştuğu fakat fark edilmeyerek verim kayıplarına neden olduğu düşünülmektedir. SARA sonucunda canlı ağırlık kaybı, süt veriminin azalması ve döl verimi üzerine olumsuz etkiler gözlenmektedir. Ayrıca SARA, metabolik hastalıklara duyarlılığı arttırarak besleme hatalarının devam etmesi ile birlikte olay şiddetlenerek ölüm şekillenebilmektedir. Bu bilgiler ışığında SARA'nın neden olduğu hasar ve verim kayıpları finansal olarak değerlendirildiğinde ortaya çok ciddi ekonomik kayıplar çıkmaktadır. Bu araştırmada, rumenin doğal florasında bulunan laktik asit kullanan bakteri olarak bilinen *Megasphaera elsdenii*'nin SARA durumunda rumen ve kan parametreleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

Bu araştırmanın yapılmasında araştırmayı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne, doktora eğitimi süresince yapılacak bilimsel çalışmaların kaliteli, özgün, işin zorluğunu düşünmeden yapılmayanı yaparak, zoru başarmak ve sonrakilere faydalı olmak için yapılması gerektiğini idrak ettiren, benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Huzur Derya UMUCALILAR'a, deneysel çalışma süresince mikrobiyolojik çalışmaların her aşamasında bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet GÜNER'e, doktora eğitimim süresince her zaman yardım ve tavsiyelerini hiç esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Behiç ÇOŞKUN ve Prof. Dr. Nurettin GÜLŞEN'e, gaz kromatografik analizlerimi yapan Dr. Özcan Barış ÇİTİL'e teşekkürleri bir borç bilirim.

Ayrıca bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan dualarını üzerimden hiç eksik etmeyen aileme ve doktora süresince her türlü fedakârlığa katlanan sevgili eşime çok teşekkür ederim.

Mustafa Selçuk ALATAŞ
2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ii

İÇİNDEKİLER iv

ÇİZELGELER DİZİNİ vii

GRAFİKLER DİZİNİ viii

RESİMLER DİZİNİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xi

1.GİRİŞ 1

1.1. RUMEN ASİDOZİSİ 2

1.1.1. Akut Rumen Asidozisi 3

1.1.2. Subakut Rumen Asidozisi 3

1.2. SUBAKUT RUMEN ASİDOZİSİNİN TEŞHİSİ 7

1.2.1. Rumen pH'sındaki değişimler 7

1.2.2. Süt Kompozisyonunundaki Değişimler 8

1.2.3. Yem Tüketiminin Baskılanması 9

1.2.4. Dışkı Görünümündeki Değişimler 10

1.2.5. Laminitis 10

1.3. KORUNMA ÖNLEMLERİ 11

1.3.1. Rasyon ve Yemleme düzeninin Kontrolü 11

Uygun rasyon ile rumen adaptasyonunun sağlanması 11

Uygun kaba yem oranı ve partikül büyüklüğü ile yeterli ruminal tamponlamanın sağlanması 12

Öğün sayısının artırılması ile rumen asit-baz dengesinin ayarlanması 13

1.3.2. Rumen pH'sının Kontrolü 13

1.3.3. Rumen Fermentasyonunun Kontrolü 14

1.4. LAKTİK ASİT KULLANAN BAKTERİLER 15

2. GEREÇ VE YÖNTEM 18

2.1 *Megasphaera elsdenii* Kültürünün Canlandırılması ve Çoğaltılması 18

2.2 Deneme I*: İn vivo* Deneme 23

2.2.1 Arpaya Dayalı Tane Yem Karışımı ile Yapılan Uygulama 25

Hızlı adaptasyon 25
Subakut asidozis dönemi 25
2.2.2 Buğdaya Dayalı Tane Yem Karışımı ile Yapılan Uygulama 26
Hızlı adaptasyon 26
Subakut asidozis dönemi 27
2.3 Deneme II: *İn vitro* Deneme 28
2.3.1 Hayvan Materyali 28
2.3.2 Rumen Sıvısının Alınması 28
2.3.3 Çözeltilerin Hazırlanması 29
2.3.4 İnkübasyon Vasatının Hazırlanması 29
2.3.5. *İn Vitro* Ortamda Asidozis Oluşturulması 30
2.3.6. *İn Vitro* Subakut Asidozis Ortamına *M. elsdenii*'nin Katılması 31
2.4. Rumen Ortamı Analizleri 32
2.4.1. pH Değerinin Belirlenmesi 32
2.4.2. Amonyak Azotu Tayini (NH3-N) 32
2.4.3. Uçucu Yağ Asitleri Tayini (UYA) 32
2.4.4. Laktik Asit Tayini 32
2.4.5. Protozoa Sayısının Tespiti 33
2.5. Kimyasal Analizler 33
2.6. İstatistiksel Analizler 33
3. BULGULAR 35
3.1. *İn Vivo* Deneme 35
3.1.1. Kuru Madde Tüketimi (KMT)'nde Gözlenen Değişimler 35
3.1.2. Rumen Sıvısı pH'sında Belirlenen Değişimler 36
3.1.3. Rumen Sıvısı Uçucu Yağ Asitleri (UYA) Parametrelerindeki Değişimler 39
3.1.4. Laktik Asit Yoğunluğu Üzerine Değişimler 48
3.1.5. Rumen Sıvısı Amonyak Yoğunluğundaki Değişimler 50
3.1.6. Rumen Sıvısı Protozoa Yoğunluğundaki Değişimler 52
3.1.7. Kan Parametrelerinde Belirlenen Değişimler 54
3. 1. *İn Vitro* Deneme 59
4. TARTIŞMA 62
4.1. Yem Tüketimi Üzerine Etkiler 62
4.2. Rumen Fermentasyonu Üzerine Etkiler 65

4.2.1. pH Üzerine Gerçekleşen Etkiler 66
4.2.2. Rumen Uçucu Yağ Asiti Düzeyleri Üzerine Gerçekleşen Etkiler 69
4.2.3. Laktik Asit Yoğunluğu Üzerine Gerçekleşen Etkiler 71
4.2.4. Amonyak Azotu Üzerine Gerçekleşen Etkiler 73
4.2.5. Protozoa Yoğunluğu Üzerine Gerçekleşen Etkiler 73
4.3. Kan Parametreleri Üzerine Etkiler 75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 77
6. ÖZET 78
7. SUMMARY 79
8. KAYNAKLAR 80
9. EKLER 87
10. ÖZGEÇMİŞ 88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *M. elsdenii*'ye uygulanan biyokimyasal identifikasyon testi sonuçları 19

Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan tane yem karışımları ile kuru yoncanın kuru madde (KM) ve besin madde içerikleri; %KM 24

Çizelge 2.3. Düvelere yedirilen pelet yonca ve karma yemin besin madde düzeyleri 28

Çizelge 3.1. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde kuru madde tüketiminde gözlenen değişimler 35

Çizelge 3.2. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısı pH'sındaki değişimler 36

Çizelge 3.3. Tane yem karışımları ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak rumen sıvısı pH, amonyak (NH_3) ve laktik asit düzeyleri 38

Çizelge 3.4. *İn vivo* deneme dönemlerinde tane yem karışımları ve oranları ile *M.elsdenii* inokulasyonuna bağlı olarak UYA parametrelerinde meydana gelen değişimler 42

Çizelge 3.5. Deneme dönemlerinde tane yem karışımlarına ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak rumen sıvısı UYA parametrelerinde meydana gelen değişimler 43

Çizelge 3.6. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısındaki laktik asit yoğunlukları 49

Çizelge 3.7. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısı amonyak yoğunlundaki değişimler 50

Çizelge 3.8. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısındaki protozoa sayıları 52

Çizelge 3.9. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde kan parametrelerindeki değişimler 57

Çizelge 3.10. Deneme dönemlerinde tane yem karışımlarına ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak kan parametrelerinin grup ortalamaları 58

Çizelge 3.11. *İn vitro* ortamda test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası *M. elsdenii* inokulasyon düzeyine bağlı olarak gerçekleşen değişimler 59

Çizelge 3.12. Test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası *M. elsdenii* inokulasyon düzeyine bağlı olarak UYA parametrelerindeki değişimler 60

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Tane yem çeşidine bağlı olarak her rasyon kombinasyonunun 1. ve 3. günü alınan rumen pH ortalamaları 37

Grafik 3.2. SARA döneminde bakteri inokulasyonuna bağlı olarak günlere göre pH'larda gözlenen değişiklikler 38

Grafik 3.3. Adaptasyon döneminde tane yem oranın artmasına bağlı olarak asetik asit ve bütirik asit düzeyileri arasındaki belirlenen değişiklikler 39

Grafik 3.4. Tane yem çeşidine bağlı olarak tane yem oranın artmasının toplam uçucu yağ asitleri düzeyleri üzerine etkisi 40

Grafik 3.5. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidine bağlı olarak günlere göre toplam uçucu yağ asitleri düzeyindeki değişimler 40

Grafik 3.6. Adaptasyon döneminde tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre propiyonik asit düzeyindeki değişimler 41

Grafik 3.7. Adaptasyon döneminde tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre toplam uçucu yağ asitleri düzeyindeki değişimler 41

Grafik 3.8. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidi ve tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre asetik asit oranındaki değişimler 44

Grafik 3.9. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidindeki tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre propiyonik asit oranındaki değişimler 45

Grafik 3.10. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun propiyonik asit ve bütirik asit düzeyine etkileri 46

Grafik 3.11. SARA döneminde tane yem çeşidi ile *M. elsdenii* inokulasyonun etkisine bağlı olarak günlere göre toplam UYA'lardaki değişimler 46

Grafik 3.12. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun toplam UYA düzeyine etkileri 47

Grafik 3.13. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun ve tane yem çeşidinin As/Pr oranı üzerine etkisi 47

Grafik 3.14. Adaptasyon döneminde rumende laktik asit yoğunluğunun tane yem oranı ve günlere bağlı olarak değişimi 48

Grafik 3.15. Adaptasyon dönemi boyunca tane yem çeşidine ve oranına bağlı olarak amonyak düzeyindeki değişimler 51

Grafik 3.16. SARA döneminde tane yem çeşidi ve bakterinin etkisine bağlı olarak protozoa sayısında gözlenen değişimler 53

Grafik 3.17. SARA döneminde tane yem çeşidi, bakteri inokulasyonu ve numune alma zamanlarında kan CO_2 düzeyi üzerine gerçekleşen etkileşimler 54

Grafik 3.18. SARA döneminde tane yem çeşidi arasında bakteri inokulasyonunun kan laktat düzeyi üzerine etkileri 55

Grafik 3.19. SARA döneminde tane yem çeşidi, bakteri inokulasyonu ve numune alma zamanlarında kan laktat düzeyi üzerine gerçekleşen etkileşimler 56

Grafik 3.20. Farklı düzeylerdeki bakteri inokulasyonunun inkübasyon saatlerine bağlı olarak toplam UYA yoğunluğu üzerine etkileri 61

Grafik 3.21. Farklı düzeylerdeki bakteri inokulasyonunun bütirik asit oranı üzerine etkileri 61

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1. Boncuklu saklama brothunda muhafaza edilen *M.elsdenii* kültürü 18

Resim 2.2. *M. elsdenii* kültürünün normal ve kanlı TSA'da gözlenen koloni formları 19

Resim 2.3. Gram boyama sonrası saf *M. elsdenii* kültürünün ışık mikroskoptaki kendine özgü Bal Peteği görüntüsü 20

Resim 2.4. *M. elsdenii*'nin üretilmesi için kullanılan kapakları lastikli anaerobik jarlar 20

Resim 2.5. *M. elsdenii* inokulasyonu öncesi ve inokulasyondan 48 saat sonraki TSB'nin görüntüsü 21

Resim 2.6. *M. elsdenii* üretilmiş pyrex şişelerdeki ringer solüsyonunun optik dansitesi 22

Resim 2.7. *M. elsdenii*'nin ondalık dilüsyonlarının TSA'daki görüntüsü 23

Resim 2.8. *İn vivo* çalışmanın yürütüldüğü bireysel bölmeler 24

Resim 2.9. *İn vitro* denemede kullanılan pyrex şişe ve gaz basınçlarının ölçüldüğü dijital manometre 30

SİMGELER VE KISALTMALAR

SARA	: Subakut Rumen Asidozisi
UYA	: Uçucu Yağ Asitleri
NDF	: Nötral Deterjanda çözünmeyen lifli maddeler
KM	: Kuru Madde
peNDF	: Fiziksel Etkin NDF
CFU	: Colony Formig Unit
mEq	: Milliequivalents
D-LDH	: D-laktat dehidrogenaz
ATP	: Adenosine Triphosphate
DFM	: Direkt Yedirilen Mikroorganizmalar
ADTYK	: Arpaya Dayalı Tane Yem Karışımı
BDTYK	: Buğdaya Dayalı Tane Yem Karışımı
TY	: Tane Yem
TYO	: Tane Yem Oranı
BE	: Base Excess
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSA	: Tryptic Soy Agar
AÖM	: Azotsuz Öz Madde
NFC	: Lif Olmayan Karbonhidrat

1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan modern entansif yetiştiricilikte her an karşımıza çıkma ihtimali olan asidozis vakaları birçok ekonomik kayba neden olmaktadır. Yüksek verimli süt ineklerinin rasyonlarında alıştırma dönemi uygulanmadan yüksek düzeyde konsantre yem kullanılması durumunda ortaya çıkan asidozis ve buna bağlı bozukluklarla oldukça sık karşılaşılmaktadır. Besinin bitiş döneminde konsantre yem düzeyinin %80'nin üzerine çıkması da asidozis insidensini artırmaktadır.

Retikulo-rumenin sağlıklı ve fonksiyonlarının düzenli olması süt ineklerinin sağlık ve performansı için oldukça önemlidir. Rumendeki fermentasyonun optimum düzeyde tutulması ile hayvanın besin maddesi ihtiyacı karşılanmakta, besin maddeleri etkin bir şekilde kullanılmakta, karlılığın artırılmasıyla birlikte çevreye verilebilecek zarar da minimumda tutulmaktadır.

Yüksek verimlilik ve hastalık insidensinin düşük olduğu bir laktasyon dönemi geçirilmesi karlı bir yetiştiricilik için en temel noktadır. Gıda güvenliğini de göz önüne alarak üretim yapmak ve kazancı en yüksek seviyede tutabilmek yetiştiriciliği daha zor bir hale getirmektedir. Özellikle süt ineği yetiştiriciliğinde karlılığı artırabilmek için, süt verimi artırılırken mümkün olabilecek en düşük fiyata rasyonun temin edilebilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda işletme için büyük öneme sahip sağlık ve üreme ile ilgili ekonomik kayıplar da en az seviyede tutulmalıdır. Son yıllarda genetik seleksiyonla süt veriminin artırılması, sağlık ve fertilite ile ilgili problemleri de beraberinde getirmiştir. Sağlık ve fertilite ile ilgili problemlerdeki artış satılabilir özellikteki sütün miktar ve kalitesini azaltmakta, tedavi ve hayvanın sürüden çıkarılması nedeniyle oluşan masrafları artırmaktadır. Geçiş dönemi olarak adlandırılan ve kuru dönemin son 3 haftası ile laktasyonun ilk 3-4 haftasını kapsayan dönemde metabolik hastalıkların görülme sıklığı artmaktadır. Geçiş dönemi beslemesi ve yetiştirme programları doğum sonrası hastalıkların insidensini, süt verimini, annenin ve yavrunun sağlığını ve fertiliteyi dolayısıyla süt ineği yetiştiriciliğinin verimliliğini etkilemektedir. Doğumdan sonra süt veriminin başlamasıyla birlikte hayvanların enerji ihtiyacı artmaktadır. Süt veriminin en yüksek seviyeye ulaşabilmesi ancak yüksek düzeyde besleme ile mümkün olmaktadır. Bu nedenle özellikle yüksek verimli süt ineklerinde yaşama, süt üretimi ve üreme fonksiyonları için yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Kuru dönemde

kaba yem ağırlıklı beslenen hayvanların enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için rasyonun büyük bir kısmının arpa ve buğday gibi kolay eriyebilir karbonhidrat içeriği yüksek yemlerden oluşturulması gerekmektedir. Besleme düzeninin herhangi bir adaptasyon uygulanmadan ani olarak değiştirilmesi rumen ortamının bozulmasına ve rumen asidozisi vakalarının artmasına neden olmaktadır. Rumen asidozisinin yem tüketiminde azalma, sindirim sistemi dokularında hasar, karaciğer apseleri, laminitis ve yangısal reaksiyonlar gibi olumsuz etkileri de göz önüne alındığında verimi ve karlılığı azaltmasının yanı sıra çok ciddi sağlık problemlerine de yol açabileceği görülmektedir.

Türkiye'de subakut ruminal asidozisin (SARA) görülme sıklığını ortaya koyan bir saha çalışmasına rastlanılmamıştır. Ancak Türkiye şartlarında metabolik hastalıklar nedeniyle yapılan sürü ayıklamaları, ayak hastalıkları, süt yağı oranının düşüklüğü ve bazı üreme problemlerinin yüksekliği göz önünde bulundurulduğunda subakut asidozis durumunun ruminant yetiştiriciliğini önemli düzeyde etkilediği sonucuna varılmaktadır.

1.1. RUMEN ASİDOZİSİ

"Geçiş dönemi" olarak bilinen ve kuru dönemin son 3 haftası ile doğumdan sonraki 4 haftayı içerisine alan dönem laktasyon açısından oldukça önemlidir. Bu dönemde hormonal ve metabolik değişikliklerin yanı sıra sindirim sistemi dokularının fonksiyon ve aktivitesinde de önemli değişiklikler oluşmaktadır. Yüksek verimli süt ineklerinde doğumu takiben başlayan ve giderek artış gösteren süt verimi ile birlikte gebeliğin son döneminde günlük 60 MJ NEL olan enerji ihtiyacı doğumdan sonraki ilk haftalarda günlük 150 MJ NEL'e yükselmektedir (Martens ve ark 2012). Kuru madde (KM) tüketiminin bu ihtiyacı karşılayamaması sonucu ortaya çıkan enerji açığı vücut yağlarının mobilize olmasına neden olmaktadır. Bu açığı kapatmak için rasyonda konsantre yem düzeyinin artırılması gerekmektedir.

Laktasyon başlangıcında konsantre yem düzeyinin hızla artırılması ile birlikte rumen mikroflorasının bu ortama adapte olamaması ve rumen epitelinin emilim kapasitesinin düşük olması fermentasyonla üretilen uçucu yağ asitlerinin (UYA) rumende birikmesine neden olmaktadır. Uçucu yağ asitlerinin birikmesi sonucu azalan rumen pH'sı fibrolitik aktiviteyi ve fibröz yemlerin yıkımlanmasını

baskılamaktadır. Bu durum doğum sonrası dönemde zaten negatif enerji dengesinde bulunan süt ineklerinde yem tüketiminin azalmasına neden olmaktadır. Nişasta kaynaklarının artırılması ile birlikte nişasta sindirimini problemsiz bir şekilde sürdürecek rumen mikroorganizma çeşitliliğinin hızlı bir şekilde oluşturulamaması nedeniyle metabolik problemler gözlenebilmektedir (NRC 2001, Bannink ve ark 2012).

Rumen asidozisi, çoğunlukla akut (klinik) ya da subakut (subklinik) asidozis olarak sınıflandırılmaktadır.

1.1.1. Akut Rumen Asidozisi

Akut ve subakut rumen asidozisinin etiyolojileri benzer olmakla birlikte klinik olarak birbirlerinden belirgin olarak ayrılmaktadırlar. Akut rumen asidozisi, kolay fermente olan karbonhidratların aşırı miktarda tüketilmesiyle rumen pH'sının aniden ve hızla düşmesi ile ortaya çıkmaktadır. (Owens ve ark 1998). Akut rumen asidozisinde rumen pH'sı düştükçe laktik asit üretimi artmakta, laktik asit üretimi arttıkça pH'daki düşme hızlanmaktadır. Laktik asidin kullanılması için optimum rumen pH'sı 5,9-6,2 arasında değişmekte, pH düştükçe laktik asit kullanımı azalacağı için laktik asit rumende birikmektedir (Dijkstra ve ark 2012).

Rumenden emilen organik asitler bikarbonat ile tamponlanarak, böbrekler yoluyla atılarak, organ ve dokular tarafından metabolize edilerek asit-baz dengesi düzenlenmeye çalışılır. Organik asitler bu şekilde kompanze edilemediği zaman metabolik asidoz şekillenmekte, ölümcül olabilecek sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Klinik olarak; iştahsızlık, abdominal ağrı, taşikardi, solunumun artması, ishal, uyuşukluk, sendeleme, yere yatma ve ölüm gözlenmektedir (Radostits ve ark 1994, Owens ve ark 1998).

1.1.2. Subakut Rumen Asidozisi (SARA)

Subakut rumen asidozisi, rumende toplam UYA konsantrasyonunun artması, asetik, propiyonik ve bütirik asit arasındaki oranın propiyonik ve bütirik asit lehine değişmesi, rumen pH'sının 5,2-5,8 aralığında dalgalı bir seyir göstermesi ve rumen sıvısında laktik asit konsantrasyonunun 5-10 mmol/L'yi aşmayacak şekilde

yükselmesiyle karakterize bir durumdur (Keunen ve ark 2002, Morgante ve ark 2007).

Süt ineklerinde laktasyonun başlangıç döneminin (doğumdan sonraki ilk 3 hafta) ve kuru madde tüketiminin pike ulaştığı doğum sonrası 10-14 haftalar arasındaki dönemin subklinik ya da subakut asidozis açısından en riskli dönemler olduğu belirtilmiştir (Nordlund ve ark 1995). ABD'de yapılan saha çalışmalarında, SARA'nın laktasyon başındaki hayvanların %11-19'unda, laktasyon ortasındaki hayvanların ise %20-26'sında oluştuğu belirlenmiştir (Garret ve ark 1997, Oetzel ve ark 1999). SARA'nın sürü ya da bireysel düzeyde yaygınlığının araştırıldığı çalışmalarda, 10 adet sürünün 3'ünde hayvanların %33'den fazlasında rumen pH'sının 5,5 ve altında bulunduğu (Morgante ve ark 2007) ve 10 adet sürüdeki hayvanların %27,6'sında (Tajik ve ark 2009) SARA görüldüğü belirlenmiştir.

ABD'de verim kayıpları ve ölümler göz önüne alındığında, SARA'nın hayvan başına günlük 1,12 $ kayıpla birlikte yıllık 500 milyon ile 1 milyar $'lık bir kayba neden olduğu bildirilmektedir (Donovan 1997, Enemark 2009). SARA nedeniyle süt verimi, süt yağı ve protein verimi açısından inek başına yıllık 400-450 $ ekonomik kayıp meydana geldiği, SARA'nın laminitis ve üreme problemleri gibi olası olumsuz etkileri de düşünüldüğünde kaybın çok ciddi boyutlara ulaşacağı bildirilmiştir (Stone 1999).

Kuru dönemde rasyonun kaba yem içeriğinin artması dolayısıyla nötral deterjanda çözünmeyen lif (NDF) içeriğinin yükselip, enerji içeriğinin düşmesi bakteri populasyonu içinde laktik asit üreten bakterilerin (*Streptococcus bovis ve Lactobacillus acidophilus*) ve laktik asidi asetik asit, propiyonik asit ve uzun zincirli yağ asitlerine dönüştüren bakterilerin (*Megasphaera elsdenii* ve *Selenomonas ruminantium*) sayısını azaltmaktadır (Plaizier ve ark 2009, Tajik ve ark 2009). Düşük enerjili rasyonlar rumen papillalarının uzunluğunu ve UYA'nın emilim kapasitesini azaltmakta, kuru dönemin ilk 7 haftasında emilim alanının yaklaşık %50'si kaybolmaktadır (Plaizier ve ark 2009). Rumen duvarı yüksek mikrobiyel aktivite ve UYA geçişi nedeniyle önemli oranda metabolik aktivite gösteren bir doku özelliği taşımaktadır. Rumen duvarından organik asitlerin emilme kabiliyeti rumen pH'sının stabilitesinin korunmasına katkıda bulunur (Bannink ve ark 2012).

Doğum öncesi geçiş döneminde yaşama payı, gebelik ve meme gelişimi için ihtiyaç duyulan enerji rasyonların 1,54-1,62 Mcal NEL/kg KM içerecek şekilde düzenlenmesi ile sağlanmaktadır. Doğumla birlikte süt veriminin başlaması ve giderek artış göstermesi KM ihtiyacını karşılayamayan yüksek verimli hayvanlarda enerji ihtiyacında açığa sebep olmaktadır. Bu açığı kapatmak için rasyonda kaba yem düzeyinin azaltılıp konsantre yem düzeyinin artırılması gerekmektedir (NRC 2001, Bannink ve ark 2012). Adaptasyon periyodu uygulamadan yüksek düzeyde kaba yemle beslemeden yüksek düzeyde konsantre yemle beslemeye ani geçişlerde rumen florası bozulmakta, nişasta sindirimini gerçekleştirecek rumen mikroorganizma çeşitliliğinin hızla oluşturulamaması nedeniyle özellikle rumen asidozisi olmak üzere çeşitli metabolik problemler gözlenebilmektedir. Tamamen kaba yemden oluşan bir rasyondan %60 oranında tane yem bulunan bir rasyona ani geçiş ile birlikte ruminantlarda sindirimin yaklaşık %70'ini gerçekleştiren (Jouany 2006) rumen bakterilerinin sayı ve aktivitelerinin yaklaşık 21 gün boyunca normal hale gelemediği belirlenmiştir (Grubb ve Dehority 1975). Laktasyonla birlikte nişasta bakımından zengin rasyonların kullanılmasıyla laktik asit üreten *Streptococcus bovis* hızla gelişmeye ve laktik asit üretmeye başlar. Asidik ortamı tolere edebilen *S. bovis* ve diğer laktik asit üreten bakteriler ortamın asiditesi arttıkça hızla üremeye ve laktik asit üretmeye devam ederler. Laktik asit üretiminin artmasıyla *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* ve *Veillonella parvula* gibi laktik asidi kullanan bakteriler de üremeye ve laktik asidi kullanarak UYA'ya dönüştürmeye başlarlar. Rumendeki uçucu yağ asitlerinin pKa sı yaklaşık 4,9 olduğu için pH'nın 5,5 olması durumunda rumen epitelinden UYA emilimi sağlanmış olur. Rumen pH'sının 5,5'in altına düşmesi halinde UYA emilimi artarken laktik asit üretiminin de artması rumen pH'sının düşmesine neden olur. Rumen pH'sının 5'e düşmesi laktik asidi kullanan bakterilerin gelişmesini baskılamakta, üretilen laktik asit kullanılan miktarın üzerine çıkmaktadır. Laktik asit kullanan bakterilerin laktik asidi kullanma hızları *S. bovis*'in üreme hızından yavaş olduğu için laktik asit rumende birikmekte ve pH'daki düşme hızlanmaktadır (Krause ve Oetzel 2006). Bu durumda *S. bovis*'in gelişmesi durmakta, düşük pH'ya direnç gösteren *Lactobacilluslar* gelişmeye başlamakta ve laktik asit üretme kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle laktik asidozis riski artmaktadır. Rumende asitliğin artması sonucu selülolitik bakteri sayısı azalırken, Gram (-) bakteri sayısında artma olmakla birlikte Gram (+) bakteriler baskın hale gelmektedir. Rumen pH'sının düşmesiyle birlikte *M. elsdenii* ve *S. ruminantium* gibi

laktik asit kullanan bakterilerin sayıları hızla azalmaya başlamaktadır (Russell ve Hino 1985). *M. elsdenii* rumendeki laktik asidin %97'sini fermente ettiği için laktik asidi kullanan türler içerisinde en baskın ve laktik asit metabolizmasında anahtar rolü oynayan bakterilerden biridir (Piknova ve ark 2004).

Rumendeki laktik asit ve UYA üretiminin düzenlenmesinde önemli rolleri olan ciliatalar pH 5,0'in altına düştüğünde yaşayamazlar (Plaizier ve ark 2009). Entodiniomorph gibi bazı protozoa türleri rumen pH'sının korunmasında önemli role sahiptir (Dehority 2005). Bu protozoonlar nişastayı içlerinde depo ederek laktik asit üreten bakterilerin nişastayı hızla kullanmalarını önlerler. Protozoonlar nişasta, çözünebilir şekerler ve bakterilerle beslendikleri için rumendeki fermentasyon hızını azaltırlar. Rumendeki laktik asit ve UYA üretiminin düzenlenmesinde önemli rolleri olan ciliatalar pH 7,8'in üzerine çıktığında veya 5,0'in altına düştüğünde yaşayamazlar (Nagaraja ve ark 1992). Goad ve ark (1998) yüksek düzeyde tane yem ya da yüksek düzeyde kaba yeme adapte edilmiş hayvanlarda SARA başlatıldığında protozoa sayısındaki azalmanın kaba yeme adapte edilenlerde daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Yüksek oranda tane yem beslemesi sonucunda protozoonların tutunmaları ve üremeleri için gerekli olan fibröz tabakanın azalması nedeniyle protozoa sayısının azaldığı bildirilmiştir (Owens ve ark 1998). Yapılan son çalışmalarda yüksek oranda tane yemle besleme sonucu rumen pH'sının düşmesinin protozoa çeşitliliğini azalttığı, fakat *Entodinium* türleri gibi bazı protozoa türlerinin sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Brossard ve ark 2004). Hook ve ark (2011) yüksek düzeyde konsantre yem içeren rasyonla beslemenin rumendeki metanojenik bakteri yoğunluğuna etkisinin olmadığını, başlangıçta protozoa sayısını arttırırken sonra önemli ölçüde azalttığını belirtmektedirler.

Abomasal hücreler gibi mukus tarafından korunamadığı için rumen epitel hücreleri asitlerin neden olduğu kimyasal hasara oldukça duyarlıdır. Düşük rumen pH'sı rumenitise, epitel hücrelerin erozyonuna, ülserleşmesine ve sonuçta parakeratozise neden olmaktadır. Rumenitise bağlı olarak rumen epitelinin hasar görmesi sonucunda karaciğer apseleri şekillenmekte hatta bakterilerin akciğerlerde, kalpte, böbreklerde ve eklemlerde kolonize olmasıyla pnömoni, endokarditis, piyelonefritis ve artritis gibi çok ciddi problemler de ortaya çıkmaktadır (Nordlund ve ark 1995). Laktik asit birikimi ve rumen florasının ölmesi nedeniyle salınan

endotoksinler ile histamin sistemik olarak emilerek tırnak duvarının mikrovaskularitesini etkilemekte, sonuçta klinik laminitise neden olmaktadır. Eğer emilen organik asitlerin miktarı karaciğer ve diğer dokuların metabolize etme yeteneğini aşarsa metabolik asidozis de şekillenmektedir (Kleen ve ark 2009).

1.2. SUBAKUT RUMEN ASİDOZİSİNİN TEŞHİSİ

Genellikle sürü problemi halinde ortaya çıkan subakut rumen asidozisinde klinik belirtiler sürü bazında değerlendirilmeli ancak hayvanlarda bireysel farklılıkların olabileceği de göz önüne alınmalıdır (Britton ve Stock 1989).

1.2.1. Rumen pH'sındaki Değişimler

SARA'da klinik belirtiler çok belirleyici olmadığı için teşhis zor olmaktadır. Rumen pH'sının takibi SARA'nın teşhisinde bir kriter olarak kullanılmakla birlikte tek başına teşhis açısından yeterli olmamaktadır (Enemark ve ark 2002, González ve ark 2011).

Rumen pH'sının ölçülmesi amacıyla ağız sondası, rumenosentez ya da rumen kanülü yoluyla rumen sıvısı alınabilmektedir. Rumen sıvısının sonda ile alınması en sık kullanılan yöntemlerdendir. Bazı araştırıcılar tarafından rumenosentezin rumen sıvısının alınmasında en iyi yol olduğu bildirilmektedir (Garrett ve ark 1999, Duffield ve ark 2004). Sonda ile alınan rumen sıvısında tükrükle bulaşma riski olduğu için rumenosentez yoluyla ölçülen pH'ların daha güvenilir sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Nocek 1997). Ruminosentez ya da sonda sadece anlık numune almak için kullanılabilmekte, rumen pH'sının gün içerisindeki dalgalanmaları hakkında bilgi vermemektedir. (Plaizier ve ark 1999). Bu nedenle deneysel amaçlı olarak hayvanların rumenlerine kanül açılarak sürekli ölçüm yapabilen pH elektrotları yerleştirilmektedir. Bu şekilde rumen pH'sının sürekli kaydedilmesiyle pH da gün içerisinde meydana gelen dalgalanmalar tespit edilebilmektedir.

Rumen pH'sı fermente olabilen karbonhidratların tüketim miktarına, rumende fermentasyon sonucu oluşan asitlerin mikroorganizmalar tarafından kullanım oranına, rumende üretilen fermentasyon ürünlerininin rumen duvarından emilim düzeyine ve tükrük ile gelen tampon etkili maddelerin salgılanma miktarına bağlı olarak değişmekte ve gün içerisinde dalgalanmalar göstermektedir (Keunen ve ark

2002). Yemleme öncesi yaklaşık 6,6 olan rumen pH'sı rumendeki fermentasyonun ilerlemesiyle birlikte 5,0-5,3'e kadar düşebilmekte, ortalama 6,0-6,2 arasında bir değer göstermektedir (Zebeli ve ark 2010). Gün içerisinde yem tüketimi ile rumen pH'sında gözlenen 0,5-1,0 birimlik değişimler normal karşılanmaktadır (Dado ve Allen 1993, Nocek ve ark 2002). SARA ile ilgili olarak en düşük rumen pH'sının belirlenmesi için, kaba ve konsantre yemin birlikte yedirildiği durumlarda yemlemeden 5-8 saat, konsantre yemin ayrı olarak verildiği durumlarda ise 2-5 saat sonra rumen sıvısı alınması tavsiye edilmektedir (Nordlund ve Garrett 1994, Nocek 1997). SARA'da laktik asit kullanan bakteriler sayesinde laktik asit uçucu yağ asitlerine dönüştürüldüğü için rumen sıvısında laktik asit birikmemektedir (Nagaraja ve Chengappa 1998). Ancak gün içerisinde sürekli ölçüm yapıldığında laktik asidin geçici bir süre 20 mM'e yükseldiği belirlenmiştir (Kennelly ve ark 1999). Laktik asit birikimi olmadığı için rumen pH'sındaki düşme, uçucu yağ asitlerinin birikimi nedeniyle gerçekleşmektedir (Oetzel ve ark 1999).

Rumen pH'sının 5,0 ve 5,5 (Owens ve ark 1998, Enemark ve ark 2002, Kleen ve ark 2003, Krause ve Oetzel 2006, Penner ve ark 2007, Enemark 2009) 5,0 ve 5,6 (Nagaraja ve Titgemeyer 2007) 5,0 ve 5,8 arasında (Beauchemin ve Yang 2005) olmasının veya pH'nın 5,8'in altına düşmesinin (Nordlund ve Garrett 1994) ya da pH'nın ortalama 5,5 seviyesinde (Garrett ve ark 1999, Kleen ve ark 2003, Enemark ve ark 2004) olmasının SARA için belirgin bir özellik olduğuna dair literatürlerde farklı yorumlar bulunmaktadır. Rumen sıvısı alınan 12 ineğin 3 tanesinden fazlasında rumen pH'sının 5,5'in altında olmasının (Garrett ve ark 1999, Oetzel 2003) ya da numune alınan 10 veya daha fazla sayıdaki inekten %30'unun rumen pH'sının 5,5'in altında olmasının (Nordlund ve ark 1995) SARA göstergesi olduğu bildirilmektedir. Aynı şekilde subakut asidozis için rumen pH sınırının 5,2-5,6 olduğu, pH'nın 5,2'nin altında uzun süre kalması durumunda ise akut asidozis oluşacağıda (Owens ve ark 1998, Krause ve Oetzel 2006, Nagaraja ve Titgemeyer 2007) ifade edilmektedir.

1.2.2. Süt Kompozisyonundaki Değişimler

Rasyonda kaba yem oranının azalıp konsantre yem oranının artmasıyla birlikte sütün yağ içeriğinin baskılandığı bilinmektedir (Griinari ve ark 1998). Süt verimi ile sütün protein ve laktoz içeriği değişmeden sütün yağ içeriğindeki azalmanın %50'ye ulaşması durumu "düşük süt yağı sendromu" olarak

adlandırılmaktadır. Rasyon bileşimi kaba yemden konsantre yeme doğru değiştiği zaman rumen pH'sı ile rumen sıvısındaki asetik asit ve bütirik asit düzeyi azalırken propiyonik asit düzeyi artmaktadır. Bu şekilde asetik asit/propiyonik asit oranının azalması neticesinde süt yağı baskılanmaktadır (Davis 1967, Griinari ve ark 1998, Kennelly ve ark 1999). Süt yağındaki bu azalmanın asetik asitteki azalmadan ziyade propiyonik asitteki artıştan kaynaklandığı belirlenmiştir (Gozho ve ark 2006, Khafipoor ve ark 2007). Ayrıca düşük düzeyde selüloz içeren rasyonların kullanılması rumen pH'sının düşmesine, yağ asitlerinin biyohidrojenasyonunun tamamlanamamasına ve trans-octadecenoic asitin artmasına neden olarak süt yağını baskılamaktadır (Griinari ve ark 1998). Düşük rumen pH'sının, süt yağındaki C18:2 cis-9, trans-11, iso C16:0 ve iso C13:0 yağ asitlerine yansıdığı bildirilmektedir. Bu spesifik yağ asitlerinin asidozis riski taşıyan hayvanların teşhisinde potansiyel bir değer taşıdığı tespit edilmiştir (Colman ve ark 2010).

1.2.3. Yem Tüketiminin Baskılanması

Yem tüketiminin azalması ve yem tüketiminde günler arasında gözlenen değişimler SARA teşhisi için klinik bir belirti olarak kullanılabilmektedir (Stock ve ark 1995, Bevans ve ark 2005). Tane yemle SARA oluşturulan süt ineklerinde kuru madde tüketiminin azaldığı (Garrett ve ark 1999, Gozho ve ark 2006), pelet yonca ile oluşturulan SARA durumunda ise kuru madde tüketiminin etkilenmediği (Khafipoor ve ark 2007) belirlenmiştir.

Kuru madde tüketimindeki azalmanın, rumen pH'sının düşmesi, propiyonik asit düzeyinin ve ozmolaritenin artması, rumen motilitesinin (Fulton ve ark 1979, Carter ve Grovum 1990) ve selüloz sindiriminin azalması (Plaizier ve ark 2009) ile yangısal reaksiyonlara bağlı olarak ortaya çıktığına dair farklı görüşler bulunmaktadır (González ve ark 2011).

Gün içerisinde yemin evreler halinde tüketilmesi SARA'nın en belirgin işaretidir. Hayvanın yemi yemesiyle birlikte rumen pH'sının belirgin şekilde düşmesi ve rumen ozmolaritesinin artması diğer öğünde yemi reddetmesine dolayısıyla evreler halinde seyreden bir yem tüketim tablosuna neden olmaktadır. Yem tüketiminin inişli çıkışlı bir seyir alması vücut kondüsyonunu düşürmektedir.

Rumenin normal şartlarına kavuşmasıyla iştah çoğunlukla tekrar kazanılmaktadır (Fulton ve ark 1979).

1.2.4. Dışkı Görünümündeki Değişimler

Besleme hatalarına bağlı olarak meydana gelen bozukluklar neticesinde dışkı görünümünde oluşabilecek değişikliklerin takip edilmesi teşhis açısından yararlı olmaktadır. SARA'da dışkı katıdan ishale değişiklik gösterirken sindirim sisteminin alt kısmındaki fermentasyon dışkının asiditesinin artmasına ve köpüklü bir görünüme yol açmaktadır (Hall 1999, 2002). Düşük selüloz içeren rasyonların kullanılması dışkının yumuşak, daha parlak ve sarımsı olarak gözlenmesine neden olmaktadır (Kleen ve ark 2003). Dışkıda sindirilmemiş yem partikülleri ile birlikte aralıklı olarak ishalin gözlenmesi yemlerin sindirim kanalından hızla geçmesi nedeniyle sindirimin yetersiz olduğunu göstermektedir (Nordlund ve ark 1995, Enemark ve ark 2002).

1.2.5. Laminitis

Besleme kaynaklı laminitis özellikle akut ve subakut rumen asidozisi neticesinde ortaya çıkmaktadır (Nocek 1997). Rumen pH'sının düşmesi sonucu salınan lipopolisakkarit endotoksinleri ve histamin gibi vazoaktif maddeler asitliğin artması sonucu rumen epitelinin zarar görmesiyle rumen duvarından kolayca geçip sistemik olarak kana karışmaktadır. Bu durum tırnaktaki kapillar damarların zarar görmesine, sonuçta klinik laminitise neden olmaktadır. Eğer emilen organik asitlerin miktarı karaciğer ve diğer dokuların metabolize etme yeteneğini aşarsa metabolik asidozis de şekillenmektedir (Vermunt 1992, Nocek 1997, Kleen ve ark 2009). Bir sürüde yıllık laminitis insidensi %10'dan fazla ise sürüde SARA problemi olduğundan şüphe edilmelidir (Nordlund ve ark 1995).

1.3. KORUNMA ÖNLEMLERİ

Rumenin optimal şartlarının ve mikrobiyel fermentasyonun devamlılığı oluşan asitlerin rumenden uzaklaştırılması veya nötralizasyonu ile mümkün olabilmektedir. Subakut asidozun sebepleri göz önüne alındığında, rasyonun ve yemleme düzeninin, rumen pH'sının ve fermentasyonun kontrol altında tutulması yönünde alınacak önlemlerle SARA ve buna bağlı oluşabilecek bozuklukların önüne geçilebilecektir.

1.3.1. Rasyon ve Yemleme Düzeninin Kontrolü

Uygun rasyon ile rumen adaptasyonunun sağlanması

Rumen adaptasyonu, yüksek enerjili rasyonlara mikrobiyal populasyonun alıştırılması ve rumen papillalarının uzunluğunun artırılarak emilim alanının genişletilmesi ile sağlanmaktadır (Dirksen ve ark 1985). Kuru dönemde kullanılan kaba yem ağırlıklı rasyondan konsantre yem ağırlıklı laktasyon rasyonununa geçişte yem değişikliğinin kademeli olarak yapılması rumen ortamının hazırlanması için önemlidir. Süt ineklerinde doğumdan sonra hızlı bir şekilde yüksek enerji tüketimi ile birlikte kuru madde tüketiminin de artırılması gerekmektedir. Bu nedenle laktasyon rasyonlarında kullanılacak olan bütün yem maddelerine kuru dönem rasyonlarında yer verilmesi faydalı olmaktadır. Besi hayvanlarında ise besi bitiş dönemine geçiş yaparken yüksek konsantre yeme alıştırma uygulaması yapılması tavsiye edilmektedir. Alıştırma dönemi laktik asidi kullanan bakteriler ile nişastayı kullanan diğer bakterilerin rumende gelişerek yeterli sayıya ulaşabilmeleri için gerekli zamanı sağlamaktadır. Bu nedenle süt ineklerinde geçiş döneminde tane yem düzeyindeki artışların 5-7 günde bir yapılmasının önemli olduğu bildirilmektedir (Nocek ve ark 2002, Bevans ve ark 2005). Rumen mukozasının konsantre yem ağırlıklı yeme adaptasyonu yaklaşık 4-6 haftayı bulmaktadır (Nordlund ve ark 1995, Nocek 1997). Bakteriyel adaptasyon konsantre yeme geçildikten 3 hafta sonra gerçekleşmekte 6. haftada ise tamamen farklı bir mikrobiyel populasyon oluşmaktadır (Dirksen ve ark 1985, Nordlund ve ark 1995).

Yüksek düzeyde buğday içeren rasyonlarla rumen mikroorganizmalarının adaptasyonu gerçekleşse dahi yeterli yem tüketimine hızlı bir şekilde ulaşılamaması sadece mikrobiyel adaptasyon değil aynı zamanda metabolik bir adaptasyonun da

gerçekleşmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Duffield ve ark 2004). Bu nedenle laktasyon döneminde rasyonda buğday ve arpa kullanılacaksa kuru dönemde mutlaka bir alıştırma periyodu uygulanmış olması gerekmektedir.

Uygun kaba yem oranı ve partikül büyüklüğü ile yeterli ruminal tamponlamanın sağlanması

İçerdiği bikarbonat (125 mEq/ml) ve fosfat (20 mEq/ml) ile yüksek tamponlama kapasitesine sahip olan tükrük rumen fonksiyonlarının devamlılığı için oldukça önemlidir. Yem yeme ve ruminasyon sırasında dakikada 200-250 ml'ye ulaşan tükrük salgısı süt ineklerinde gün içerisinde üretilen asitlerin %30'unu nötralize edebilmektedir (González ve ark 2011). Üretilen asitlerin yaklaşık %50'si de rumen epitelinden emilerek elimine edilmektedir. Geriye kalan %15-20'lik kısmı ise retikulo-rumenden geçerek büyük kısmı fosfatlar tarafından olmak üzere üretilen protonlarla nötralize edilmektedir (Allen 1997).

Yemin partikül büyüklüğünün artması tükrük salgısı üzerine olumlu etki yapmaktadır (Krause ve Oetzel 2006). Bu nedenle süt ineklerinde ruminasyonu, tükrük üretimini ve rumenin tamponlanmasını sağlamak için rasyonda yeterli miktarda fiziksel olarak etkin NDF (peNDF) bulunmalıdır. Bu amaçla toplam rasyonun en az %40'ının 8 mm'den daha uzun formda olması tavsiye edilmektedir (Plaizier ve ark 2009). Rasyondaki uzun partiküllü yemlerin oranı %7'den az ve selüloz içeriği de düşük ise sığırlarda SARA oluşma riski artmaktadır (Woodford ve Murphy 1988, Grant ve ark 1990). Kaba yemlerin çok ince formda olması rumenin katı tabakasını olumsuz etkilemekte, çiğneme aktivitesinin ve rumen kontraksiyonlarının azalmasına, rumen pH'sının düşmesine, selüloz sindiriminin ve yem tüketiminin baskılanmasına neden olmaktadır (Tafaj ve ark 2007).

Kaba yemlerin partikül büyüklüğünün uygun şekilde azaltılması, fibrolitik bakterilerin yapışacağı yüzey alanını artırdığı için sindirimi iyileştirmekte, yem tüketimini artırarak yüksek verimli hayvanların ihtiyaçlarının karşılanmasına katkı sağlamaktadır (Yang ve Beauchemin 2006). Rasyon NDF içeriğinin en az %25 ve bunun da en düşük %19'unun kaba yem kaynaklı NDF olmasının normal rumen ortamının sağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (NRC 2001).

Rumenin rasyon kaynaklı tamponlanması, yemin partikül büyüklüğü ve kaba yem oranının yanısıra yemin tabiatında varolan katyon ve anyonlara da bağlıdır. Sodyum ve potasyum gibi katyon içeriği yüksek rasyonlar rumen pH'sını yükseltme ve KM tüketimi ile süt verimini artırma eğilimindedirler (Sanchez ve ark 1994, Block ve Sanchez 2000). Laktasyonun başında rasyonun katyon-anyon farkı yaklaşık +400 mEq/kg, laktasyonun ortasında ise yaklaşık +275 ile +400 mEq/kg arasında olmalıdır (Block ve Sanchez 2000).

Öğün sayısının artırılması ile rumen asit-baz dengesinin ayarlanması

Bir öğünde tüketilen yem miktarı ve çiğneme zamanı ile yemleme sıklığı ve tüketilen yemin gün içerisindeki dağılımı rumenin asit-baz dengesi üzerinde etkili olmaktadır. Öğün sayısının artması ve tüketimin gün içerisinde dağılması, asit üretimi ile tükrük üretimi ve rumenden organik asitlerin emilimi veya geçişi arasındaki zamanın daha iyi senkronize edilmesini sağlamaktadır. Yem tüketiminin gün içerisinde periyotlar halinde gerçekleşmesi halinde asitlerin metabolize olması ve rumenden emilen protonların idrarda elimine edilmesi için yeterli zaman elde edilmektedir (González ve ark 2011).

1.3.2. Rumen pH'sının Kontrolü

Tampon etkili maddeler; pH'yı ya da pH'daki değişikliklere karşı rumen sıvısının tampon kapasitesini artırarak etki ederler. Tampon etkili maddelerin su tüketimini, rumen sıvısının dilüsyon oranını, kolay eriyebilir karbonhidratların rumenden geçiş hızını artırarak ve rumende propiyonik asit sentezini azaltarak süt yağ sentezini arttırdığı bildirilmektedir (Russell ve Chow 1992). Bu etki özellikle konsantre yem oranı yüksek kaba yem oranı yetersiz rasyonların tüketilmesi sonucu rumen pH'sının düştüğü ve selüloz sindirilebilirliğinin azaldığı durumlarda gözlenmektedir (Rogers ve ark 1982, Ghorbani ve ark 1989). Yüksek düzeyde konsantre yem içeren rasyonlara ilave edilen tampon maddelere alınan cevap, kullanılan tampon madde, kaba ve tane yem çeşitleri ile miktarlarına göre değişmektedir. Rasyonlara tampon madde ilavesinin yüksek düzeyde konsantre yeme adaptasyonun başlangıcında yapılmasının uygun olduğu, daha uzun süre kullanılması durumunda alınan cevabın azalmasının tampon maddeye doygunluktan kaynaklandığı bildirilmektedir (Russell ve ark 1980, Ha ve ark 1983).

Yüksek düzeyde konsantre yem ihtiva eden rasyonlara ilave edilen tampon etkili maddeler rumen pH'sını normal sınırlar içinde korumalarının yanısıra tampon kapasitesini de artırırlar ve rumen mikroorganizmalarının gelişmesi için daha uygun bir ortam yaratırlar. Sodyum bikarbonat, süt yağındaki azalmayı önlemek ve rumenin tampon kapasitesini artırmak için ruminant rasyonlarında yıllardan beri kullanılmaktadır. Magnezyum oksit gibi alkalizerler de tane yemin yüksek düzeyde kullanıldığı durumlarda süt yağındaki düşmeyi önlemede etkili olmaktadır. Yapılan çalışma sonuçları tampon etkili maddeler ile alkalizerlerin tek başlarına asidozisi önlemede etkili olmalarının mümkün olmadığını göstermektedir. (Umucalılar ve ark 2001).

1.3.3. Rumen Fermentasyonunun Kontrolü

Rumende üretilen laktik asit ile kullanılan laktik asit arasında dengenin kurulabilmesi rumen ortamının stabil halde tutulması açısından önemlidir. Asidozisin gelişmesi sırasında laktik asit birikiminin önlenmesi amacıyla farklı mikrobiyel populasyonların aktivitesinin kontrol altına alınması gerekmektedir.

Monensin ve lasalosid gibi iyonofor antibiyotiklerin asetik asit ve metan üretimini azaltıp propiyonik asit üretimi üzerine olumlu etki yaptıkları, laktik asit üretimini azaltıp, nitrojen metabolizmasını iyileştirdikleri bilinmektedir (Jouany 2006, Kim ve Carlson 2006, Calsamiglia 2012). Ancak bu antibiyotiklerin insan tüketimine sunulan gıdalarda rezidü bırakma ihtimali ve antibiyotiğe dayanıklı patojenlerin ortaya çıkması nedeniyle Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır.

Streptococcus bovis ve *Lactobacillus* bakterilerine karşı aşılama sonucu immunglobulinlerin tükrük yoluyla rumene geçebileceği ve bakterileri nötralize ederek laktik asidin fazla miktarda üretilmesini önleyebileceği bildirilmektedir (Gill ve ark 2000).

Aspartik asit, fumarik asit ve malik asit gibi dikarboksilik asitler ile bunların tuzlarının *Selenomonas ruminantium* tarafından laktik asidin kullanımını stimüle ettikleri bildirilmektedir (Martin 1998). Bu asitlerin rasyona ilavesinin ek bir maliyet getireceği ve asit formda kullanıldıkları için pH'nın düşmesine katkı sağlayacakları endişesi ile kullanılmaları çok uygun görülmemektedir (Martin ve ark 1999)

Rumende üretilen laktik asidin kullanımının artırılması amacıyla direkt yedirilen mikroorganizmalar (DFM) rasyona ilave edilebilmektedir (Jouany ve Morgavi 2007, McAllister ve ark 2011). Direkt yedirilen mikroorganizmalardan olan *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayaların özellikle yüksek düzeyde konsantre yem içeren rasyonlara ilave edilmesiyle selülolitik ve laktik asit kullanan bakterileri stimüle ettiği bildirilmektedir (Martin ve Nisbet 1992, Newbold ve ark 1996, Callaway ve Martin 1997, Beauchemin ve ark 2003, Chaucheyras-Durand ve ark 2008, Moya ve ark 2009). Laktik asit konsantrasyonundaki azalma selülolitik bakterilerin gelişmesini, selüloz sindirimini, uçucu yağ asitlerinin üretimini ve rumen pH'sını artırmaktadır (Carro ve ark 1992, Lila ve ark 2004, McAllister ve ark 2011). Mayaların bakteriler tarafından laktik asit kullanımını artırma mekanizmasının bünyelerinde organik asit, B vitaminleri ve aminoasitler gibi bazı besin maddelerini içermelerinden dolayı bakterilerin gelişmesini teşvik etmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Callaway ve Martin 1997, Chaucheyras-Durand ve ark 2008).

Lactobacillus ve *Enterococcus* gibi laktik asit üreten bakterilerin DFM olarak rasyona ilave edilmesiyle laktik asit ortamına rumen mikroorganizmalarının daha kolay adapte olacağı düşünülmekle birlikte (Ghorbani ve ark 2002), laktik asit kullanan bakterilerin olması halinde rumende laktik asidin azalacağı da bildirilmektedir (Kung ve Hession 1995).

1.4. LAKTİK ASİT KULLANAN BAKTERİLER

Rumende üretilen laktik asit mikrobiyel fermentasyona uğratılarak, rumenden emilerek ya da alt sindirim organlarına geçerek rumenden uzaklaştırılabilmektedir. Rumende üretilen laktik asit *Megasphaera elsdenii, Selenomonas ruminantium spp. lactilytica* ve *Veillonella parvula* gibi laktik asidi kullanan bakteriler tarafından fermente edilir (Meignanalakshmi ve Mahalinga 2007). Yüksek düzeyde tane yem içeren rasyonlara adapte olmuş hayvanların rumenindeki en önemli laktik asit kullanan bakteri *M. elsdenii*'dir. *Megasphaera elsdenii* rumendeki laktik asidin %97'sini fermente ettiği için laktik asidi kullanan türler içerisinde en baskını olduğu düşünülmektedir (Counotte ve ark 1981, Piknova ve ark 2004). *Megasphaera elsdenii* gibi laktik asit kullanan bakterilerin populasyonu artırılarak rumen asitliği ve pH'sı düzenlenebilmekte, böylece asidozis önlenebilmektedir (Robinson ve ark 1992, Kung ve Hession 1995, Wiryawan ve Broker 1995). İyonofor antibiyotiklerin

kullanımı ile karşılaştırıldığında rumende *M.elsdenii* populasyonunun artırılması daha doğal bir yol olarak görülmekte, et ve süt ürünlerinin tüketilmesinde tüketici sağlığı açısından daha kabul edilebilir bir durum sağlamaktadır (Hagg 2007).

Elsden ve Lewis (1953) tarafından ilk olarak koyunlardan izole edilen *M. elsdenii (Peptostreptococcus elsdenii*) anaerobik, hareketsiz, kok şekilli olarak tanımlanmıştır. Yaklaşık 2,4-2,6 μm çapında çiftler halinde ve 20 hücreye kadar zincir şeklinde gözlenirler (Elsden ve ark 1956). Gram (-) bir bakteri olan *M. elsdenii* glikoz, fruktoz ve laktik asitte gelişme gösterirler (Waldrip ve Martin 1993).

Fermentasyon ürünleri kullanılan substrata göre değişiklik gösterir. Laktik asit fermente edildiğinde bütirik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, valerik asit, CO_2 ve H_2 bazende az miktarda kaproik asit oluşur. Glikoz fermente edildiğinde ise kaproik ve formik asit bazende asetik, propiyonik, bütirik ve valerik asit oluşur (Counotte ve ark 1981, Marounek ve ark 1989, Hino ve Kuroda 1993). *Megasphaera elsdenii*'nin ortamda glikoz bulunduğu zaman bütirik asidi daha fazla ürettiği, laktik asit bulunduğu zaman ise propiyonik aside oranla bütirik asidi daha az ürettiği belirlenmiştir (Marounek ve ark 1989). DL-laktik asit ve glikozda üretilen *M. elsdenii*'den elde edilen hücre ekstratlarında D-laktat dehidrogenaz (D-LDH) aktivitesi tespit edilmiştir. Glikozda gelişen hücre ekstratlarının DL-laktik asitte gelişen hücre ekstratlarının yaklaşık yarısı kadar D-LDH içerdiği belirlenmiştir (Hino ve Kuroda 1993). Laktik asidi akrilat yoluyla propiyonik aside fermente eden rumendeki tek mikroorganizma olan *M. elsdenii* glikozdan propiyonik asit üretememektedir. *Selenomonas ruminantium, Succinimonas amylolytica*, ve *Propionibacterium acnes* gibi bakteriler glikozdan propiyonik asit üretebilirler (Counotte ve ark 1981). Bu durum laktik asit tarafından indüklenen *laktat racemase* enzimine glikoz fermente eden hücrelerin sahip olmamasından kaynaklanmaktadır (Hino ve Kuroda 1993, Hino ve ark 1994). *Megasphaera elsdenii* ortamdaki substratı kullanabilmek için laktik asit üreten bakterilerle rekabete girmektedir. Yapılan laboratuvar testlerinde *M. elsdenii*'nin 8 mM glikozu 6,8 mM asetik aside; 4,3 mM bütirik aside fermente ettiği; 40 mM laktik asidi de 13,5 mM asetik aside; 8,4 mM propiyonik aside ve 8,5 mM de bütirik aside dönüştürdüğü belirlenmiştir (Hino ve ark 1994). *Megasphaera elsdenii,* ATP üretmek için laktik asidi asetik ve bütirik aside metabolize eder. Laktik asidin oksidasyonu sırasında açığa çıkan hidrojen rumende metan üretimi için kullanılır. Ancak metan üretimi hayvanda enerji kaybına

ve çevre kirliliğine neden olduğu için rumende laktik asidin *M. elsdenii*'den başka mikroorganizmalar tarafından kullanılması daha çok arzu edilmektedir. *Selenomonas ruminantium spp. lactilytica* laktik asidi propiyonik ve süksinik aside metabolize ederken *M. elsdenii*'den daha düşük miktarda hidrojen üretimine neden olmaktadır (Asanuma ve Hino 2005). *Megasphaera elsdenii* diğer rumen mikroorganizmalarının kompleks polisakkaritleri hidrolize etmesi sonucu ortaya çıkan çözünebilen karbonhidratları ve laktik asidi de kullanır (Piknova ve ark 2004). *M. elsdenii* nişastadan faydalanamaz ancak maltoz ve glikozu kullanabilir. Bu nedenle substrat olarak bu enerji kaynaklarını bulabilmesi diğer bakterilerin amilolitik aktivitesine bağlıdır (Nagaraja ve Titgemeyer 2007). Nişasta ile besleme sonucunda *M. elsdenii*'nin sayısı da artmakta, bu durumda *M. elsdenii* hem nişastanın hidrolizinden ortaya çıkan maltozu hem de *S. bovis* tarafından üretilen L-laktik asidi kullanmaktadır (Nagaraja ve Titgemeyer 2007). Aynı zamanda aminoasit deaminasyonundaki temel bakterilerden biri olduğu da belirtilmektedir (Bladen ve ark 1961, Russell ve ark 1988, Rychlik ve ark 2002).

Megasphaera elsdenii yüksek düzeyde tane yem verilen hayvanlarda ve genç hayvanların rumeninde bulunan temel bakterilerden biridir (McDaniel ve ark 2009, Klieve ve ark 2012). *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ise, *M. elsdenii*'nin yüksek düzeyde konsantre yeme geçişlerde rumen fermentasyonunu düzenlediği ve laktik asit birikimini önlediği belirtilmektedir (Counotte ve ark 1981, Greening ve ark 1991, Kung ve Hession 1995, Henning ve ark 2010). Rasyona tane yemlerin girilmesinden sonra bakterinin 1 ml rumen sıvısında 5,5 $x10^{11}$ düzeyine ulaşabilmesi için 5-7 gün gerekmektedir (Klieve ve ark 2003).

Rumene *M. elsdenii'*nin inoküle edilmesi sonucunda rumen sıvısında laktik asit seviyesinin düştüğü, rumen pH'sının yükseldiği ve %24 daha fazla kuru madde tüketiminin gerçekleştiği bildirilmiştir (Robinson ve ark 1992). Rasyonda konsantre yem oranı %50'den %90'a çıkarıldığında ağız yoluyla verilen *M. elsdenii'*nin yem tüketimini iyileştirdiği ve laktik asidozisi önlediği bildirilmiştir (Hibbard ve ark 1993).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Megasphaera elsdenii* Kültürünün Canlandırılması ve Çoğaltılması

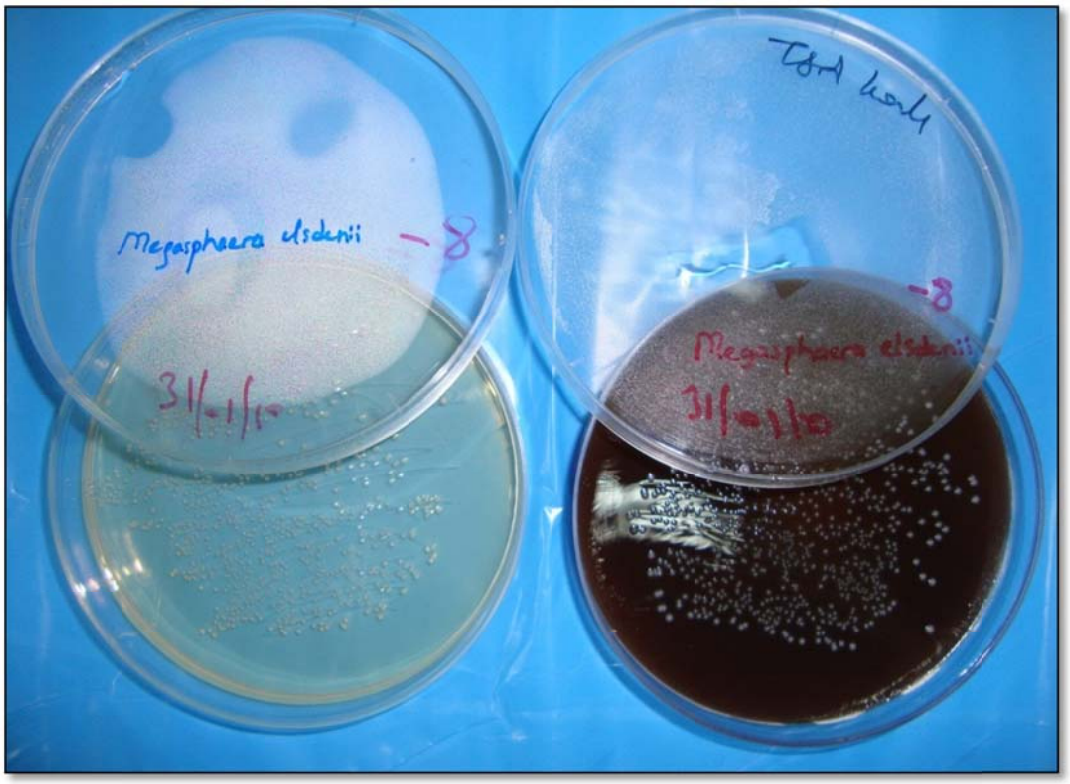
Araştırmada American Type Culture Collection (ATCC) firmasından getirtilen *Megasphaera elsdenii* (ATCC 17753) bakteri kültürü kullanıldı. Bakteri kültürü firmanın belirttiği şekilde canlandırılıp, daha sonra *in vivo* ve *in vitro* denemelerde kullanılmak üzere içerisinde boncuk bulunan saklama broth'unda (% 0,16 agar ve % 15 gliserin içeren brucella buyyon) -86 °C'de muhafaza edildi (Resim 2.1). Bakterinin üreme şartlarının belirlenmesi için, -86 °C'den bir stok kültür çıkartılıp TSB (Merck, Tryptic-Soy Broth, 30g/L)'de 39 °C'de hem anaerobik (Merck, Anaerocult® A) hemde mikroaerofilik kitlerle (Merck, Anaerocult® C) kapakları lastikli anaerobik jarlar içerisinde uygun ortam sağlanıp canlandırıldı. Canlandırılma sonrası en iyi mikroaerofilik (Merck, Anaerocult® C) ortamda ürediği belirlenerek araştırmaya bu kitlerle devam edildi.



Resim 2.1. Boncuklu saklama brothunda muhafaza edilen *M.elsdenii* kültürü

ATCC'den gelen bakterinin tür doğrulaması için TSB'de canlandırılan bakteriden TSA (Merck, Tryptic-Soy Agar, 40g/L)'ya ekimler yapılarak 39 °C'de kapakları lastikli anaerobik jarlar içerisinde (Resim 2.4), mikroaerofilik kitlerle uygun şartlar sağlanıp 24 saat inkübasyona bırakıldı. *M. elsdenii*'nin koloni

morfolojisini belirlemek için hem normal hem de kanlı TSA'ya ekimler yapıldı. (Resim 2.2).

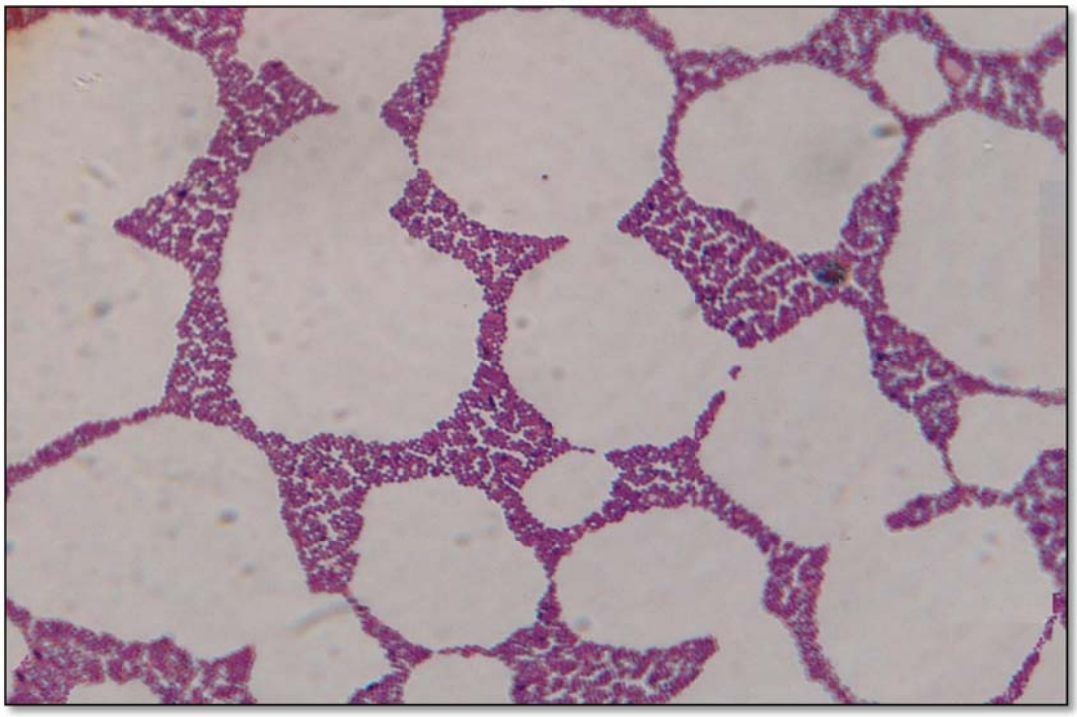


Resim 2.2. *M. elsdenii* kültürünün normal ve kanlı TSA'da gözlenen koloni formları.

İnkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden gram boyama yapılarak 2,4-2,6 µm boyutlarındaki gram negatif koklar gözlendi (Haikara ve Helander 2006) (Resim 2.3) ve takibin de biyokimyasal identifikasyon testlerine (glikoz, nişasta, früktoz, riboz, rafinoz, mannitol, pürivat, laktat, laktoz, rafinoz, mannoz, galaktoz, ksiloz, sukroz, sellobiyoz, trehaloz, arabinoz) tabi tutuldu (Marounek ve ark 1989) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. *M. elsdenii*'ye uygulanan biyokimyasal identifikasyon testi sonuçları

Arabinoz	**Selüloz**	**Fruktoz**	**Galaktoz**	**Glukoz**	**Riboz**	**Sukroz**
Negatif	Zayıf değişken	Pozitif	Zayıf değişken	Pozitif	Negatif	Pozitif
Laktoz	**Mannitol**	**Mannoz**	**Nişasta**	**Ramnoz**	**Trehaloz**	**Ksiloz**
Negatif	Zayıf değişken	Zayıf değişken	Negatif	Negatif	Zayıf değişken	Zayıf değişken



Resim 2.3. Gram boyama sonrası saf *M. elsdenii* kültürünün ışık mikroskoptaki kendine özgü Bal Peteği görüntüsü.



Resim 2.4. *M. elsdenii*'nin üretilmesi için kullanılan kapakları lastikli anaerobik jarlar

İn vivo denemede kullanılmak üzere aktif hale getirilen *M. elsdenii* kültürü pyrex şişelerde 100 ml TSB içerisinde 39°C'de mikroaerofilik olarak 48 saat inkübe

edildi (Resim 2.4). İnkübasyon sonrası mililitresinde 10^{10} düzeyinde canlı bakteri içerecek şekilde çoğaltıldı. İnkübasyon öncesi ve inkübasyondan 48 saat sonraki TSB'nin görüntüsü Resim 2.5'de verilmiştir.



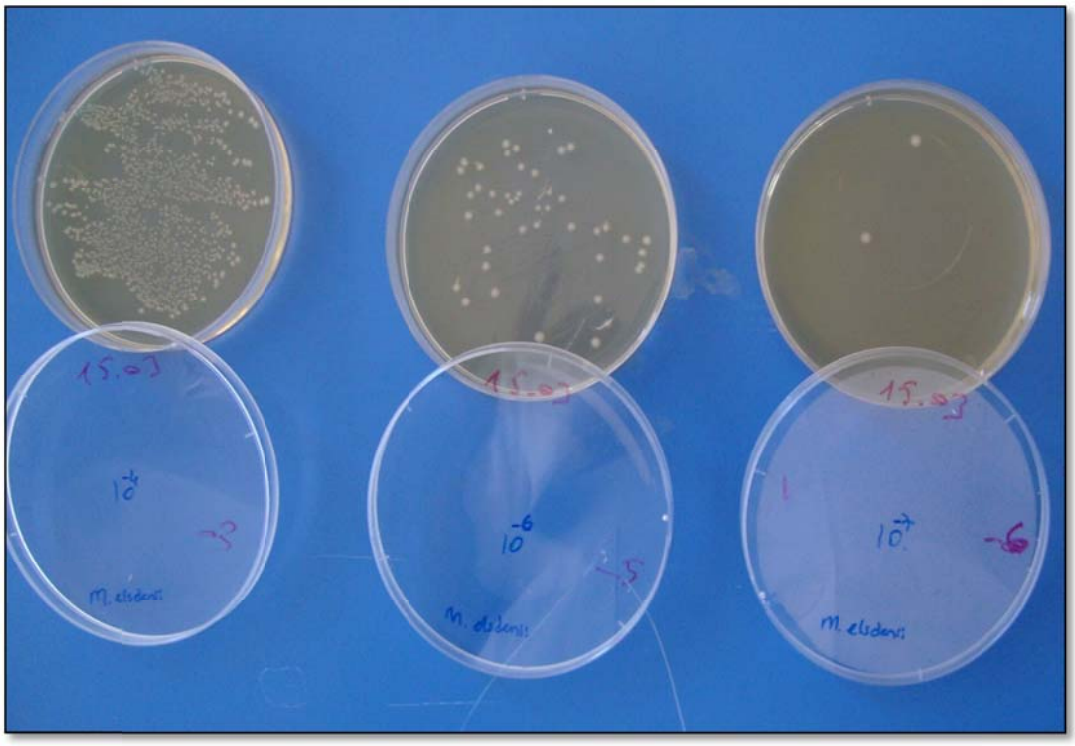
Resim 2.5. *M. elsdenii* inokulasyonu öncesi ve inokulasyondan 48 saat sonraki TSB'nin görüntüsü

İnkübasyon sonrası pyrex şişelerden homojen bir şekilde 1 ml sıvı alınıp ¼ gücündeki Ringer solusyonu (Oxoid, BR0052) içeren 9'ar ml'lik tüplerde ardışık sulandırmaları yapıldı. İlk sulandırmanın McFarland bakteri sayıcısında (Type DEN 1B, BIOSAN, Latvia) 7.90 McFarland düzeyinde optik dansitesi okunarak (Resim 2.6) mililitredeki sayısı yaklaşık $2{,}4x10^{10}$ bakteri olarak belirlendi. İnkübasyon sonrası mililitresinde $2{,}4x10^{10}$ *M. elsdenii* içeren TSB'den 100'er ml *in vivo* ortama verildi.



Resim 2.6. *M. elsdenii* üretilmiş pyrex şişelerdeki ringer solüsyonunun optik dansitesi

Araştırmanın *in vitro* denemesinde kullanılmak üzere canlandırılan kültür *in vivo* denemede yapıldığı gibi pyrex şişelerde 100 ml TSB'de istenilen bakteri sayısına erişmesi için 39°C'de mikroaerofilik olarak 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakteri kültürünün mililitredeki sayısını belirlemek amacıyla ¼ gücündeki Ringer solusyonu (Oxoid, BR0052) içerisinde McFarland bakteri sayıcısında (Type DEN 1B, BIOSAN, Latvia) 1,5 McFarland düzeyinde optik dansitesi okundu ve ml'de $4,5x10^9$ bakteri olarak belirlendi. Pyrex şişedeki bakteri solüsyonunu *in vitro* denemede kullanılacak ml'de 10^7,10^6 ve 10^5 düzeylerine getirmek için solusyondan TSB içerisine ondalık dilüsyonlar gerçekleştirildi. Hazırlanan bakteri dilüsyonları taze olarak hazırlanarak bekletilmeden *in vitro* ortama verildi.



Resim 2.7. *M. elsdenii*'nin ondalık dilüsyonlarının TSA'daki görüntüsü

McFarland'da okunan değerlerin doğruluğunu, TSB'de üretilen bakterilerin canlı ve metabolik olarak aktif olup olmadığını ve çevreden olası kontaminasyonları belirlemek amacıyla McFarland bakteri sayıcısında okunan değerlerin ardışık ondalık dilüsyonlarından TSA (Merck, Tryptic-Soy Agar, 40g/L) katı besi yerlerine ekimler yapıldı. Kapakları lastikli anaerobik jarlar içerisinde 39°C'de 24 saat inkübasyona tabii tutulan agarların koloni formlarına bakıldı. Sayımları yapılarak sulandırma sonrası McFarland'da okunan değerler ile karşılaştırıldı (Resim 2.7).

2.2. Deneme I: *İn vivo* Deneme

Deneysel olarak oluşturulan subakut rumen asidozisinde *M. elsdenii* inokulasyonunun rumen parametreleri üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 3-3,5 yaşlı Akkaraman ırkının Sivas Kangal varyetesi olan ortalama 76,2±19,5 kg canlı ağırlığındaki toplam 8 adet rumen kanüllü koç kullanıldı. Hayvanlar bireysel bölmelerde tutularak, deneme boyunca devamlı taze ve temiz su temin edildi (Resim 2.8). Hayvanların vitamin ve mineral madde ihtiyaçları ise yalama taşıyla karşılanmaya çalışıldı. Denemede kullanılan arpaya ve buğdaya dayalı tane yem karışımları Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan Yem Ünitesinde hazırlandı.



Resim 2.8. *İn vivo* çalışmanın yürütüldüğü bireysel bölmeler

Ayrıca araştırmada kullanılan yem karışımlarının besin madde içerikleri, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yem Analiz Laboratuvarında belirlenerek Çizelge 2.2'de verildi.

Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan tane yem karışımları ile kuru yoncanın kuru madde (KM) ve besin madde içerikleri; %KM

	KM	HP	HK	HY	NDF	ADF	NFC
ADTYK	88,76	12,33	5,05	2,35	21,61	7,03	58,66
BDTYK	89,04	14,27	5,46	2,23	20,14	6,94	57,90
Kuru Yonca	88,33	19,98	11,26	2,93	33,9	31,96	31,93

ADTYK: Arpaya Dayalı Tane Yem Karışımı (%80 Arpa %20 Buğday), BDTYK: Buğdaya Dayalı Tane Yem Karışımı (%80 Buğday % 20Arpa), HP: Ham protein, HK: Ham kül, HY: Ham yağ, NDF: Nötral deterjanda çözünmeyen lif, ADF: Asit deterjanda çözünmeyen lif, NFC: Lif olmayan karbonhidrat..

2.2.1. Arpaya Dayalı Tane Yem Karışımı ile Yapılan Uygulama

Hızlı adaptasyon dönemi

Hayvanların kaba yeme adaptasyonlarının sağlanması için önce 15 gün süreyle kuru yonca 5-7 cm boylarında parçalandıktan sonra *ad libitum* olarak verildi. Hayvanların yaşama payı kuru madde ihtiyaçları hesaplanarak bu tüketim miktarının 1,85 katı günlük yem tüketim düzeyi olarak belirlendi. Hayvanlar günlük ortalama 2,01±0,34 kg kuru yonca tüketti. Hayvanlara sabah 08:00 ve akşam 17:00'da olmak üzere iki eşit öğün halinde yem verildi. Kaba yeme adaptasyon sonrasında arpaya dayalı tane yem karışımına (%80 arpa, %20 buğday) dereceli adaptasyon aşamasına geçildi. Dereceli adaptasyonda 1., 4. ve 7. günlerde %20, %40 ve %60 düzeyindeki tane yem karışımı yaşama payının 1,85 katı düzeyinde verildi. Rasyonun geri kalan kısmı kuru yonca ile tamamlandı. Her sabah yemliklerde artan yem olup olmadığı kontrol edilerek artık yem olduğunda miktarı tartılarak %10'luk miktarı numune olarak alınmış ve kuru madde analizleri yapıldı. Hızlı adaptasyon döneminin başlamasıyla birlikte her gün yemlemeden önce ve yemlemeden sonra 2 saat aralıklarla rumen sıvısı numunelerinde pH ölçümleri yapılarak hayvanlar SARA yönünden takibe alındı. Kaba yeme adaptasyonun son günü ve arpaya dayalı tane yem karışımına geçildikten sonra her rasyon kombinasyonunun (%20, %40 ve %60) 1. ve 3. gününde sabah yemlemesinden sonraki 4. ve 8. saatte kanül aracılığı ile alınan rumen sıvı örneklerinde UYA, NH_3-N ve laktik asit analizlerinin yapılması ve protozoa sayımı için numuneler toplandı. Her periyodun son gününde yemlemeden sonraki 4. ve 8. saatte juguler venden kan numuneleri alınarak kan gazları cihazı (GEM Premier 3000) kullanılarak pH, pCO_2, pO_2, Na, K, Ca, glikoz, laktat ve Hct, BE değerleri belirlendi.

Subakut asidozis dönemi

Dereceli adaptasyon süresince hayvanların yemlemeden önce ve yemlemeden sonra 2 saat aralıklarla ölçülen rumen pH'ları değerlendirildiğinde, %60 düzeyinde ADTYK ile besleme durumunda gün içerisinde ölçülen rumen pH'larının 5,2-5,6 arasında seyrettiği belirlenmiş ve subakut asidozis şekillendiği kabul edildi. Subakut asidozis oluştuğu belirlendikten sonra hayvanlar her grupta 4 hayvan olacak şekilde kontrol ve bakteri verilen deneme grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Arpa-buğday

karışımı ile %60 düzeyinde beslemenin 3. gününde ortalama pH 5,55±0,09 olarak belirlendi. Kontrol grubunun pH ortalaması 5,54±0,12; deneme grubunun pH ortalaması ise 5,55±0,08 olarak belirlendi. Subakut asidozis dönemi boyunca hayvanların %60 düzeyinde tane yemle beslenmesine devam edildi.

Sabah SARA döneminin ilk 2 günü sabah yemlemesinden iki saat sonra içerisinde yaklaşık $2,4x10^{10}$cfu/ml bakteri bulunan 100 ml TSB deneme grubundaki hayvanlara kanül aracılığıyla inokule edildi. Aynı dozda bakteri ikinci gün aynı saatte tekrar verildi. Yemlemeden 4 ve 8 saat sonra 4 gün süreyle rumen sıvısı alınarak pH ölçümleri yapılarak UYA, NH_3-N ve laktik asit analizleri ile protozoa sayımı için numune alındı. Sabah yemlemesinden 4 ve 8 saat sonra juguler venden kan alınarak kan gazları cihazında işlendi.

2.2.2. Buğdaya Dayalı Tane Yem Karışımı ile Yapılan Uygulama

Hızlı adaptasyon dönemi

Arpaya dayalı tane yem karışımı ile oluşturulan subakut asidozis döneminin sonunda rumen ortamının düzenlenebilmesi ve hayvanların subakut asidozisin etkilerinden kurtulup toparlanabilmeleri amacıyla kaba yeme tekrar adapte edildi. Adaptasyonlarının sağlanması amacıyla 14 gün süreyle tekrar kuru yonca ile beslenildi. Hayvanlar günlük ortalama 2,23±0,21 kg kuru yonca tüketti.

Kaba yeme adaptasyon süresinin sonunda buğdaya dayalı tane yem karışımı (BDTYK)'na (%80 buğday, %20 arpa) dereceli adaptasyon uygulamasına başlandı. Dereceli adaptasyonda 1., 4. ve 7. günlerde %20, %40 ve %60 düzeyindeki tane yem karışımı yaşama payının 1,85 katı düzeyinde verildi. Rasyonun geri kalan kısmı kuru yonca ile tamamlandı. Her sabah yemliklerde artan yem olup olmadığı kontrol edilerek artık yem olduğunda miktarı tartılarak %10'luk miktarı numune olarak alındı. Ve kuru madde analizleri yapıldı. Hızlı adaptasyon döneminin başlamasıyla birlikte her gün yemlemeden önce ve yemlemeden sonra 2 saat aralıklarla rumen sıvısı numunelerinde pH ölçümleri yapılarak hayvanlar SARA yönünden takibe alındı. Kaba yeme adaptasyonun son günü ve buğdaya dayalı tane yem karışımına geçildikten sonra her rasyon kombinasyonunun (%20, %40 ve %60) 1. ve 3. gününde sabah yemlemesinden sonraki 4. ve 8. saatte kanül aracılığı ile alınan rumen sıvı örneklerinde UYA, NH_3-N ve laktik asit analizlerinin yapılması ve protozoa sayımı

için numuneler toplandı. Her periyodun son gününde yemlemeden sonraki 4. ve 8. saatte juguler venden kan numuneleri alınarak kan gazları cihazı (GEM Premier 3000) kullanılarak pH, pCO_2, pO_2, Na, K, Ca, glikoz, laktat ve Hct, BE değerleri belirlendi. Elde edilen veriler göz önüne alındığında gün içerisindeki ölçülen rumen pH'larının 5,2-5,5 arasında seyrettiği tane yem karışım oranı buğdaya dayalı beslemede de %60 bulundu. Bu düzey yine aynı şekilde arttırılmayıp SARA dönemine bu oranla devam edildi.

Subakut asidozis dönemi

Dereceli adaptasyon süresince hayvanların rumen pH'ları yemlemeden sonra 2 saatte bir ölçülerek SARA oluşma ihtimali takip edildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, %60 düzeyinde BDTYK ile besleme durumunda gün içerisinde ölçülen rumen pH'larının 5,2-5,6 arasında seyrettiği belirlendi ve subakut asidozis şekillendiği kabul edildi. Buğday-arpa karışımı ile %60 düzeyinde beslemenin 3. gününde ortalama pH 5,59±0,10 olarak belirlendi. Subakut asidozis oluştuğu belirlendikten sonra hayvanlar her grupta 4 hayvan olacak şekilde kontrol ve bakteri verilen deneme grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubunun 3.gün pH ortalaması 5,60±0,12; deneme grubunun 3. gün pH ortalaması ise 5,58±0,10 olarak belirlendi. Subakut asidozis dönemi boyunca hayvanların %60 düzeyinde tane yemle beslenmesine devam edildi.

SARA döneminin ilk 2 günü sabah yemlemesinden iki saat sonra içerisinde yaklaşık $2,4x10^{10}$cfu/ml bakteri bulunan 100 ml TSB deneme grubundaki hayvanlara kanül aracılığıyla inokule edildi. Aynı dozda bakteri ikinci gün aynı saatte tekrar verildi. Yemlemeden 4 ve 8 saat sonra 4 gün süreyle rumen sıvısı alınarak pH ölçümleri yapıldı. UYA, NH_3-N ve laktik asit analizleri ile protozoa sayımı için numuneler alındı. Sabah yemlemesinden 4 ve 8 saat sonra juguler venden kan alınarak kan gazları cihazında işlenildi.

2.3 Deneme II: *İn vitro* Deneme

2.3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada, *in vitro* rumen ortamının sağlanmasında kullanılacak olan rumen sıvısı yaklaşık 350 kg canlı ağırlığında rumen kanüllü iki adet Holstein düveden temin edildi. Hayvanlar, sabah 08:00 ve akşam 17:00'da olmak üzere iki eşit öğün halinde kaba/konsantre yem oranı 60:40 olacak şekilde besin madde içerikleri Çizelge 2.3'de verilen pelet yonca ve özel bir yem fabrikasından temin edilen karma yem ile beslenildi. Rasyon hayvanların yaşama payı ve günlük 500 g canlı ağırlık artışını sağlayacak şekilde NRC verileri dikkate alınarak düzenlendi (NRC, 2001). Hayvanların vitamin ve mineral ihtiyaçlarının sağlanması için vitamin–mineral blokları yerleştirilerek, taze ve temiz su devamlı olarak sağlandı.

Çizelge 2.3. Düvelere Yedirilen Pelet Yonca ve Karma Yemin Besin Madde Düzeyleri*

	KM	HP	HK	HY	AÖM	NDF	ADF
Pelet Yonca	96,42	13,43	11,5	2,79	45,31	43,5	32,28
Karma yem	89,22	16,22	7,72	3,44	49,8	37,52	18,38

*%100 Kuru maddedeki değerleri verildi. HP: Ham protein, HK: Ham kül, HY: Ham yağ, NDF: Nötral deterjanda çözünmeyen lif, ADF: Asit deterjanda çözünmeyen lif, AÖM: Azotsuz öz madde.

2.3.2. Rumen Sıvısının Alınması

Rumen sıvısı, yemlemeden önce rumen kanülünden sonda yardımıyla aspiratör kullanılarak rumenin değişik kısımlarından ve sondanın yeri sürekli değiştirilerek alındı. Kanüllü iki hayvandan alınan rumen sıvısı sıcaklığın korunması amacıyla önceden ısıtılmış termosa konularak mümkün olduğunca hızlı bir şekilde laboratuvara getirilerek çift kat tülbentten vakum yardımıyla 39 $^{\circ}$C'lik su banyosunun içerisinde rumen sıcaklığına bağlı kalınarak süzme işlemi yapıldı. Süzülen rumen sıvısı özel doldurma şişesine konularak ince bir hortum yardımıyla şişe içerisine CO_2 verildi.

2.3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Makromineral çözeltisi

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)'tan 5,7 g; Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)'tan 6,2 g ve Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$)'tan 0,6 g tartılıp saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Rumen tampon çözeltisi

Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)'tan 35 g ve Amonyum bikarbonat ($(NH_4)HCO_3$)'tan 4 g tartılıp saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Mikromineral çözeltisi

Kalsiyum klorit ($CaCl_2.2H_2O$)'ten 13,2 g; Mangan klorit ($MnCl_2.4H_2O$)'ten 10,0 g; Kobalt klorit ($CoCl_2.6H_2O$)'ten 1,0 g ve Demir klorit ($FeCl_3.6H_2O$)'ten 8,0 g tartılıp saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Redüksiyon çözeltisi

Sodyum sülfit ($Na_2S.7H_2O$)'ten 0,625 g tartılıp üzerine 1 N NaOH'den 4 ml koyuldu ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak her deneme günü taze olarak hazırlandı.

Resazurin çözeltisi

% 0,1'lik (ağırlık/hacim) hazırlandı.

2.3.4 İnkübasyon Vasatının Hazırlanması

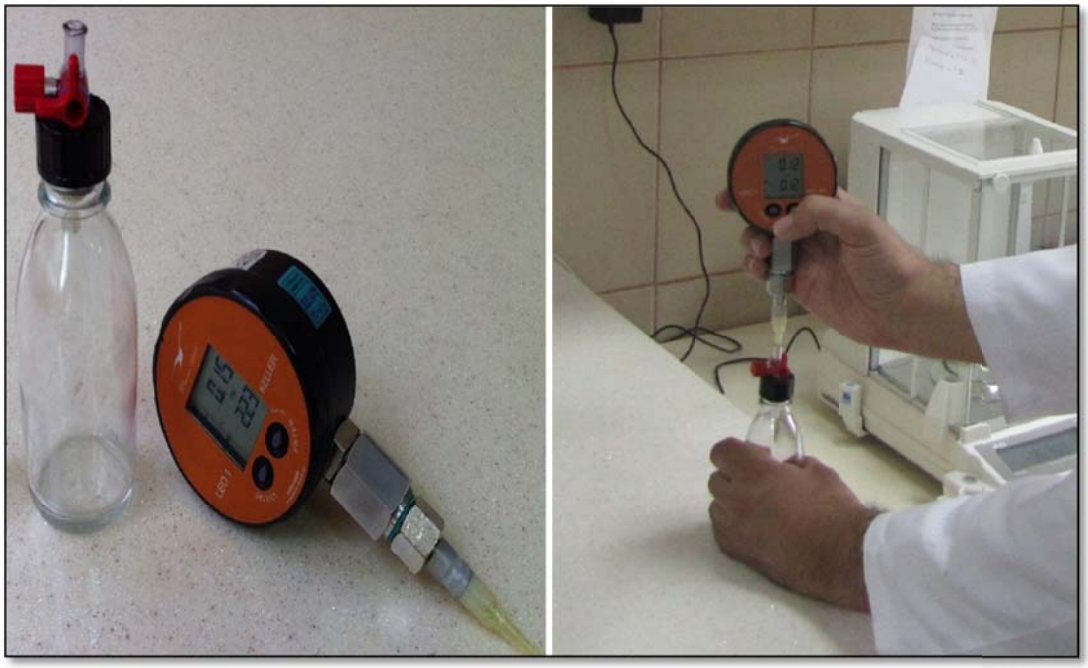
Yem maddelerinin gaz oluşum değerlerinin tespitinde kullanılan *in vitro* ortam Menke ve Steingass (1988)'ın bildirdiği metoda göre hazırlandı.

Makromineral çözeltisi (100 ml), rumen tampon çözeltisi (100 ml), redüksiyon çözeltisi (20 ml), resazurin çözeltisi (0,5 ml), mikromineral çözeltisi (0,05 ml) ve saf su (200 ml) karıştırılarak hazırlanan inkübasyon vasatı ayarlı pompa sistemi olan bir şişeye konulup CO_2 ile doyuruldu. Rumen sıvısının ve inkübasyon

vasatının bulunduğu şişeler 39°C sıcaklıktaki su banyosuna konularak 100 ml'lik pyrex şişelere doldurma işlemi süresince sıcaklığın sabit kalmasına dikkat edildi.

2.3.5. *İn Vitro* Ortamda Subakut Asidozis Oluşturulması

Ağızlarında kapağa monte edilen 3 bar basınca dayanıklı bir döner male ve iki female luer lock konnektörlü 3 yollu musluk (Bıçakçılar, 76030411) ve gri kauçuk tıpa bulunan 250 ml'lik basınca dayanıklı pyrex şişeler kullanıldı (Resim 2.9). Asidozis oluşturacak oranı belirlemek için, pyrex şişelere test diyeti ilave edildi.



Resim 2.9. *İn vitro* denemede kullanılan pyrex şişe ve gaz basınçlarının ölçüldüğü dijital manometre

Test Diyeti; 550 g/kg çözünebilir nişasta, 260 g/kg glikoz, 60 g/kg selüloz, 70 g/kg sellobiyoz ve 60 g/kg tripticase karışımından oluşturuldu.

Test diyetinin farklı oranları (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70 ve 100 g/l) pyrex şişelere konularak üzerlerine 20 ml rumen sıvısı ve 30 ml tampon çözelti ilave edildi. Şişeler inkübatöre konularak 39 °C'de 20 saat inkübe edildi. Daha sonra şişe içeriklerinin pH'sı ölçülerek laktik asit düzeylerinin tespiti için numuneler alındı. *İn vitro* asidozis ortamını belirlemek için bu işlem 5 kez tekrar edildi. Farklı günlerde yapılan bu denemeler sonrası pH ve laktik asit sonuçları değerlendirilerek subakut asidozis ortamını oluşturacak en uygun test diyeti oranı belirlendi (Sung ve ark

2004). Elde edilen sonuçlara bakılarak, *in vitro* subakut asidozis ortamı 25g/L oranındaki test diyeti ile oluşturuldu.

2.3.6. *İn Vitro* Subakut Asidozis Ortamına *M. elsdenii*'nin Katılması

SARA oluşturacak test diyeti oranı belirlendikten sonra pyreks şişelere uygun miktarda test diyeti 0,1 mg'a hassas terazi (GR-200, A&D Company, Japonya) yardımıyla tartılıp 39 °C'ye ayarlı inkubatöre 12 saat önceden konuldu. Her şişeye kanüllü hayvanlardan uygun şartlarda getirilip süzülen rumen sıvısından 20 ml ve her deneme öncesi taze hazırlanan inkübasyon vasatından 30 ml ilave edildi. Deneme grubundaki şişelerde 10^5, 10^6 ve 10^7 cfu/ml düzeyinde *M. elsdenii* içerecek şekilde ringer solüsyonundan 1'er ml eklendi. *M. elsdenii* içermeyen kontrol grubuna ise 1'er ml ringer solüsyonu ilave edildi. Her bir doz için her seferinde 12 şişe konuldu ve işlem 3 farklı günde tekrar edildi. İnkübasyonun 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 ve 24. saatlerinde gaz ölçümleri, 4, 8, 12 ve 24. saatlerinde UYA, NH_3-N ve laktik asit konsantrasyonları ile pH düzeyleri tespit edildi. Her seferinde içerisinde numune olmayan 3 adet şişeye aynı şekilde inkübasyon vasatı ve rumen sıvısı konularak kör numune olarak değerlendirildi ve bu şişelerde oluşan gaz miktarı numunelerin gaz miktarından düşüldü. Aynı şekilde 3'er şişeye de gaz miktarı 211 defa tekrarlanan ölçümlerle belirlenmiş olan standart konsantre yem ve selülolitik aktiviteyi ölçmek amacıyla standart kaba yem numuneleri konuldu. Bu şişelerden elde edilen gaz miktarları numunelerde oluşan gaz miktarlarının düzeltilmesinde kullanıldı. İnkübasyonun 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 24. saatlerinde şişeler içerisinde fermentasyona bağlı olarak oluşan gaz basınçları ölçülerek oluşturdukları gaz miktarları hesaplandı.

İn vitro gaz üretim tekniğinde 100 ml hacimdeki bir şişede fermentasyonla oluşan gazın meydana getirdiği basınç % 0,2 hassasiyetle ölçüm yapan dijital manometre (Keller Leo 1, İsviçre) kullanılarak dolaylı olarak hesaplandı (Lopez ve ark 2007) (Resim 2.9).

2.4. Rumen Ortamı Analizleri

2.4.1. pH Değerinin Belirlenmesi

İn *vivo* denemede hayvanlardan yemlemenin 4. ve 8. saatinde alınan rumen sıvılarının anlık pH değerleri ile *in vitro* denemede içerisinde test diyeti ve inkübasyon vasatı bulunan şişe içeriklerinin 4, 8, 12 ve 24 saatlik inkübasyonu sonunda oluşan pH değerleri dijital pH metre (HI 8314, Hanna Instruments, Portekiz) kullanılarak belirlendi.

2.4.2. Amonyak Azotu Tayini (NH_3-N)

İn vivo ve *in vitro* denemelerden elde edilen rumen sıvılarından 5 ml alınarak 3-5 damla yoğun H_2SO_4 ile karıştırılarak, yaklaşık 1 saat beklendikten sonra 2590 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 1 ml supernatant alınarak daha sonra işlenmek üzere -20 ºC'de saklandı. NH_3-N düzeyleri 625 nm'de spektrofotometrik (UV Mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) olarak Weatherburn (1967)'ün bildirdiği metoda göre belirlendi.

2.4.3. Uçucu Yağ Asitleri Tayini (UYA)

İn vivo denemede yemlemenin 4. ve 8. saatlerinde, *in vitro* gaz testi denemesinde ise uygulamanın 4., 8., 12., ve 24. saatlerinde pipetle 5 ml rumen sıvısı alınarak santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 1 ml %25'lik *meta*-fosforik asit ilave edilerek karıştırılarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant daha sonra işlenmek üzere -20 ºC'de saklandı. Ortam UYA düzeyleri Gaz Kromatografi (Shimadzu, Model 15-A) ile range 10^1'de FID dedektörü yardımıyla analiz edildi. Analiz işlemlerinde dolgu maddesi 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M (Supelco, Cat No:11889) olan, 1,8 inç dış çap ve 0,085 inç iç çapında, 6 feet uzunluğundaki çift cam kolon kullanıldı. Kolon fırını izotermal olarak 185 ^oC'de 25 dakika bekletildi. Enjektör ve detektör sıcaklığı 200 ^oC olarak ayarlandı. Enjeksiyonlar 1 mikrolitre olarak yapıldı.

2.4.4. Laktik asit Tayini

İn vivo denemede rumen sıvısından, *in vitro* denemede ise şişe içeriğinden pipet yardımıyla 5 ml alınarak santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 1 ml %25'lik *meta*-

fosforik asit ilave edilerek karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi. Daha sonra 20000 *g*'de 25 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant -20 ºC saklanarak Kimberley ve Taylor (1996) tarafından bildirilen modifiye Barker ve Summerson (1941)'ın kolorimetrik metoduyla spektrofotometrik (UV Mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) olarak belirlendi.

2.4.5. Protozoa Sayısının Tespiti

1 ml tülbentten kendi haline süzülmüş rumen içeriği (süzülürken sıkıştırma yapmadan) ile 49 ml protozoa sulandırma solüsyonu (150 ml gliserin, 15 ml formaldehit, 180 ml distile su kullanılarak oluşan karışım) ve sayımın iyi yapılması için 2-3 damla brillant green karıştırıldı. Bu karışımdan McMaster Lamına sedimentasyon pipeti ile kamara doluncaya kadar konulmuş ve çökmesi için 1-2 dk beklenildi. 10'luk mercekte sayılarak toplam (n) sayıda protozoa belirlendi.

$$1 \text{ ml'deki protozoa sayısı} = \frac{n*50*1000}{150}$$

Formülü ile hesaplandı (Dehority 1984).

2.5. Kimyasal Analizler

Araştırmada kullanılan tane yem karışımları ile kuru yoncanın kuru madde, ham protein, ham yağ ve ham kül analizleri AOAC'de (1984) belirtilen analiz yöntemlerine uygun olarak belirlendi (Çizelge 2.2, 2.3). NDF ve ADF düzeyleri Goering ve Van Soest (1970) tarafından bildirilen metoda göre The Ankom ^{200} Fiber Analyzer cihazında tespit edildi.

2.6. İstatistiksel Analizler

İn vivo deneme; hızlı adaptasyon ve SARA dönemi olarak 2 ayrı aşamada gerçekleştirildi. Hızlı adaptasyon döneminde, arpa ve buğday hayvanlara % 20, 40 ve 60 düzeylerinde verildi. Bu nedenle veri analizinde lineer model oluşturulurken, muameleler tam olmayan (incomplete) 2 x 3 faktöriyel desene göre düzenlendi. Tane yem ana etkisi (arpa vs. buğday) ve tane yem oranı ana etkisi (%20, 40 ve 60) ve bu iki ana etki arasındaki etkileşim (interaksiyon) miks modelin (Proc. Mixed) kesin faktörleri (fixed factors), bu tane yemleri tüketen hayvanlar ise random faktör olarak

ele alındı. Ayrıca, deneme aşama içinde belli bir süreç izlediği için gün etkisi ile farklı günlerde farklı saatlerde ölçüm yapıldığı için zaman (saat) etkisi de fixed faktör olarak değerlendirildi. Bu nedenle, faktöriyel desende veriler tekrarlı ölçümler sistemine (repeated measures) tabi tutularak split-plot model geliştirildi. Veriler $P<0,05$ düzeyinde anlamlı; $0,05<P<0,10$ düzeyinde eğilim şeklinde kabul edildi.

Denemenin ikinci aşamasında ise, hızlı adaptasyon uygulanarak arpa ve buğdayın %60'lık düzeyi ile SARA geliştirildikten sonra bakteriyel inokulasyonla düzeltilmesi amaçlandı. Tane yem ve bakteri inokulasyon düzeyi ($10^{0,ve\ 10}$ cfu *M.elsdenii*) 2 x 2 faktöriyel desende (iki-yönlü ANOVA) farklı gün ve zaman dilimlerinde benzer şekilde tekrarlı ölçümlerle analiz edildi. Veriler $P<0,05$ düzeyinde anlamlı; $0,05<P<0,10$ düzeyinde eğilim şeklinde kabul edildi.

İn vitro deneme sonucunda elde edilen veriler varyans analizine tabi tutularak zamana bağlı olarak yapılan tekrarlı ölçümler subplot edildi. Önemlilik $P<0,05$ düzeyinde belirtildi.

Tüm verilerin analizinde SPSS 16.0 paket (Release 16.0.0, 2007) programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3. 1. *İn Vivo* Deneme

3.1.1. Kuru Madde Tüketimi (KMT)'nde Gözlenen Değişimler

Tane yeme hızlı adaptasyon döneminde kuru madde tüketimi tane yem çeşidinden etkilenmemiş, tane yem oranının artmasıyla birlikte kuru madde tüketiminin düşmeye eğilim gösterdiği belirlenmiştir. SARA döneminde, kuru madde tüketiminin tane yem karışımlarından etkilenmediği, *Megasphaera elsdenii* inokulasyonunun ise kuru madde tüketimini olumsuz etkilediği (1,56 kg), inokulasyon yapılmayan kontrol grubunda kuru madde tüketiminin rakamsal olarak daha yüksek gerçekleştiği (1,69 kg) tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde kuru madde tüketiminde gözlenen değişimler

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	KMT, kg
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	1,77
		40	1,69
		60	1,63
	Buğday	20	1,69
		40	1,66
		60	1,51
SEM			0,07
SARA	Arpa	Hayır	1,70
		Evet	1,68
	Buğday	Hayır	1,69
		Evet	1,43
SEM			0,08
ANOVA			
Adaptasyon			
Tane Yem (TY)			0,12
Tane Yem Oranı (TYO)			0,06
TY*TYO			0,84
SARA			
Tane Yem (TY)			0,12
Bakteri (B)			0,09
TY*B			0,14

3.1.2. Rumen Sıvısı pH'sında Belirlenen Değişimler

Hızlı adaptasyon döneminde yemleme öncesi ve yemleme sonrası 2 saat aralıklarla alınan rumen sıvısı numunelerinin pH'ları tane yem çeşidi ve oranına göre farklılaşmıştır (P<0,0001). Arpaya dayalı tane yem karışımı (ADTYK)'nın tüm oranlarda buğdaya dayalı tane yem karışımı (BDTYK)'na göre daha düşük pH'ya neden olduğu görülmektedir. Tane yem ve tane yem oranı arasında da bir interaksiyon olduğu görülmektedir (P<0,02). Adaptasyon döneminde rumen sıvısı pH değerlerinin grup ortalamaları arpaya dayalı tane yem karışımında 5,89; buğdaya dayalı tane yem karışımında ise 6,03 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3).

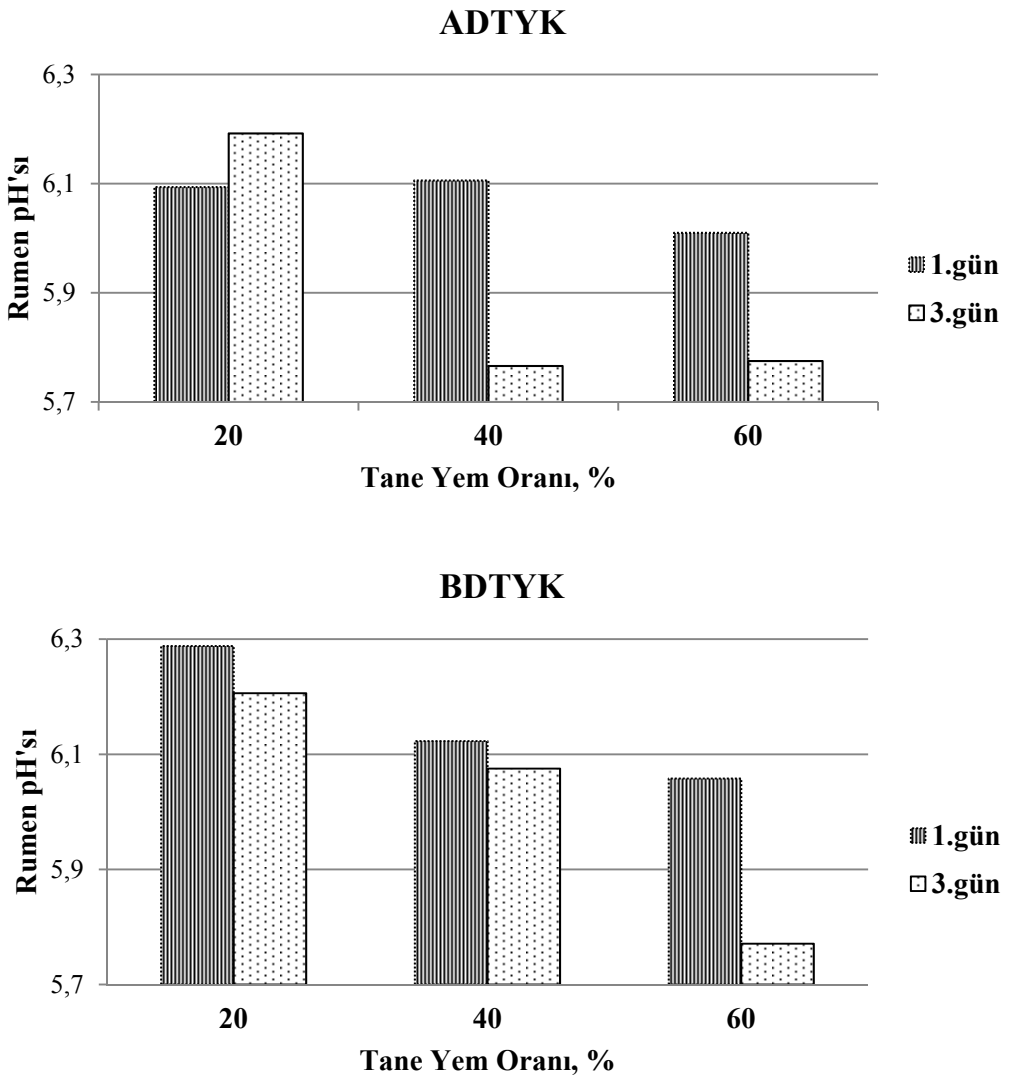
Çizelge 3.2. Hızlı Adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısı pH'sındaki değişimler

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	pH
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	6,14
		40	5,94
		60	5,75
	Buğday	20	6,25
		40	6,10
		60	5,84
SEM			0,02
SARA	Arpa	Hayır	5,62
		Evet	5,50
	Buğday	Hayır	5,64
		Evet	5,60
SEM			0,02
ANOVA			
Adaptasyon			
Tane Yem (TY)			0,0001
Tane Yem Oranı (TYO)			0,0001
TY*TYO			0,02
SARA			
Tane Yem (TY)			0,006
Bakteri (B)			0,0001
TY*B			0,115

Hızlı adaptasyon döneminde: Gün etkisi, P<0,0001; Zaman etkisi, P<0,0001;TYO x gün etkisi, P<0,0001; TY x TYO x gün etkisi, P<0,0001; TYO x zaman etkisi, P<0,052; TY x TYO x zaman, P<0,001; Gün x zaman etkisi, P<0,045; TYO x gün x zaman etkisi, P<0,0001; TY x TYO x gün x zaman etkisi P<0,013 bulunmuştur.

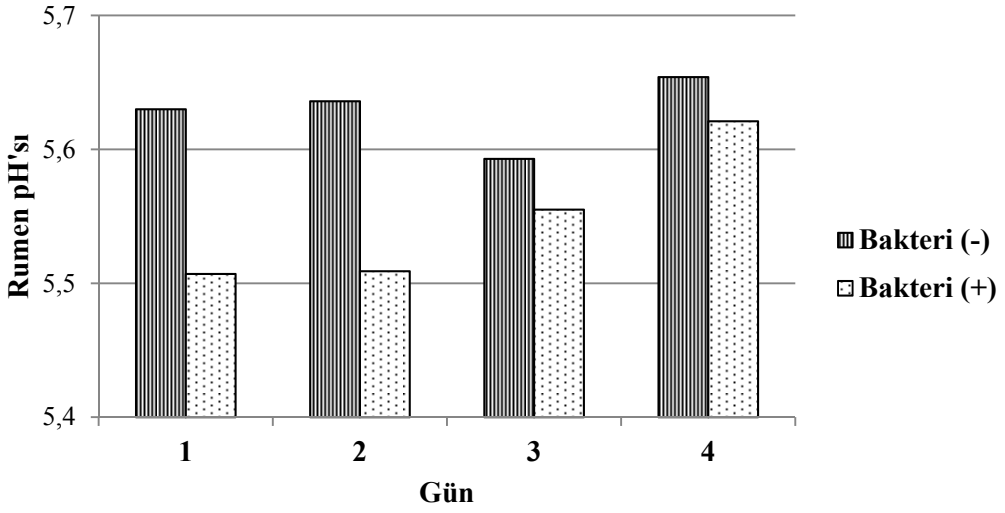
SARA döneminde: Gün etkisi, P<0,038; Zaman etkisi, P<0,0001; TY x zaman etkisi, P<0,004; Bakteri x zaman etkisi, P<0,074; TY x bakteri x zaman etkisi, P<0,072; Gün x zaman etkisi, P<0,041 olarak bulunmuştur.

Adaptasyon döneminde rumen sıvısı pH'larının rasyon değişiminin 1. ve 3. günlerine (P<0,0001) ve yemleme sonrası numunelerin alındığı zaman periyotlarına (P<0,0001) göre farklılaştığı, bu farklılıkların da rasyon değişiminin 1. ve 3. günü ile pH'ların alındığı zaman periyotları arasında interaksiyona neden olduğu belirlenmiştir (P<0,045). Rasyon değişiminin ilk günü alınan pH ile yemleme öncesi alınan pH'nın 3.günü alınan pH'ya ve yemleme sonrası alınan pH'lara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tane yem çeşidine bağlı olarak her rasyon kombinasyonunun ilk günü alınan pH'ların 3. günde alınan pH'lardan daha yüksek olduğu (P<0,0001) da tespit edilmiştir (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. Tane yem çeşidine bağlı olarak her rasyon kombinasyonunun 1. ve 3. günü alınan rumen pH ortalamaları (TY x TYO x gün interaksiyonu, (P<0,0001).

SARA döneminde tane yem çeşidine göre rumen sıvısı pH ortalamaları etkilenerek (P<0,006) arpa için 5,56; buğday için 5,62 olarak bulunmuştur. *M. elsdenii* inokulasyonu rumen sıvısı pH'sını önemli düzeyde değiştirmiş (P<0,0001), inokulasyon yapılan hayvanlarda ortalama pH 5,55 bulunurken, inokulasyon yapılmayan hayvanlarda 5,63 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Tane yem çeşidi ve bakteri inokulasyonu arasında ise bir interaksiyona rastlanmamıştır. Bakteri inokulasyonu ile birlikte rumen pH'sında günlere göre çok büyük bir farklılık gözlenmemekle birlikte Grafik 3.2 incelendiğinde, numune alınan 4 günlük SARA döneminde bakteri inokulasyonu ile birlikte düşen pH'nın 4. güne doğru artmaya meylettiği görülmektedir. Bakteri inokulasyonu yapılmayan grupta ise pH'nın ilk gün ile 4. gün arasında daha stabil seyrettiği dikkat çekmektedir.



Grafik 3.2. SARA döneminde bakteri inokulasyonuna bağlı olarak günlere göre pH'larda gözlenen değişiklikler

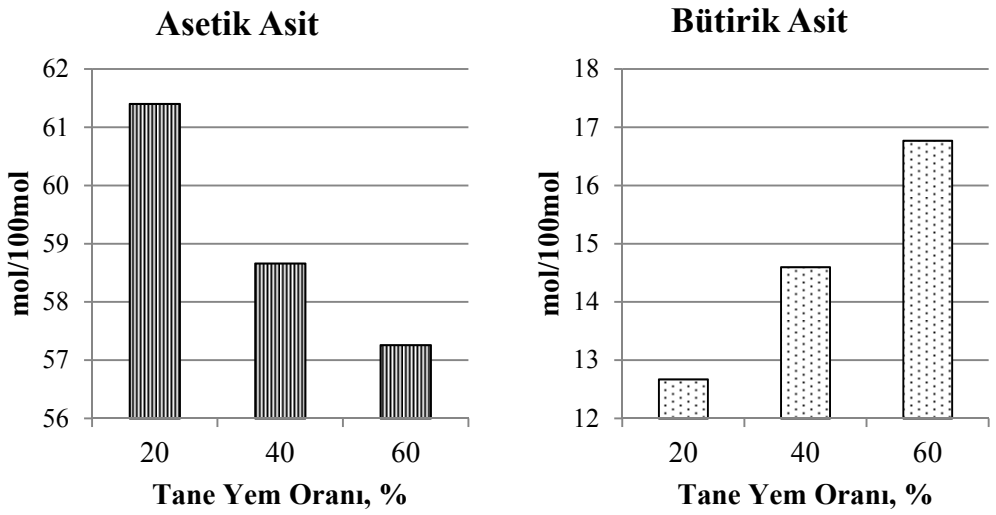
Çizelge 3.3. Tane yem karışımları ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak rumen sıvısı pH, amonyak (NH_3) ve laktik asit düzeyleri

Deneme Dönemi	Tane Yem/Bakteri İnokulasyonu	pH	Amonyak*	Laktik Asit*
Hızlı Adaptasyon	Arpa	5,89±0,03	10,15±0,30	0,58±0,04
	Buğday	6,03±0,02	11,93±0,24	0,51±0,04
SARA	Arpa	5,56±0,03	9,61±0,49	0,92±0,07
	Buğday	5,62±0,03	12,13±0,33	0,73±0,06
	Bakteri -	5,63±0,03	11,34±0,41	0,82±0,06
	Bakteri +	5,55±0,03	10,39±0,47	0,83±0,06

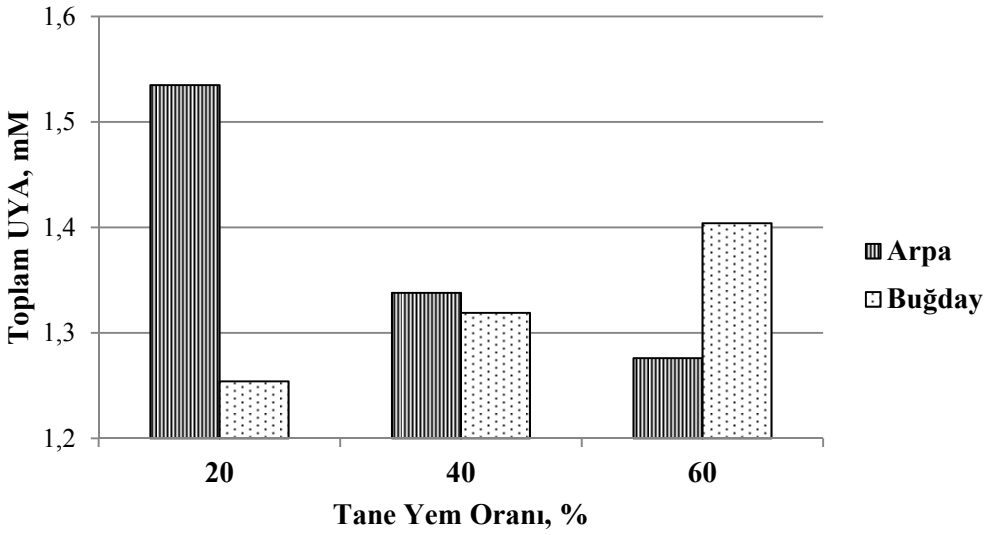
* mmol/L

3.1.3. Rumen Sıvısı Uçucu Yağ Asitleri (UYA) Parametrelerindeki Değişimler

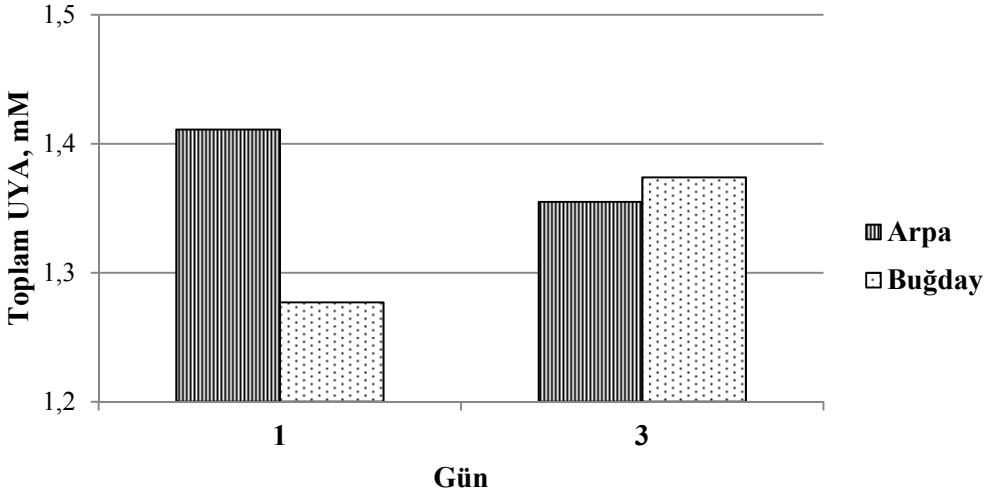
Adaptasyon dönemi boyunca asetik (P<0,0001), propiyonik (P<0,02) izobütirik, bütirik, izovalerik (P<0,0001) ve valerik (P<0,005) asit üretiminin tane yem çeşidine göre farklılaştığı belirlenmiştir. Arpaya dayalı tane yem tüketiminde asetik ve propiyonik asit düzeyi buğdaya dayalı tane yem tüketimine göre yüksek iken izobütirik, bütirik, izovalerik ve valerik asitlerin oranı buğdaya dayalı beslemede daha yüksek olarak bulunmuştur (Çizelge 3.5). Tane yem karışımlarının her %20'lik artışında asetik ve bütirik asit düzeylerinde önemli ölçüde farklılaşma gerçekleşmiştir. Tane yem oranının artışına bağlı olarak asetik asit düzeyinde düşüş meydana gelirken bütirik asit düzeyinde artış gözlenmiştir (P<0,0001; Grafik 3.3). Asetik asit (P<0,02) ve propiyonik asit (P<0,001) ile toplam UYA üretimi (P<0,0001) ve As:Pr oranı (P<0,001) açısından tane yem çeşidi ile tane yem oranı arasında interaksiyonun olduğu tespit edilmiştir. Toplam UYA üretiminin, tane yem olarak arpa kullanıldığında tane yem oranının artışıyla birlikte azaldığı (1,28 mmol/L), buğday kullanıldığında ise artış (1,40 mmol/L) gösterdiği dikkat çekmektedir (Grafik 3.4).



Grafik 3.3. Adaptasyon döneminde tane yem oranın artmasına bağlı olarak asetik asit ve bütirik asit düzeyileri arasındaki belirlenen değişiklikler, (P<0,0001).



Grafik 3.4. Tane yem çeşidine bağlı olarak tane yem oranın artmasının toplam uçucu yağ asitleri düzeyleri üzerine etkisi (TY x TYO interaksiyonu, P<0,0001).

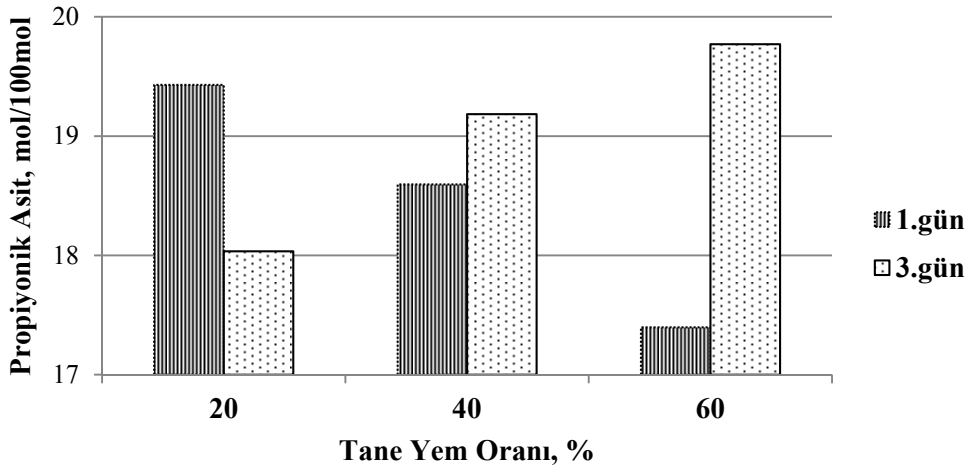


Grafik 3.5. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidine bağlı olarak günlere göre toplam uçucu yağ asitleri düzeyindeki değişimler (TY x gün interaksiyonu, P<0,02).

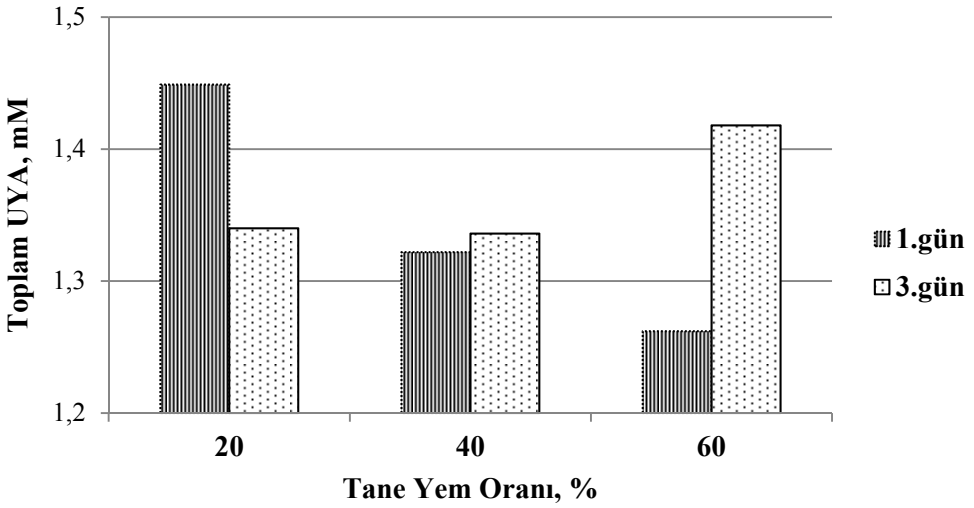
Sabah yemlemesinden 4 saat sonra alınan numunelerde propiyonik ve valerik asitler ile toplam UYA üretimi 8. saatte alınan numunelerden daha yüksek bulunmuştur (P<0,0001). Hızlı adaptasyon dönemi boyunca UYA parametreleri üzerine çok sayıda interaksiyon belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Toplam UYA üretiminin tane yem çeşidine göre günler arasında farklılık gösterdiği (P<0,02), arpaya dayalı tane yem uygulaması ile toplam UYA üretiminin ilk gün yüksek iken 3. gün düştüğü, buğdaya dayalı beslemede ise tam tersi bir durumun sözkonusu olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.5). Tane yem oranının %40 ve %60'a çıkarılmasıyla birlikte propiyonik asit (P<0,0001) ve toplam UYA üretiminin (P<0,006) 3. günlerde artış gösterdiği

tespit edilmiştir (Grafik 3.6 ve 3.7). Tane yem oranının artırıldığı her adaptasyon periyodunun ilk günü yüksek olan asetik asit düzeyi ise 3. günü düşüş göstermiştir (P<0,05).

Adaptasyon döneminde her iki tane yem karışımında da tane yem oranının %20'den %40'a çıkarılmasıyla birlikte ilk gün yüksek seyreden propiyonik asit düzeyinin 3. gün düştüğü, sabah yemlemesi sonrası 4. saatte alınan numunelerde propiyonik asit düzeyinin 8. saatte alınan numunelerden daha yüksek seyretmeye eğilim gösterdiği belirlenmiştir.



Grafik 3.6. Adaptasyon döneminde tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre propiyonik asit düzeyindeki değişimler (TYO x gün interaksiyonu, P<0,0001).



Grafik 3.7. Adaptasyon döneminde tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre toplam uçucu yağ asitleri düzeyindeki değişimler (TYO x gün interaksiyonu, P<0,006).

Çizelge 3.4. *İn vivo* deneme dönemlerinde tane yem karışımları ve oranları ile *M.elsdenii* inokulasyonuna bağlı olarak UYA parametrelerinde meydana gelen değişimler

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	Asetik Asit*[1,2,3,4,5,6,23,24]	Propiyonik Asit*[7,8,9,10,11,25]	İzobütirik Asit*[12,13,26]	Bütirik Asit*[14,15,24,25,27]	İzovalerik Asit*[28,29,30]	Valerik Asit*[7,16,17,31]	Toplam UYA, mM[3,7,18,25,32,33]	As:Pr**[7,10,19,20,21,22,25]
Hızlı Adaptasyon										
	Arpa	20	62,95	18,89	1,83	11,96	2,09	2,29	1,54	3,38
		40	60,75	18,63	1,98	13,60	2,66	2,36	1,34	3,34
		60	57,55	19,95	2,18	16,15	2,00	2,17	1,28	3,05
	Buğday	20	59,85	18,58	2,63	13,38	3,05	2,52	1,25	3,30
		40	56,55	19,15	2,73	15,60	3,26	2,71	1,32	3,00
		60	56,97	17,22	2,65	17,39	3,18	2,59	1,40	3,45
SEM			0,66	0,45	0,14	0,51	0,22	0,14	0,04	0,10
SARA	Arpa	Hayır	54,26	21,38	1,47	18,19	1,93	2,78	1,31	2,71
		Evet	53,58	24,37	1,54	16,68	1,73	2,10	1,44	2,33
	Buğday	Hayır	57,57	15,28	2,18	19,62	2,71	2,65	1,46	3,97
		Evet	56,92	18,38	2,29	17,24	2,61	2,56	1,45	3,28
SEM			0,76	0,81	0,13	0,50	0,11	0,19	0,04	0,16
ANOVA										
Adaptasyon										
Tane Yem (TY)			0,0001	0,02	0,0001	0,0001	0,0001	0,005	0,09	0,9
Tane Yem Oranı (TYO)			0,0001	0,80	0,36	0,0001	0,15	0,52	0,23	0,25
TY*TYO			0,02	0,001	0,43	0,75	0,43	0,80	0,0001	0,001
SARA										
Tane Yem (TY)			0,0001	0,0001	0,0001	0,05	0,0001	0,39	0,02	0,0001
Bakteri (B)			0,39	0,0001	0,50	0,0001	0,16	0,04	0,12	0,001
TY*B			0,90	0,95	0,86	0,39	0,61	0,12	0,07	0,33

*mol/100 mol, **Asetik asit/Propiyonik asit

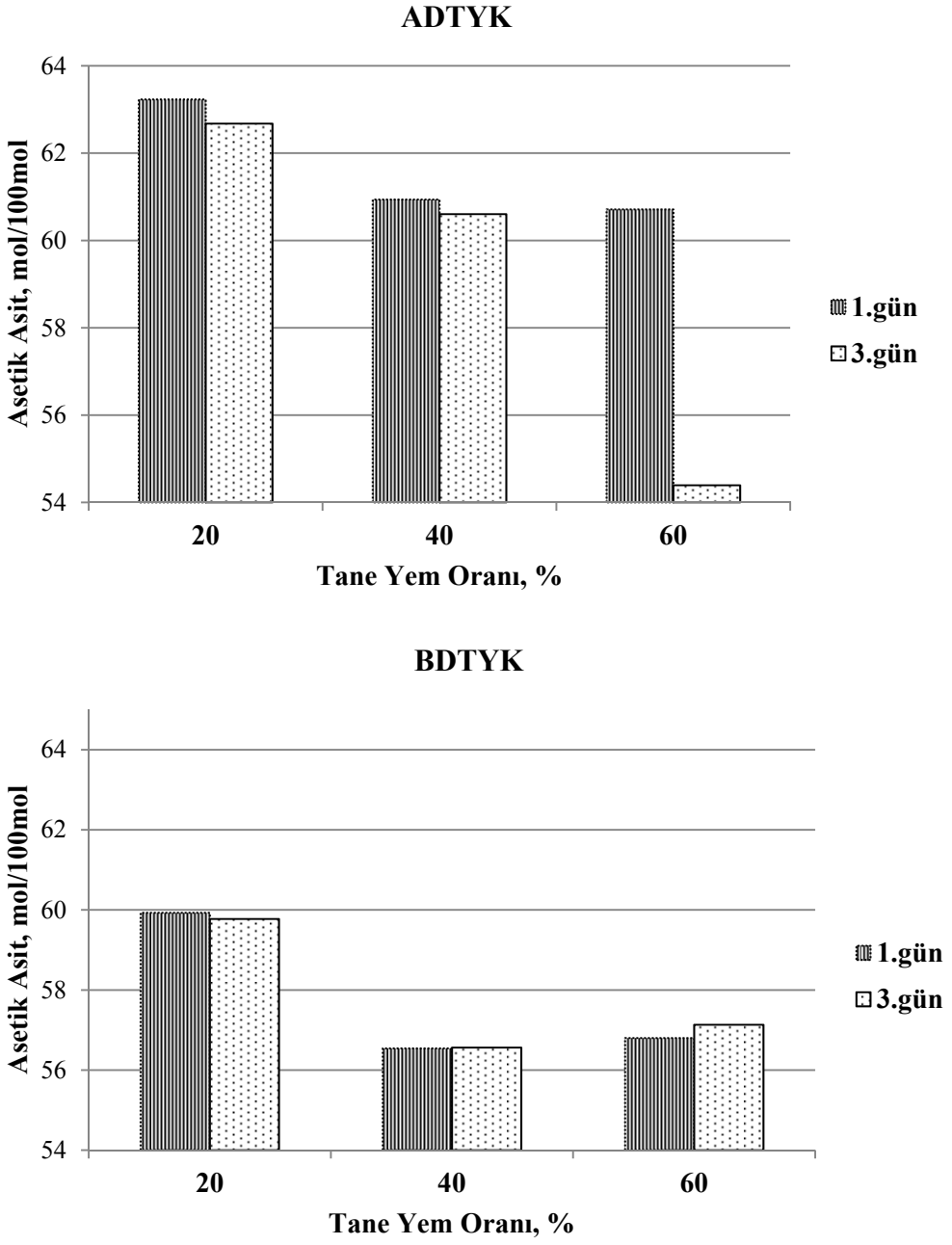
Adaptasyon dönemi boyunca: [1] Gün etkisi, P<0,031, [2] Zaman etkisi, P<0,04; [3] TY x gün etkisi, P<0,02; [4] TYO x gün etkisi, P<0,06; [5] TY x TYO x gün etkisi, P<0,03; [6] TY x TYO x zaman etkisi, P<0,05; [7] Zaman etkisi, P<0,0001, [8] TY x gün etkisi, P<0,004, [9]TYO x gün etkisi, P<0,0001; [10] TY x TYO x gün etkisi, P<0,0001; [11] TY x TYO x gün x zaman etkisi, P<0,07; [12]Zaman etkisi, P<0,06; [13] TY x gün etkisi, P<0,08; [14] Gün etkisi, P<0,007; [15]Zaman etkisi, P<0,001; [16] Gün etkisi, P<0,03; [17] TYO x gün x zaman etkisi, P<0,09; [18] TYO x gün etkisi, P<0,006; [19] TY x gün etkisi, P<0,003; [20] TYO x gün etkisi, P<0,001; [21] TY x TYO x zaman etkisi, P<0,09; [22] TY x TYO x gün x zaman etkisi, P<0,04 olarak bulunmuştur.

SARA dönemi boyunca: [23] Zaman etkisi, P<0,03; [24] TY x gün etkisi, P<0,06; [25] Zaman etkisi, P<0,0001; [26] TY x zaman etkisi, P<0,07; [27] Bakteri x zaman etkisi, P<0,07; [28]TY x gün etkisi, P<0,07; [29] Bakteri x gün etkisi, P<0,09; [30] Bakteri x gün x zaman etkisi, P<0,05; [31] TY x zaman etkisi, P<0,08; [32] TY x gün etkisi, P<0,002; [33] TY x bakteri x zaman etkisi, P<0,04 olarak bulunmuştur

Çizelge 3.5. Deneme dönemlerinde tane yem karışımlarına ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak rumen sıvısı UYA parametrelerinde meydana gelen değişimler

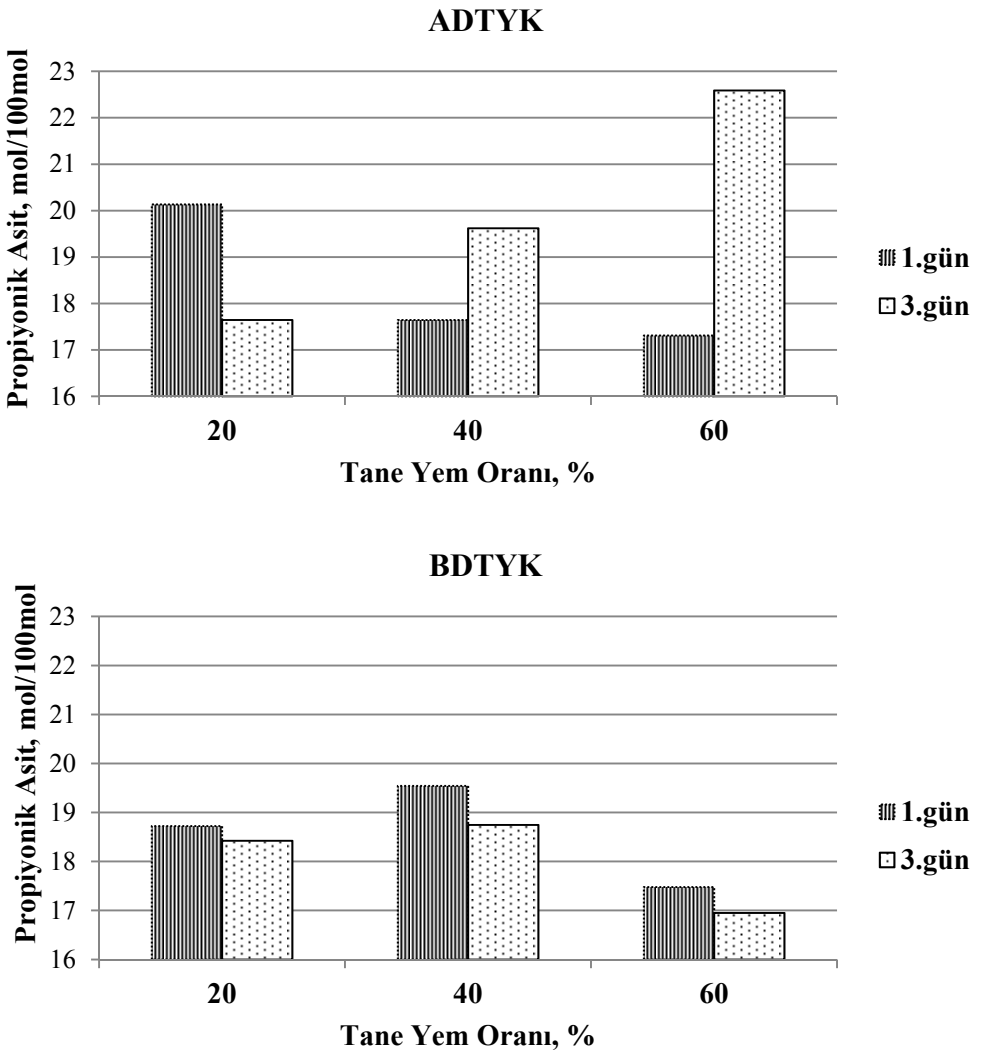
Deneme Dönemi	Tane Yem/Bakteri İnokulasyonu	Asetik Asit*	Propiyonik Asit*	İzobütirik Asit*	Bütirik Asit*	İzovalerik Asit*	Valerik Asit*	Toplam UYA	As:Pr**
Hızlı Adaptasyon	Arpa	60,57±0,44	19,09±0,33	1,98±0,08	13,84±0,35	2,25±0,17	2,27±0,09	1,39±0,04	3,27±0,07
	Buğday	57,82±0,45	18,33±0,29	2,67±0,07	15,40±0,35	3,16±0,08	2,61±0,08	1,33±0,03	3,25±0,07
SARA	Arpa	53,97±0,64	22,90±0,71	1,51±0,07	17,38±0,43	1,84±0,07	2,41±0,17	1,38±0,04	2,53±0,10
	Buğday	57,25±0,44	16,83±0,48	2,23±0,09	18,43±0,37	2,66±0,08	2,60±0,08	1,46±0,03	3,63±0,13
	Bakteri -	56,05±0,63	18,17±0,66	1,84±0,09	18,91±0,41	2,33±0,09	2,70±0,15	1,39±0,04	3,37±0,14
	Bakteri +	55,25±0,53	21,38±0,71	1,92±0,10	16,94±0,35	2,18±0,10	2,32±0,09	1,45±0,04	2,81±0,12

*mol/100 mol, **Asetik asit/Propiyonik asit



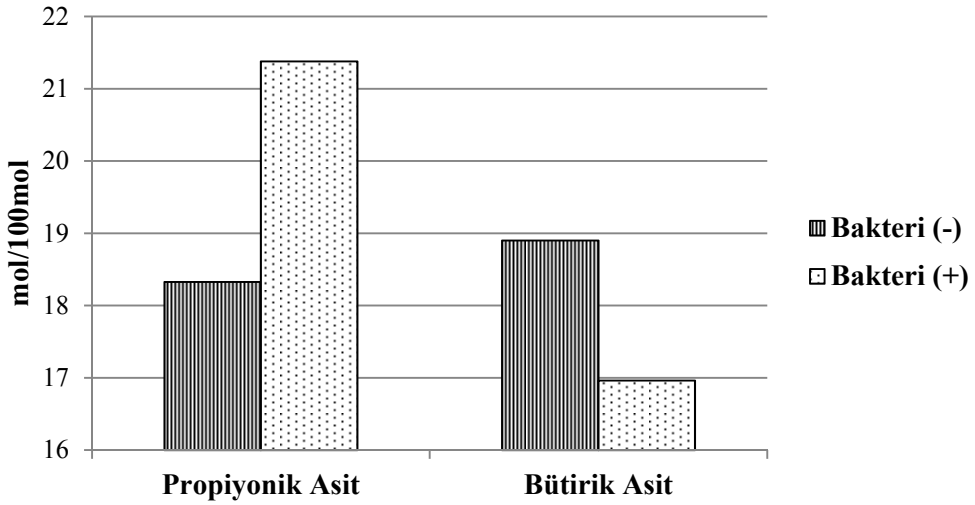
Grafik 3.8. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidi ve tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre asetik asit oranındaki değişimler (TY x TYO x Gün interaksiyonu, P<0,03).

Adaptasyon döneminde asetik asit ve propiyonik asit yönünden tane yem çeşidi, tane yem oranı ve gün arasında interaksiyon gözlenmiştir. Bu interaksiyonlar tane yem çeşitleri arasında farklı gelişmiştir (Grafik 3.8 ve 3.9).

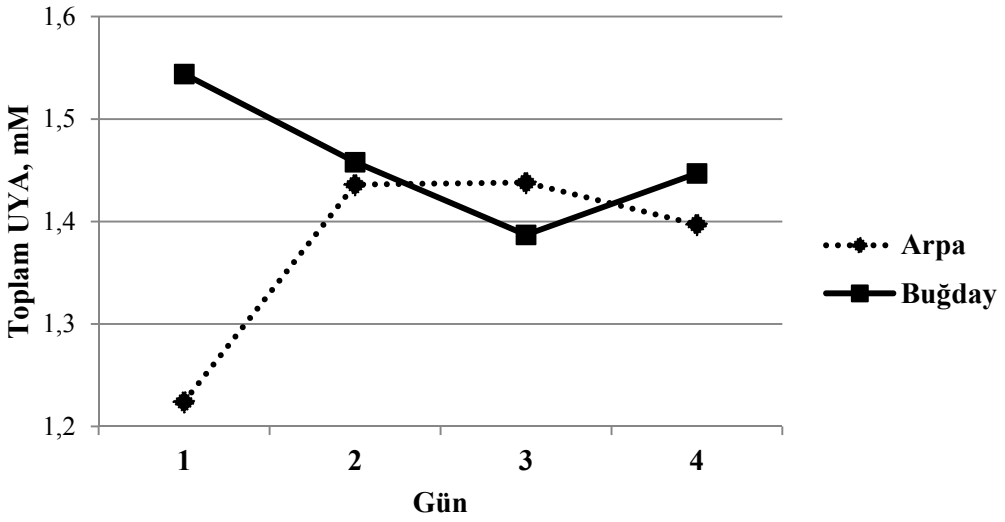


Grafik 3.9. Adaptasyon döneminde tane yem çeşidindeki tane yem oranının artışına bağlı olarak günlere göre propiyonik asit oranındaki değişimler (TY x TYO x gün interaksiyonu, P<0,0001).

SARA döneminde asetik, propiyonik, izobütirik, izovalerik (P<0,0001), bütirik (P<0,05) asit oranları ile toplam UYA (P<0,02) ve As:Pr oranının (P<0,0001) tane yem çeşidinden etkilendiği görülmüştür (Çizelge 3.4). *M. elsdenii* inokulasyonu yapılan grubun propiyonik asit oranı (%21,38) yapılmayan gruba (%18,17) göre yükselirken (P<0,0001), özellikle bütirik asit düzeyinde inokulasyonun yapıldığı grupta (P<0,0001) bir düşüş (%18,91-%16,94) gözlenmiştir (Grafik 3.10). Bakteri inokulasyonunun bütirik asit düzeyinde olduğu gibi valerik asit düzeyinde de belirgin bir düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir. Bakteri inokulasyonu ile birlikte propiyonik asit oranındaki artış As:Pr oranında azalmaya yol açmıştır (3,37-2,81) (P<0,001). (Çizelge 3.5).



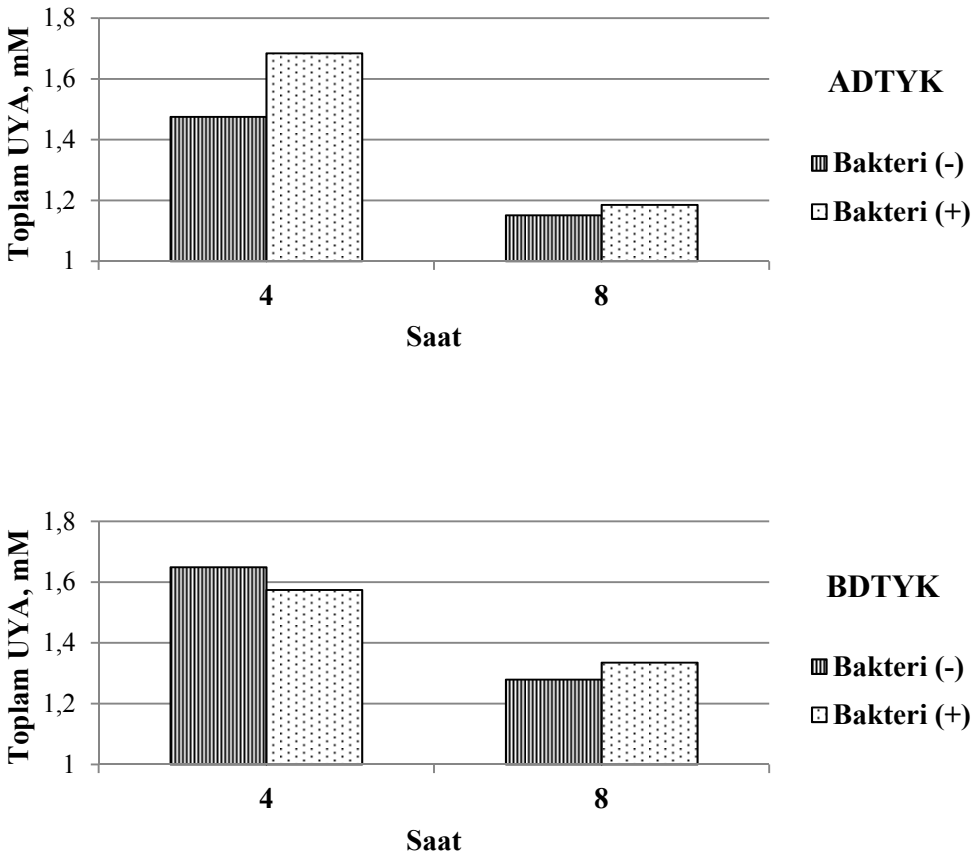
Grafik 3.10. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun propiyonik asit ve bütirik asit düzeyine etkileri, (Bakteri etkisi, P<0,0001).



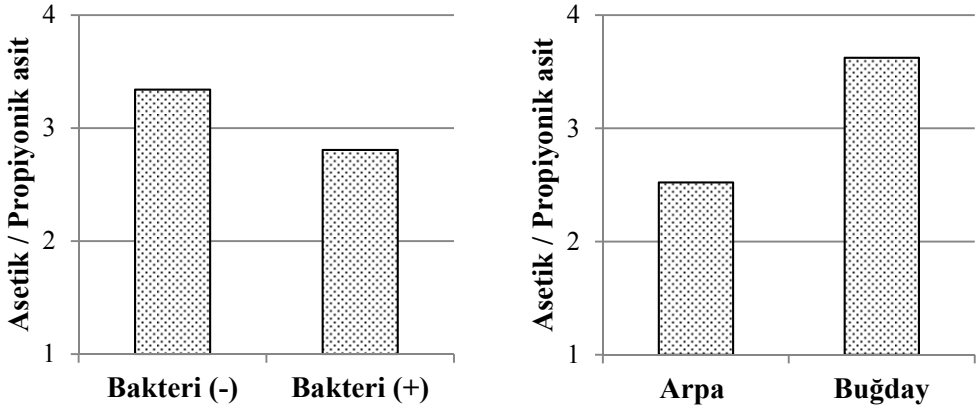
Grafik 3.11. SARA döneminde tane yem çeşidi ile *M. elsdenii* inokulasyonun etkisine bağlı olarak günlere göre toplam UYA'lardaki değişimler (TYO x gün interaksiyonu, P<0,002).

SARA döneminde asetik (P<0,03), propiyonik ve bütirik asitlerin oranı (P<0,0001) ile toplam UYA üretimi (P<0,0001) üzerine yemleme sonrası numune alma zamanının etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir (P<0,0001). Bu dönemde yemleme sonrası 4. saatte alınan numunelerde yüksek olan propiyonik asit ve toplam UYA düzeyi yemleme sonrası 8. saatte düşerken, asetik ve bütirik asitte tam tersi bir durum gerçekleşerek 8. saat numunelerinde daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bakteri inokulasyonu ile birlikte ilerleyen günlerde izovalerik asit düzeyi düşerken, inokulasyon yapılmayan grupta izovalerik asit düzeyinin 2. gün yükseldiği, daha sonra düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Arpaya dayalı tane yem karışımı kullanıldığında, toplam UYA düzeyi bakteri inokule edilen grupta, bakteri inokulasyonu yapılmayan

gruba göre daha yüksek seyretmiştir. Buğdaya dayalı tane yem karışımı kullanıldığı durumda ise, bakteri inokue edilen grupta toplam UYA düzeyi daha düşük olarak tespit edilmiştir. Her iki tane yem karışımında da, yemlemeden 4 saat sonra alınan numunelerde toplam UYA düzeyi daha yüksek belirlenmiştir (Grafik 3.12).



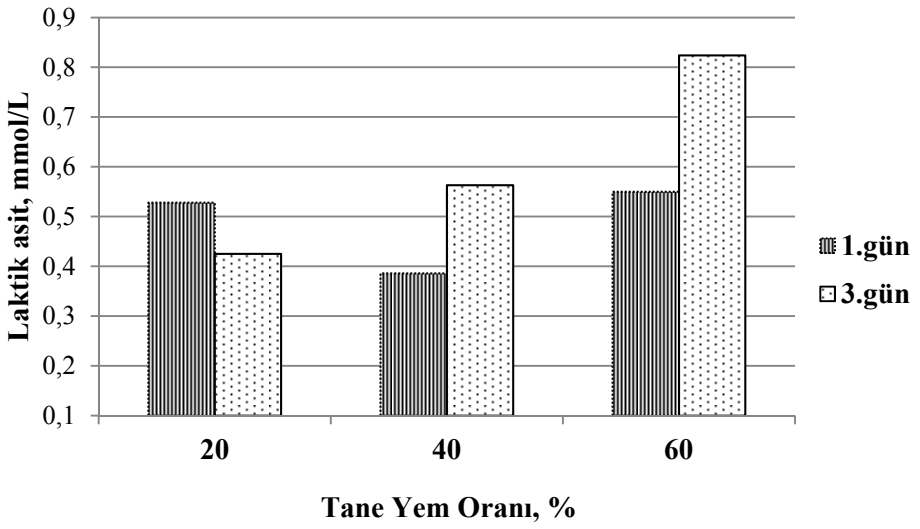
Grafik 3.12. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun toplam UYA düzeyine etkileri, (Bakteri etkisi, P<0,04).



Grafik 3.13. SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun (Bakteri etkisi, P<0,001) ve tane yem çeşidinin (Tane Yem etkisi, P<0,0001) As/Pr oranı üzerine etkisi.

3.1.4. Laktik Asit Yoğunluğu Üzerine Değişimler

Hızlı adaptasyon sırasında arpaya dayalı (0,58 mM) besleme ile buğdaya dayalı (0,51 mM) besleme arasında rumen sıvısı laktik asit yoğunluğu açısından farklılık bulunmamıştır. Tane yem oranının artışıyla birlikte laktik asit yoğunluğu da artış göstermiştir (P<0,0001) (Çizelge 3.6). Hızlı adaptasyon süresince rumen sıvısı laktik asit yoğunluğu sadece %20 tane yem karışımında adaptasyonun ilk günü, %40 ve %60 oranlarında ise 3. günü daha yüksek bulunmuştur (P<0,008) (Grafik 3.14).



Grafik 3.14. Adaptasyon döneminde rumende laktik asit yoğunluğunun tane yem oranı ve günlere bağlı olarak değişimi (TYO x gün interaksiyonu, P<0,008)

Hızlı adaptasyon döneminde tane yem karışımlarının bütün artış oranlarında rumen sıvısı laktik asit yoğunluğu yemleme sonrası 4. saate göre 8. saatte daha yüksek bulunmuştur (P<0,035).

SARA döneminde, buğdaya (0,73 mM) kıyasla arpaya dayalı (0,92 mM) beslenen hayvanlarda rumen sıvısında daha fazla laktik asit birikimi gerçekleşmiştir (P<0,032) (Çizelge 3.3). *M. elsdenii* inokulasyonunun buğdaya dayalı beslemede laktik asit yoğunluğunu rakamsal olarak azalttığı (0,79-0,68 mmol/L) belirlenmekle birlikte genel olarak değerlendirildiğinde inokulasyonun laktik asit yoğunluğu üzerine istatistiksel bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir. SARA döneminde de adaptasyon döneminde olduğu gibi 8. saat numunelerinde laktik asit yoğunluğu daha yüksek olarak belirlenmiştir (P<0,0001).

Çizelge 3.6. Hızlı Adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısındaki laktik asit yoğunlukları

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	Laktik Asit, mmol/L
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	0,59
		40	0,50
		60	0,65
	Buğday	20	0,36
		40	0,45
		60	0,72
SEM			0,06
SARA	Arpa	Hayır	0,86
		Evet	0,98
	Buğday	Hayır	0,79
		Evet	0,68
SEM			0,09
ANOVA			
Adaptasyon			
Tane Yem (TY)			0,164
Tane Yem Oranı (TYO)			0,001
TY*TYO			0,061
SARA			
Tane Yem			0,032
Bakteri (B)			0,92
TY*B			0,19

Hızlı adaptasyon döneminde: Zaman etkisi, P<0,0001; TYOx gün etkisi, P<0,008; TYO x zaman etkisi, P<0,035; TYO x gün x zaman etkisi, P<0,063 bulunmuştur.
SARA döneminde: Zaman etkisi, P<0,0001olarak bulunmuştur.

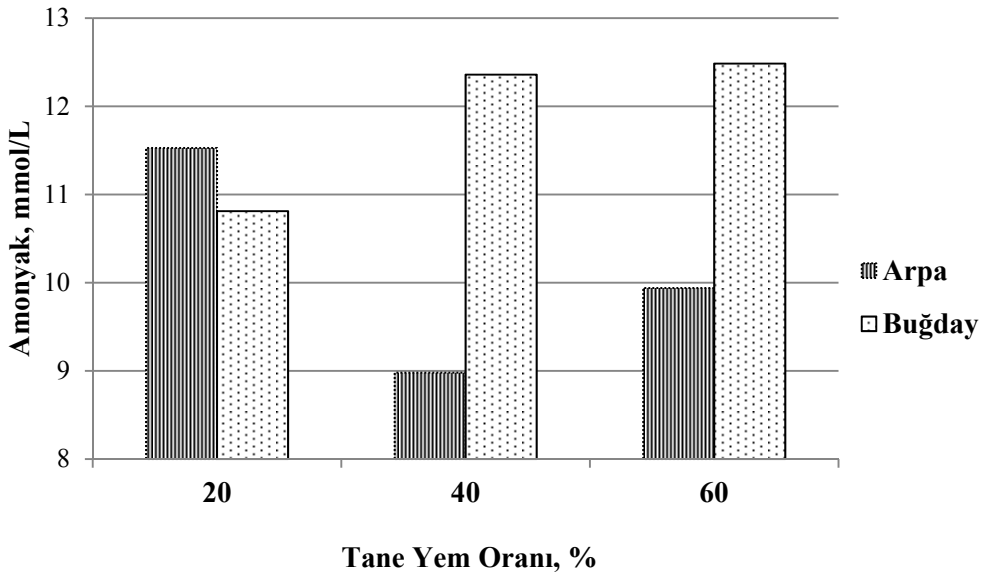
3.1.5. Rumen Sıvısı Amonyak Yoğunluğundaki Değişimler

Hızlı adaptasyon periyodu boyunca rumen sıvısı amonyak düzeylerinin arpaya (10,15 mM) göre buğdayda (11,93 mM) daha yüksek olduğu (P<0,0001) (Çizelge 3.3), tane yem oranındaki artışların ise amonyak düzeylerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Tane yem çeşidine bağlı olarak tane yem oranının artırılmasının rumen sıvısı amonyak düzeyi üzerine farklı etkiler yarattığı (P<0,0001) (Çizelge 3.7) arpaya dayalı besleme ile tane yem oranı arttıkça rumen amonyak düzeyinin genel olarak düşüş gösterdiği, buğdaya dayalı beslemede ise tane yem oranı artışı ile birlikte rumen amonyak düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Grafik 3.15).

Çizelge 3.7. Hızlı Adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısı amonyak yoğunlundaki değişimler

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	Amonyak, mmol/L
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	11,53
		40	8,98
		60	9,92
	Buğday	20	10,87
		40	12,37
		60	12,55
SEM			0,37
SARA	Arpa	Hayır	10,09
		Evet	9,12
	Buğday	Hayır	12,59
		Evet	11,66
SEM			0,59
ANOVA			
Adaptasyon			
Tane Yem (TY)			0,0001
Tane Yem Oranı (TYO)			0,27
TY*TYO			0,0001
SARA			
Tane Yem (TY)			0,0001
Bakteri (B)			0,11
TY*B			0.98

Adaptasyon dönemi boyunca: Zaman etkisi, P<0,0001 olarak bulunmuştur.
SARA dönemi boyunca: Zaman etkisi, P<0,002 olarak bulunmuştur.



Grafik 3.15. Adaptasyon dönemi boyunca tane yem çeşidine ve oranına bağlı olarak amonyak düzeyindeki değişimler (TY x TYO interaksiyonu, P<0,0001).

Adaptasyon dönemi boyunca yemleme sonrası 4. saate göre 8. saatte alınan numunelerde amonyak düzeyi daha yüksek bulunmuştur (P<0,0001).

SARA döneminde de adaptasyon döneminde olduğu gibi rumen sıvısı amonyak düzeyleri arpaya dayalı tane yem ile beslemede (9,61 mmol/L) buğdaya dayalı beslemeye kıyasla (12,13 mmol/L) daha düşük seyretmeye devam etmiştir (P<0,0001) (Çizelge 3.3). SARA döneminde rumene *M. elsdenii* inokulasyonun rumen amonyak yoğunluğunu etkilemediği, bakteri inokulasyonu yapılmayan grupta amonyak düzeyinin (11,34 mmol/L), inokulasyon yapılan gruba (10,39 mmol/L) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.3). SARA dönemi boyunca rumen sıvısı amonyak düzeyi yemleme sonrası 4. saatte alınan numunelerde 8 saate göre daha yüksek bulunmuştur (P<0,002).

3.1.6. Rumen Sıvısı Protozoa Yoğunluğundaki Değişimler

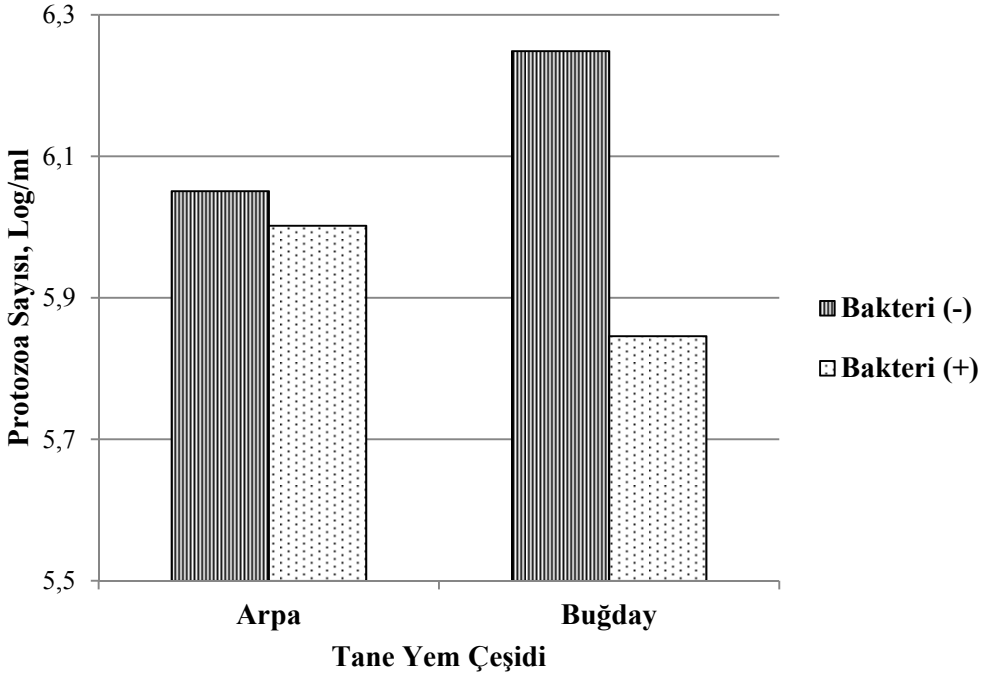
Hızlı adaptasyon dönemi boyunca rumen sıvısındaki logaritmik protozoa sayısının tane yem çeşidine göre farklılaştığı (P<0,001), buğdaya dayalı beslemede (5,98) arpaya dayalı beslemeye (5,81) göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tane yem oranının artışına bağlı olarak protozoa sayısının arttığı (P<0,0001), tane yem çeşidi ve tane yem oranı arasında da protozoa sayısı açısından bir interaksiyon olduğu belirlenmiştir (P<0,002). Adaptasyon dönemi boyunca her adaptasyon periyodunun 3. gününde 1. gününe göre (P<0,0001), yemlemeden sonraki 8. saatte alınan rumen sıvısı numunelerinde ise 4. saate göre (P<0,05) protozoa sayısı daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 3.8. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde rumen sıvısındaki protozoa sayıları

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	Log Protozoa Sayıları (ml)
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	5,52 (3,3 x 10^5)
		40	5,86 (7,2 x 10^5)
		60	6,18 (1,5 x 10^6)
	Buğday	20	5,75 (5,6 x 10^5)
		40	6,09 (1,2 x 10^6)
		60	6,12 (1,3 x 10^6)
SEM			0,05
SARA	Arpa	Hayır	6.05 (1.1 x 10^6)
		Evet	6.00 (1.0 x 10^6)
	Buğday	Hayır	6.25 (1.8 x 10^6)
		Evet	5.85 (7.1 x 10^5)
SEM			0,06
ANOVA			
Adaptasyon			
Tane Yem (TY)			0,001
Tane Yem Oranı (TYO)			0,0001
TY*TYO			0,002
SARA			
Tane Yem (TY)			0,716
Bakteri (B)			0,0001
TY*B			0,003

Adaptasyon dönemi boyunca: Gün etkisi, P<0,0001; Zaman etkisi, P<0,05; TYO x gün etkisi, P<0,007 olarak bulunmuştur.

SARA döneminde ise tane yem çeşidine bağlı olarak rumendeki protozoa sayılarının değişiklik göstermediği, bakteri inokulasyonu yapılan grupta (5,92 Log/ml) inokulasyon yapılmayan gruba (6,15 Log/ml) göre daha düşük protozoa sayısının olduğu tespit edilmiştir (P<0,0001). SARA döneminde bakteri inokulasyonunun protozoa sayısını 2. günden sonra arttırmaya meylettiği de belirlenmiştir.

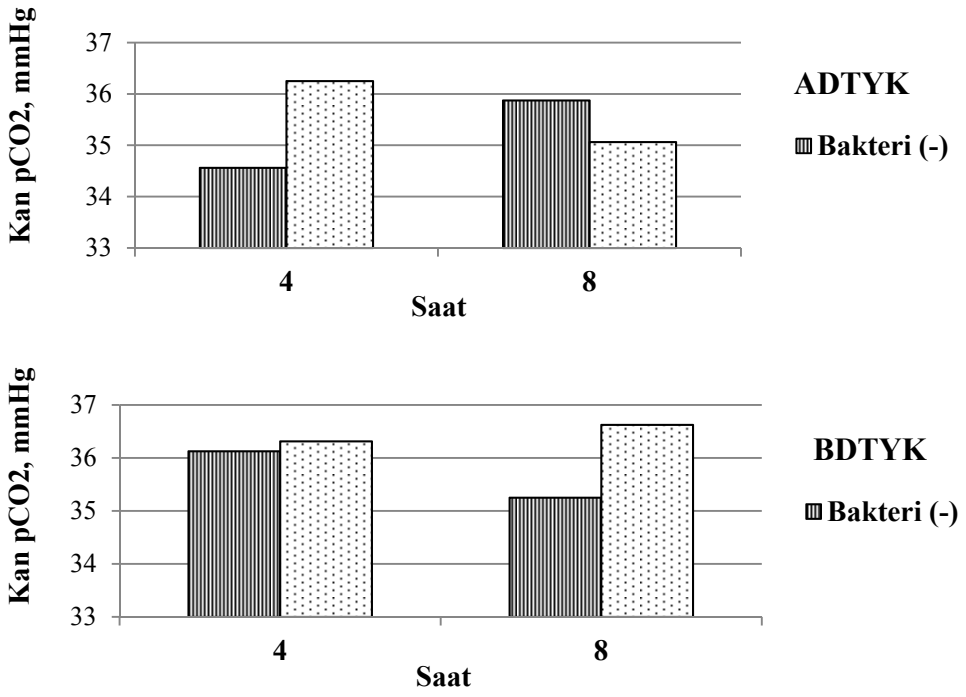


Grafik 3.16. SARA döneminde tane yem çeşidi ve bakterinin etkisine bağlı olarak protozoa sayısında gözlenen değişimler (TY x bakteri interaksiyonu, P<0,003).

3.1.7. Kan Parametrelerinde Belirlenen Değişimler

Hızlı adaptasyon döneminde kan pH'sının arpaya dayalı beslemede (7,47) buğdaya göre (7,45) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0,007) (Çizelge 3.9).

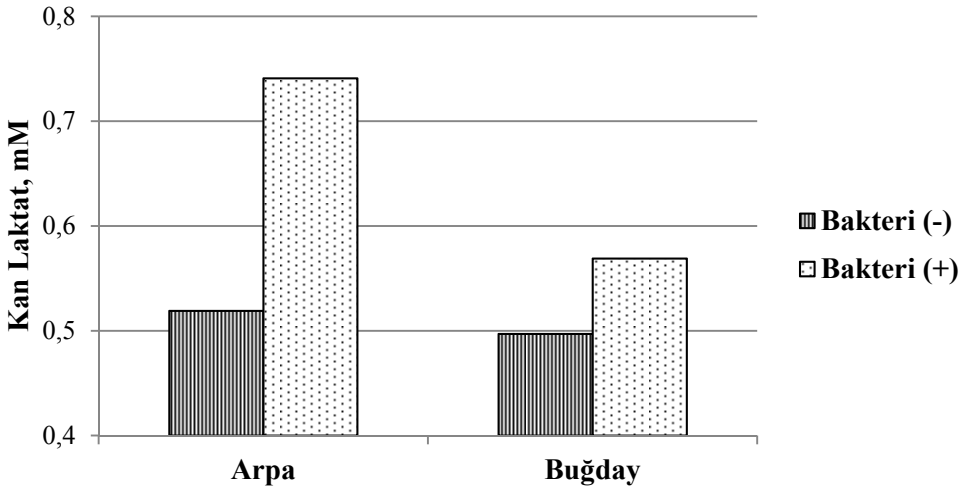
SARA döneminde de, tane yem çeşidine göre kan pH'sı farklılık gösterirken *M. elsdenii* inokulasyonun kan pH'sı üzerine etki etmediği tespit edilmiştir. Kan CO_2 düzeyinde adaptasyon dönemi boyunca tane yem çeşidine (P<0,002) bağlı olarak değişiklik gözlenirken tane yem oranının artışından etkilenmediği belirlenmiştir. SARA döneminde bakteri inokulasyonunun kan CO_2 düzeyine herhangi bir etkisi olmamıştır. Bakteri inokulasyonu kan CO_2 düzeyi üzerine tane yem çeşidine bağlı olarak numune alınan saatlere göre farklılık oluşturmuştur (TY x bakteri x zaman interaksiyonu, P<0,007) (Grafik 3.17). Kan Na ve Ca düzeyinde adaptasyon dönemi boyunca tane yem çeşidi (P<0,0001) ve tane yem oranının artışına (P<0,03 ve P<0,007) bağlı olarak değişiklik gözlenmekle birlikte, SARA döneminde bakteri inokulasyonunun kan Na ve Ca düzeyleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Kan K düzeyi üzerine hızlı adaptasyon döneminde tane yem ve tane yem oranının, SARA döneminde de bakteri inokulasyonunun herhangi bir etkisi olmamıştır (Çizelge 3.9).



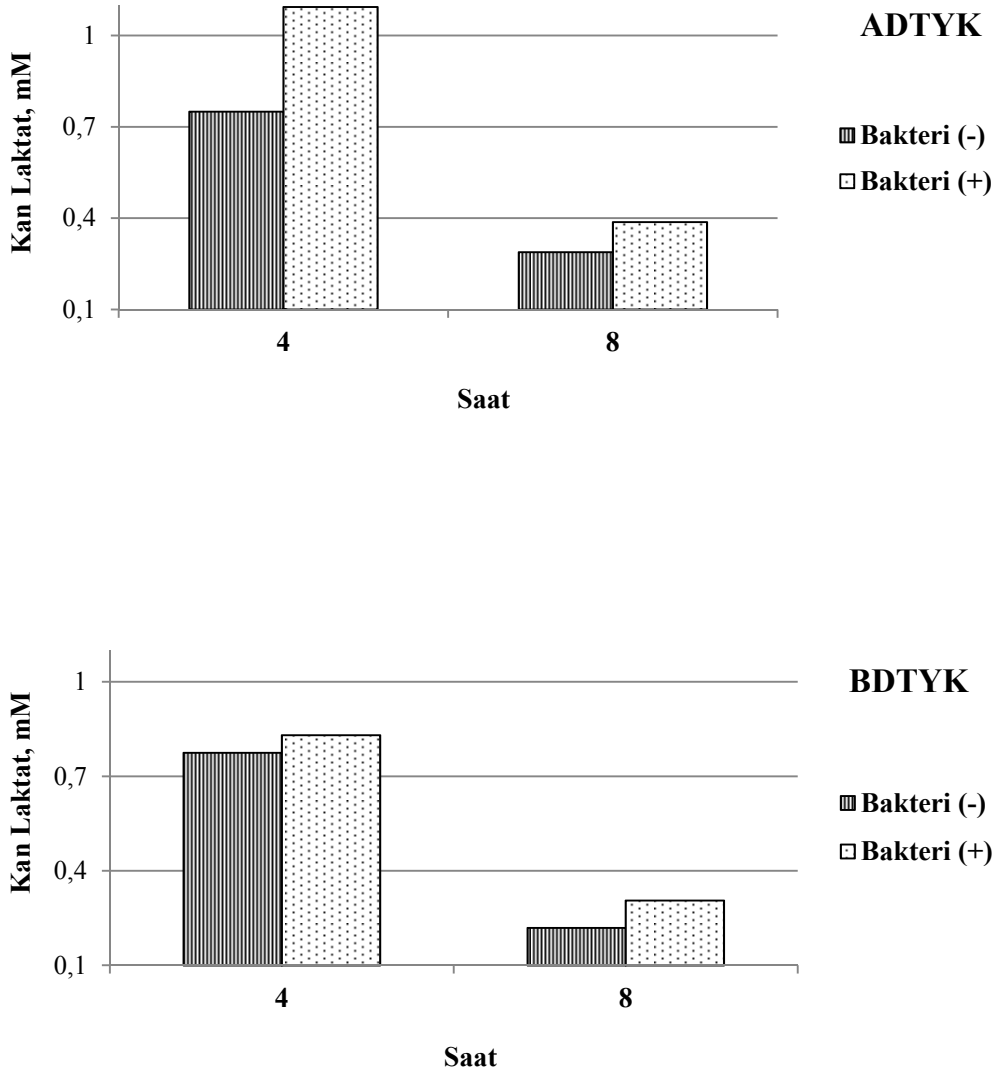
Grafik 3.17. SARA döneminde tane yem çeşidi, bakteri inokulasyonu ve numune alma zamanlarında kan CO_2 düzeyi üzerine gerçekleşen etkileşimler (TY x bakteri x zaman interaksiyonu, P<0,07).

Kan glikoz düzeyi hızlı adaptasyon döneminde buğdaya dayalı beslemeye (57,31 mg/dl) göre arpaya dayalı beslemede (61,23 mg/dl) daha fazla artmış (P<0,001), tane yem oranının artışı ile birlikte kan glikoz düzeyleri artış göstermiştir (P<0,02). Ayrıca adaptasyon döneminde kan glikoz düzeyi açısından tane yem çeşidi ile tane yem oranı arasında bir interaksiyon belirlenmiştir (P<0,047). SARA döneminde kan glikoz düzeyinin yine tane yem çeşidine göre değiştiği, *M. elsdenii* inokulasyonu ile birlikte (58,33 mg/dl) inokulasyon yapılmayan gruba (52,48 mg/dl) göre arttığı görülmektedir (P<0,0001) (Çizelge 3.9, 3.10).

Kan laktat düzeyi hızlı adaptasyon döneminde herhangi bir faktörden etkilenmezken, SARA döneminde arpaya dayalı besleme (0,63 mmol/L) ile karşılaştırıldığında buğdaya dayalı beslemeye göre (0,53 mmol/L) kan laktat seviyesinin daha yüksek olduğu (P<0,006) belirlenmiştir. *M. elsdenii* inokulasyonu ile birlikte (0,66 mmol/L) kan laktat düzeyinin inokulasyon yapılmayan gruba (0,51 mmol/L) göre arttığı görülmektedir (P<0,0001). SARA döneminde kan laktat seviyesi üzerine hem tane yem çeşidi ve bakteri arasında (P<0,03) hem de tane yem çeşidi, bakteri inokulasyonu ve numune alma zamanları arasında interaksiyon olduğu belirlenmiştir (P<0,05), (Grafik 3.18), (Grafik 3.19).



Grafik 3.18. SARA döneminde tane yem çeşidi arasında bakteri inokulasyonunun kan laktat düzeyi üzerine etkileri (TY x bakteri interaksiyonu, P<0,03)



Grafik 3.19. SARA döneminde tane yem çeşidi, bakteri inokulasyonu ve numune alma zamanlarında kan laktat düzeyi üzerine gerçekleşen etkileşimler (TY x bakteri x zaman interaksiyonu, P<0,05)

Çizelge 3.9. Hızlı adaptasyon ve SARA dönemlerinde kan parametrelerindeki değişimler

Deneme Dönemi	Tane Yem	Tane Yem Oranı/Bakteri İnokulasyonu	pH[1,4,7,8]	pCO_2[9,10,11,12], mmHg	Na[2,13,14], mM	K[15], mM	Ca[3,16,17], mM	Glikoz[4],mg/dl	Laktat[5,1 8,19,20,21,22,23], mM	Hematokrit[24], %	HCO_3, mM	BE[6,25], mmol/L
Hızlı Adaptasyon	Arpa	20	7,481	37,69	151,19	3,79	1,01	60,94	0,66	26,50	28,17	4,69
		40	7,468	39,44	150,06	3,76	1,06	59,75	0,56	26,31	28,58	4,87
		60	7,463	38,44	152,63	3,68	1,00	63,00	0,48	26,38	27,53	3,75
	Buğday	20	7,447	36,69	153,38	3,58	0,80	53,44	0,61	24,56	25,27	1,22
		40	7,458	36,63	153,31	3,79	0,97	59,31	0,56	25,63	25,96	2,09
		60	7,453	36,50	154,63	3,68	0,90	59,19	0,67	25,69	25,63	1,68
SEM			0,008	0,72	0,74	0,11	0,03	1,40	0,08	0,49	0,60	0,68
SARA	Arpa	Hayır	7,46	35,22	155,56	3,49	0,85	54,09	0,52	24,44	25,11	1,31
		Evet	7,47	35,66	154,00	3,58	0,89	59,66	0,74	26,22	25,96	2,30
	Buğday	Hayır	7,45	35,69	156,63	3,72	0,83	50,88	0,50	24,75	25,04	1,15
		Evet	7,45	36,47	155,19	3,64	0,88	57,00	0,57	26,34	25,38	1,38
SEM			0,006	0,49	0,90	0,07	0,03	1,27	0,04	0,29	0,43	0,48
ANOVA												
Adaptasyon												
Tane Yem (TY)			0,007	0,002	0,0001	0,53	0,0001	0,001	0,44	0,007	0,0001	0,0001
Tane Yem Oranı (TYO)			0,75	0,49	0,03	0,60	0,007	0,02	0,56	0,53	0,48	0,52
TY*TYO			0,23	0,46	0,66	0,50	0,20	0,047	0,24	0,33	0,69	0,59
SARA												
Tane Yem			0,044	0,20	0,21	0,04	0,43	0,02	0,006	0,45	0,45	0,27
Bakteri (B)			0,38	0,22	0,098	0,91	0,10	0,0001	0,0001	0,0001	0,17	0,21
TY*B			0,12	0,73	0,95	0,21	0,82	0,83	0,03	0,74	0,54	0,43

Adaptasyon dönemi boyunca: [1] TY x zaman etkisi, P<0,09; [2] Zaman etkisi, P<0,006; [3] TYO x zaman etkisi, P<0,09; [4] Zaman etkisi, P<0,10; [5] Zaman etkisi, P<0,0001; [6] TY x zaman etkisi, P<0,07 olarak bulunmuştur.

SARA dönemi boyunca: [7] Bakteri x gün etkisi, P<0,05; [8] TY x gün x zaman etkisi, P<0,067; [9] Gün etkisi, P<0,003; [10] TY x Bakteri x zaman etkisi, P<0,07; [11] Gün etkisi x zaman etkisi, P<0,06; [12] TY x gün x zaman etkisi, P<0,023; [13] TY x gün etkisi, P<0,062; [14] Bakteri x zaman etkisi, P<0,03; [15] Zaman etkisi, P<0,003; [16] Bakteri x zaman etkisi, P<0,07; [17] TY x bakteri x zaman etkisi, P<0,05; [18] Gün etkisi, P<0,0001; [19] TY x gün etkisi, P<0,002; [20] TY x Bakteri x zaman etkisi, P<0,05; [21] Gün x zaman etkisi, P<0,009; [22] TY x gün x zaman etkisi, P<0,036; [23] Bakteri x gün x zaman etkisi, P<0,088; [24] Gün etkisi, P<0,06; [25] Zaman etkisi, P<0,08 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.10. Deneme dönemlerinde tane yem karışımlarına ve bakteri inokulasyonuna bağlı olarak kan parametrelerinin grup ortalamaları

Deneme Dönemi	Tane Yem/Bakteri İnokulasyonu	pH	CO_2, mmHg	Na, mM	K, mM	Ca, mM	Glikoz, mg/dl	Laktat, mM	Hematokrit,%	HCO_3, mM	BE, mM
Hızlı adaptasyon	Arpa	7,471±0,005	38,52±0,42	151±0,4	3,74±0,07	1,02±0,02	61,23±0,81	0,57±0,04	26,40±0,28	28,09±0,35	4,44±0,40
	Buğday	7,453±0,005	36,60±0,42	154±0,4	3,68±0,07	0,89±0,02	57,31±0,81	0,62±0,04	25,29±0,30	25,62±0,35	1,67±0,40
SARA	Arpa	7,463±0,004	35,44±0,35	154±0,6	3,54±0,05	0,87±0,02	56,88±0,89	0,63±0,02	25,33±0,20	25,53±0,31	1,81±0,34
	Buğday	7,451±0,004	36,08±0,35	156±0,6	3,68±0,05	0,85±0,02	53,94±0,89	0,53±0,02	25,55±0,20	25,21±0,31	1,26±0,34
	Bakteri -	7,455±0,004	35,45±0,35	156±0,6	3,61±0,05	0,84±0,02	52,48±0,89	0,51±0,02	24,59±0,20	25,08±0,31	1,23±0,34
	Bakteri +	7,460±0,004	36,06±0,35	155±0,6	3,61±0,05	0,89±0,02	58,33±0,89	0,66±0,02	26,28±0,20	25,67±0,31	1,84±0,34

3.1. *İn Vitro* Deneme

Test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası farklı düzeylerdeki *M. elsdenii* inokulasyonun sonuçları incelendiğinde; inokule edilen 3 farklı bakteri düzeyinin pH, laktik asit birikimi ve gaz oluşum düzeyleri üzerine etki etmediği görülmektedir. M. *elsdenii*'nin 7 cfu ml^{-1} seviyesinde inokule edilmesiyle *in vitro* ortamın amonyak oluşum değerleri daha yüksek (8,05 mmol/L) olarak belirlenmiştir (P<0,002) (Çizelge 3.11).

İn vitro denemede, pH, amonyak, laktik asit birikimi ve gaz oluşum değerleri 4, 8, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlarda alınan numunelerde farklılık göstermesine (P<0,0001), rağmen farklı bakteri düzeyleri ile zaman arasında pH, amonyak yoğunluğu, laktik asit birikimi ve gaz oluşum değerleri açısından interaksiyon gözlenmemiştir.

Çizelge 3.11. *İn vitro* ortamda test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası *M. elsdenii* inokulasyon düzeyine bağlı olarak gerçekleşen değişimler

Bakteri, cfu* ml^{-1}	pH	Amonyak, mM	Laktik Asit, mM	Ortalama Gaz, ml
0	5,81	6,70	0,37	240,00
5	5,78	6,76	0,36	238,90
6	5,77	7,26	0,32	245,94
7	5,81	8,05	0,38	244,23
SEM	0,07	0,37	0,08	13,39
ANOVA				
Bakteri (B)	0,90	0,002	0,36	0,97
Zaman (Z)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
B*Z	1,00	0,87	0,85	1,00

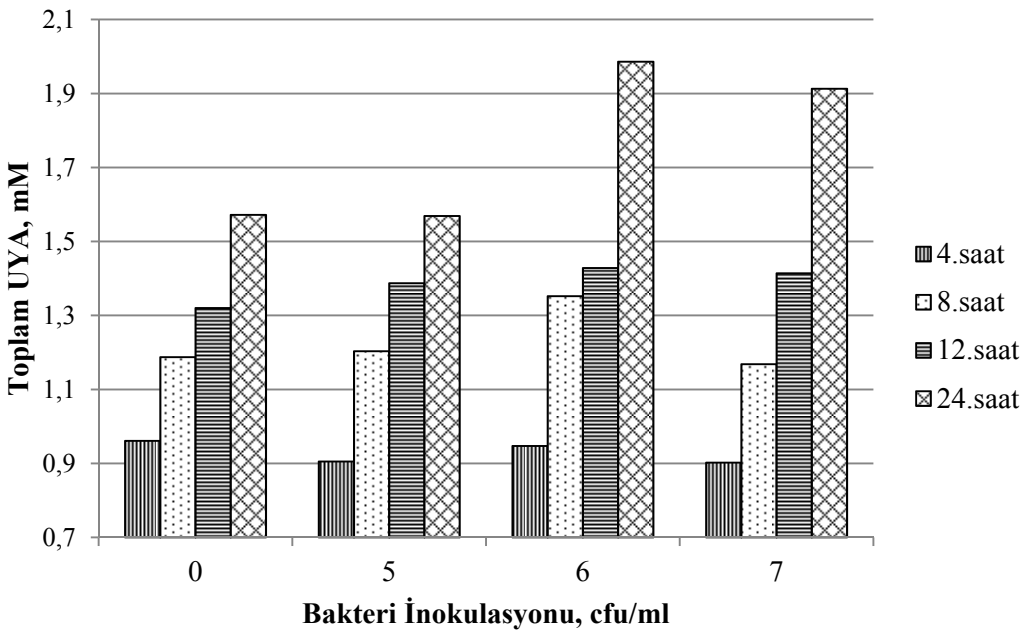
*Cfu: Colony-forming unit
SARA oluşturabilen test diyeti (25g/L) ve farklı bakteri dozajlarının inokulasyonu sonrası gerçekleşen değişimler.

Çizelge 3.12. Test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası *M. elsdenii* inokulasyon düzeyine bağlı olarak UYA parametrelerindeki değişimler

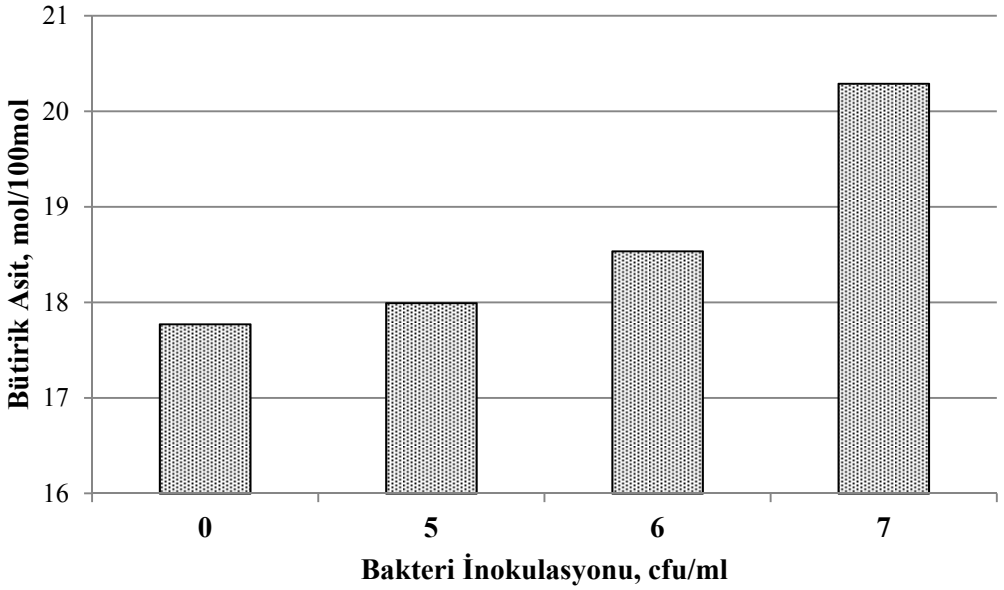
Bakteri, cfu ml^{-1}	Asetik Asit*	Propiyonik Asit*	İzobütirik Asit*	Bütirik Asit*	İzovalerik Asit*	Valerik Asit*	Toplam UYA*	As/Pr
0	57,74	18,83	1,38	17,94	1,57	2,55	1,29	3,12
5	57,68	18,06	1,45	17,77	1,67	3,45	1,31	4,07
6	58,51	17,53	1,28	18,54	1,55	2,59	1,42	3,39
7	56,67	17,4	1,35	20,29	1,56	2,72	1,33	3,34
SEM	0,62	0,46	0,24	0,55	0,13	0,36	0,06	0,39
ANOVA								
Bakteri (B)	0,26	0,1	0,97	0,006	0,93	0,27	0,41	0,38
Zaman (Z)	0,13	0,78	0,89	0,17	0,61	0,08	0,0001	0,37
B*Z	0,52	0,43	0,31	0,77	0,45	0,5	0,34	0,24

*mol/100 mol

Farklı düzeylerdeki *M. elsdenii* inokulasyonunun *in vitro* ortam UYA düzeyleri üzerine etkileri Çizelge 3.12'de verilmiştir. Bütirik asit oranı üzerine bakteri inokulasyonun etkili olduğu ($P<0,006$). 7 cfu ml^{-1} düzeyinde bakteri inokule edildiğinde en yüksek bütirik asit düzeyine ulaşıldığı belirlenmiştir. Diğer UYA parametreleri üzerine bakteri inokulasyonunun etki etmediği tespit edilmiştir. Farklı inkübasyon saatlerinde alınan numunelerde valerik asit oranı ile toplam UYA düzeyinin zamana bağlı olarak değiştiği. inkübasyon saatinin ilerlemesiyle toplam UYA düzeyinin arttığı gözlenmiştir. Zaman ile bakteri düzeyleri arasında UYA parametreleri açısından herhangi bir etkileşim belirlenmemiştir.



Grafik 3.20. Farklı düzeylerdeki bakteri inokulasyonunun inkübasyon saatlerine bağlı olarak toplam UYA yoğunluğu üzerine etkileri



Grafik 3.21. Farklı düzeylerdeki bakteri inokulasyonunun bütirik asit oranı üzerine etkileri. (P<0,006).

4. TARTIŞMA

4.1. Yem tüketimi üzerine etkiler

Subakut asidozisin gözlenebilen en önemli belirtilerinden biri, yem tüketimindeki azalmadır. Kolay fermente olabilen karbonhidratları yüksek düzeyde bulunduran tane yemlerin tüketimindeki artışın rumen pH'sında düşüşe sebep olması yem tüketimini de azaltmaktadır. Arpa-buğday karışımı ile SARA oluşturulan süt ineklerinde kuru madde tüketiminin azaldığı (Gozho ve ark 2005, 2006), yonca peleti ve kuru yonca ile oluşturulan SARA durumunda ise kuru madde tüketiminin etkilenmediği (Khafipour ve ark 2007) belirlenmiştir. Yem tüketiminde günler arasında gözlenen dalgalanmaların da asit üretimini artıran yemlere bağlı olduğu ve SARA'nın belirtisi olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (Stock ve ark 1995, Bevans ve ark 2005). Bu çalışmada, kuru madde tüketimi açısından tane yem çeşitleri arasında fark gözlenmezken her iki tane yemin oranlarının artırılması ile birlikte kuru madde tüketiminin azalmaya meylettiği tespit edilmiştir. Rasyonda yaklaşık %80 oranında tane yem kullanılmasıyla kuru madde tüketiminin değişmediği (Krehbiel ve Burciaga-Robles 2010), arpa ve buğday gibi asit üretimini artıran yem maddelerinin kuru madde tüketiminin %50'si düzeyine kadar yedirilmesiyle hayvanların üretilen aşırı asidi tolere edebildikleri ve kuru madde tüketimini değiştirmedikleri (Rustomo ve ark 2006) belirtilmektedir.

Koyun ve sığırlarda deneysel olarak asidozis oluşturularak, asidozis sonucunda ortaya çıkan ruminal ve sistemik değişiklikler ile ilgili bilgiler elde edilmektedir. SARA modelleri oluşturulurken çeşitli metotlar denenmiş, pH'nın SARA için istenen seviyeye düşürülmesiyle birlikte yem tüketiminin korunması kriter olarak alınmıştır (Keunen ve ark 2002). Nem oranı yüksek mısırın kullanılması halinde hayvanların yemi tüketmeyi reddetmesi ya da mısırın rumen pH'sını düşürme yeteneğinin yetersiz olması nedeniyle deneysel SARA oluşturulamadığı, bu nedenle mısırın SARA modelleri için uygun bir yem maddesi olmadığı bildirilmiştir. Arpa ve buğday karışımlarının rumende yıkımlanma hızlarının yüksek olması nedeniyle rumen pH'sındaki düşüşü uzun süre devam ettirebilecekleri, dolayısıyla SARA modellerinde uygun yem maddeleri oldukları belirtilmektedir (Keunen ve ark 2002). Gün içerisinde gözlenen kısa süreli dalgalanmaların dışında rumen ortamında hayvan tarafından hissedilebilecek kadar ciddi bir fizyolojik değişiklik olduğu zaman

hayvanlar yem tercihlerini değiştirebilmektedirler. Pek çok araştırıcı koyunların yem tercihi özelliklerinin rumen asidozisini hafifletmeye yardımcı olduğunu bildirmektedir (Cooper ve ark 1995, Phy ve Provenza 1998a, 1998b). Ayrıca yüksek düzeyde tane yem içeren rasyonların verilmesinden sonra yem tüketimini azaltarak rasyona adapte olan hayvanların daha sonraki günlerde yem tüketimini artırmaya meylettikleri bildirilmektedir (Fulton 1979a). Mısıra dayalı yemlerle beslenen hayvanlarda yem tüketimi artarken, buğdaya dayalı yemlerle beslenen hayvanlarda yem tüketiminin azaldığı bildirilmektedir (González ve ark 2012).

Kaba yeme adapte edilmiş hayvanlara verilen yemlerin asit oluşturma kapasitesi arttıkça hayvanlar rumen pH'sındaki düşmeyi tolere edebilmek ve zararlı etkilerinden korunabilmek için yem tüketimini azaltmaya yönelmektedirler. Rumen pH'sı düzenlendikten sonra hayvan yem tüketimini tekrar artırmakta, yem tüketimindeki bu dalgalanmalar periyotlar halinde devam edebilmektedir (González ve ark 2012). Hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklar nedeniyle rumenin mikrobiyel populasyonu, üretilen tükrük miktarı ve üretilen asitlerin rumen epitelinden emilim düzeyi değişmektedir. Bazı fizyolojik ve davranışsal özelliklere bağlı olarak asidozise sebep olan rasyon faktörlerine hayvanların verdikleri cevaplar farklılaşmakta ve yem tüketiminde bireysel farklılıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Schwarzkopf-Genswein ve ark 2003). Denemenin arpaya dayalı tane yem karışımının kullanıldığı hızlı adaptasyon döneminin başlangıcında genelde 3 hayvanda gözlenen kuru madde tüketimindeki azalma 4 günlük SARA döneminin 2. gününden itibaren ortadan kalkmıştır. Buğdaya dayalı tane yem karışımının kullanıldığı denemede ise adaptasyon döneminin başlangıcında 5 hayvanda kuru madde tüketiminde azalma gözlenmiştir. Buğday tüketiminin artırılmasıyla birlikte kuru madde tüketiminin 3 hayvanda normal seviyeye yükseldiği, yine SARA döneminin 2. gününden itibaren kuru madde tüketimindeki azalmanın tamamen ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu durum hayvanların yeme alıştıklarının ve alışmaya bağlı olarak yem tüketimindeki varyasyonun azaldığının bir göstergesidir (Nocek ve ark 2002). Benzer şekilde tane yem içeriği yüksek yemlere adapte edilmiş hayvanlarda rumen pH'sı düşmesine rağmen hayvanların yüksek yem tüketimini devam ettirebildikleri gözlenmektedir (Beauchemin ve ark 2003).

Buğdaya dayalı olarak beslenen hayvanlarda yem tüketiminin birkaç gün içerisinde düştüğü, ancak hayvanların yem tüketimini azaltarak rumendeki asit yükünü hafifletemedikleri, rumen pH'sı 5,6'nın üzerine çıktığı zaman yem tüketiminin tekrar normale döndüğü belirlenmiştir (Fulton ve ark 1979b, Nocek ve ark 2002). Bu nedenle subklinik asidozisle ilişkili yem tüketimindeki azalmayı en aza indirebilmek için rumen pH'sının 5,6'nın üzerinde korunabilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada da 4 günlük SARA döneminin ilk gününde 5,6'nın altında olan rumen pH'sı daha sonraki günlerde 5,6'nın üzerinde seyrederek kuru madde tüketiminin tekrar normale dönmesini sağlamıştır. Her iki tane yem karışımının oranı arttıkça rumen pH'sının önemli ölçüde düşmesi (Çizelge 3.2 ve Grafik 3.1) hayvanların asidotik olmasına ve kuru madde tüketimlerinin azalmasına neden olmuştur.

Toplam uçucu yağ asidi konsantrasyonunun en yüksek olduğu durumda bile yem tüketiminin devam ettiği (Tremere ve ark 1968), bu nedenle laktik asidin yem tüketimi üzerine çok güçlü bir baskılayıcı etki oluşturduğu ifade edilmiştir. SARA durumunda ise rumendeki laktik asit seviyesi çok düşük olduğu için yem tüketiminde gözlenen dalgalanmalar UYA'nın yüksek düzeyde üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Koers ve ark 1976, Slyter 1976, Burrin ve Britton 1986, Owens ve ark 1998, Soto-Navarro ve ark 2000). Akut asidozis durumunda ise, rumende laktik asit seviyesinin artmasıyla pH'nın düştüğü ve yem tüketiminin kesildiği (Tremere ve ark 1968, Koers ve ark 1976) bildirilmiştir. Laktik asidin retikülo-rumen motilitesi üzerine doğrudan etki etmediği (Smith ve ark 1979), yem tüketimini azaltmadığı (Fulton ve ark 1979a) ve SARA durumunda rumende konsantrasyonunun çok düşük olduğunu (Mackie ve Gilchrist 1979, Britton ve Stock 1986, Owens ve ark 1998, Ghorbani ve ark 2002) belirten yayınlar göz önüne alındığında, çok düşük miktarlarda tespit edilen laktik asidin (Çizelge 3.6) kuru madde tüketimi üzerine etki etmediği düşünülmektedir. Rumen pH'sında gözlenen dalgalanmaların kuru madde tüketimindeki değişikliklerle doğrudan ilişkili olmadığı yönünde bilgiler (Ghorbani ve ark 2002) de bulunmaktadır. Rumen pH'sındaki düşüşün rumen ozmolaritesini artırarak Gram (-) bakterilerin parçalanmasına (Plaizier ve ark 2009) ve lipopolisakkaritlerin oluşumuna neden olarak kuru madde tüketimini olumsuz etkilemesi (Allen 1997, Campbell 2010) ihtimali de bulunmaktadır. Rasyonda arpanın miktarı artırıldığında (Emmanuel ve ark 2008) veya konsantre yemler 6 kg'dan fazla kullanıldığında (Andersen ve ark 1994)

endotoksin miktarının arttığı ve yem tüketiminin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak endotoksin seviyesinin başka faktörlerin etkisi altında olduğu, bu nedenle hızlı adaptasyon sırasında her zaman yüksek olmayabileceği de bildirilmiştir (Allen 1997). Tane yemle SARA oluşturulduğunda farklı organlardaki yangıya bağlı olarak yem tüketiminin baskılandığı da bildirilmektedir (Andersen ve ark 2000).

Kuru madde tüketimi ile ortalama rumen pH'sı arasında ilişki olduğu, rumen pH'sındaki düşme ile birlikte kuru madde tüketiminin azaldığı (Fulton ve ark 1979a, 1979b, Brown ve ark 2000) bildirilirken, rumen pH'sı ve kuru madde tüketimi arasında negatif bir ilişki olduğu da bildirilmektedir. Kuru madde tüketimi düştüğü için rumende fermentasyon için daha az substrat bulunması rumen pH'sında artışa neden olabilmektedir (Schwartzkopf-Genswein ve ark 2003).

Rumene propiyonik asit verildiğinde tokluk hissinin artmasıyla birlikte öğün sayısı ve her öğünde tüketilen yem miktarı dolayısıyla kuru madde tüketimi azalmaktadır (Allen ve ark 2005). *Megasphaera elsdenii* inokulasyonu ile birlikte kuru madde tüketiminde gözlenen düşüşün ($P<0,09$) (Çizelge 3.1) fermentasyonda propiyonik aside doğru gelişen değişime bağlanmaktadır (Çizelge 3.4). SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonunun pH'yı 5,6'nın üzerine çıkaramaması nedeniyle düşük pH'nın yem tüketimi üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortadan kalkmamasına dolayısıyla olumlu bir etkisinin görülmemesine neden olabileceği de düşünülmektedir.

4.2. Rumen fermentasyonu üzerine etkiler

İn vitro çalışmalarda fermentasyon son ürünlerinin emilmemesi ve ortamda birikmesi ya da parçalanması nedeniyle *in vivo* denemeye göre farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Menke ve ark 1979). Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* denemeler arasında sonuçların farklılık göstermesi normal olarak değerlendirilmelidir. Bu araştırmanın *in vitro* deneme bölümünde test diyeti ile oluşturulan SARA sonrası üç farklı düzeyde ortama verilen *M. elsdenii* inokulantının etkilerine bağlı olan sonuçlar incelendiğinde; test edilen çoğu parametrenin *M. elsdenii* inokulasyonu sonrası etkilenmediği belirlenmiştir. Ancak bakteri düzeyinin artması ile birlikte rumen sıvısı amonyak ve bütirik asit düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. *İn vitro* fermentasyon ortamına *M. elsdenii* inokulasyonunun asetik ve propiyonik asit üretimini azalttığı,

bütirik asiti artırdığı (Marounek ve ark 1989, Slyter ve ark 1992, Kung ve ark 1995) bildirilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da bakteri inokulasyonu bütirik asit üretiminde artışa neden olmuştur. Farklı bakteri seviyelerinin pH, laktik asit birikimi ve gaz oluşum düzeylerine etkilerinin gözlenmemiş olması, fermentasyon son ürünlerinin emilmemesi ve ortamda fazlaca birikmesi sonucu bakterilerin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli ortamın sağlanamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kaba-konsantre yem oranı artacak şekilde hazırlanan *in vitro* rumen ortamına prebiyotik madde olarak farklı düzeylerde inülin ve laktuloz ilavesinin gaz üretimi ile UYA ve laktik asit gibi parametrelerde belirgin değişiklikler oluşturmaması (Hayırlı ve ark 2010, Umucalılar ve ark 2010) bu görüşleri doğrular niteliktedir.

4.2.1. pH üzerine gerçekleşen etkiler

Ruminantlarda yüksek düzeyde konsantre yemle beslemeye bağlı olarak ortaya çıkan bir beslenme bozukluğu olan SARA'nın teşhisinde rumen pH'sının takibi oldukça önemlidir (Garrett ve ark 1999, Enemark ve ark 2004). Normal pH elektrotları ile ölçülen anlık rumen pH'sının 6,25 ve 5,5 (Sauvant ve ark 1999); 5,0 ve 5,6 (Nagaraja ve Titgemeyer 2007); 5,0 ve 5,8 (Beauchemin ve Yang 2005) veya 5,0 ve 5,5 (Enemark ve ark 2002, Krause ve Oetzel 2006) arasında olması, pH'nın 5,8'in altına düşmesi (Nordlund ve Garrett 1994) ya da pH'nın ortalama 5,5 seviyesinde (Garrett ve ark 1999, Kleen ve ark 2003, Enemark ve ark 2004) olması durumunda subakut asidozis olarak değerlendirilebileceği şeklinde çok farklı tanımlamalar yapılmaktadır. Ancak hayvanlarda herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmeksizin rumen pH'sının 24 saatlik periyotta pek çok kez belirtilen SARA sınırlarına kadar düştüğü bilinmektedir. Numune alınan 12 ineğin 3 tanesinden fazlasında anlık rumen pH'sının 5,5'in altında olması durumunda sürünün SARA (+) olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (Oetzel 2003). Rumen pH'sının 5,0'e yaklaşması veya altına inmesi halinde laktik asit kullanan bakterilerin gelişmesinin inhibe olmasıyla subakut asidozis akut asidozise dönüşebilmektedir (Nagaraja ve Titgemeyer 2007).

Bu araştırmada arpa ve buğdaya dayalı tane yem karışımlarındaki her %20'lik artış rumen pH'sında düşüşe sebep olmuştur. Deneme sonuna kadar gün boyunca yemlemeden önce ve yemleme sonrası ikişer saatte bir olmak üzere ölçülen pH

değerlerinde de dalgalanmalar olduğu belirlenmiştir. Rumen pH'sı, fermente olabilen karbonhidratların tüketimi, oluşan asitlerin kullanımı ve emilimi ile tampon maddelerin salgılanmasına bağlı olarak değişmekte ve gün içerisinde dalgalanmalar göstermektedir (Keunen ve ark 2002). Hayvanlar genelde geceleri ruminasyon yapmalarından dolayı fazla miktarda tükürük üretmektedirler. Tükrükte bulunan bikarbonatın (Owens ve ark 1998), etkisi ile sabah yemleme öncesi ölçülen pH değerleri yüksek olmakta, yemleme sonrası ise hızla düşüşe geçmektedir (Schwartzkopf-Genswein ve ark 2003, Stone 2004). Her adaptasyon periyodunun 3.gününde rumen pH'larının daha düşük olması, tane yem oranının artmasına bağlı olarak nişastayı kullanan bakterilerin sayısının artması ve tane yem tüketiminin pH üzerine baskılayıcı etkisinin şiddetlenmesi ile açıklanabilir. Yüksek düzeyde arpa içeren rasyonlarla besleme neticesinde rumen pH'sının 6,06-5,71 arasında seyrettiği (Beauchemin ve ark 2001, Koenig ve ark 2003, Bevans ve ark 2005) belirtilmektedir. Bu çalışmada da adaptasyon döneminde arpaya ve buğdaya dayalı tane yem karışımı ile %60 oranında besleme durumunda ortalama pH 5,75 ve 5,85 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2). SARA döneminde, arpaya dayalı tane yem karışımı ile beslenildiğinde rumen pH'sının 5,56; buğdaya dayalı tane yem karışımı ile beslenildiğinde ise 5,62 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.3). Yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde tane yemle oluşturulan SARA'da en düşük pH'nın 5,8-5,0 (Beauchemin ve Yang 2005) ya da 5,0-5,6 (Nagaraja ve Titgemeyer 2007) arasında olması, bu çalışmada elde edilen 5,56 ve 5,62 değerlerinin normal sınırlar içerisinde bulunduğunu göstermektedir. Hayvanlar arasında rumen pH'sında gözlenen farklılıklar, tükrük üretimi, UYA emilim oranı, rumenden sıvıların geçiş oranı ile UYA metabolizmasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Tafaj ve ark 2006). Yüksek düzeyde konsantre yem ile besleme sonucunda hayvanlar arasında rumen pH'sında gözlenen varyasyonlara (Brown ve ark 2000, Bevans ve ark 2005, Penner ve ark 2009) bu çalışmada da rastlanmıştır. Adaptasyon uygulanmış olmasına rağmen arpa ve buğdaya dayalı olarak beslenen hayvanlarda pH'da belirlenen varyasyonların hayvanlardaki UYA emilimindeki farklılıklardan ve rumen pH'sını düzenlemek için bazı hayvanların bireysel yeteneklerinin olmasından (Bevans ve ark 2005) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SARA'da rumen pH'sındaki düşmenin toplam UYA'daki artıştan kaynaklandığı (Goad ve ark 1998, Khafipour ve ark 2009a, 2009b) bildirilmekle birlikte, farklı tane yem kaynakları kullanılarak oluşturulan SARA'da rumen pH'sında gözlenen düşüşün bütirik asit düzeyinin artması ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Harmon ve ark 1985, Doreau ve ark 2001, Brossard ve ark 2004). Adaptasyon döneminde tane yem oranının artışı ile birlikte pH'da gözlenen düşüş bütirik asit oranındaki artışa bağlanmaktadır. Ayrıca toplam UYA'nın tane yem oranının %40 ve %60'a çıkarılmasıyla özellikle 3. gün artış göstermesi pH değerlerine de yansıyarak pH'da düşüşe neden olmuştur.

Rumende bulunan laktik asit kullanan bir bakteri olan *M. elsdenii'*nin kültürlerde çoğalması için gereken optimum pH'nın 6,1-6,6 arasında olduğu, ortamda glikoz kullanılması durumunda ise en düşük pH aralığının 4,4-4,8 olduğu, bu nedenle yüksek oranda nişasta tüketen hayvanlarda rumendeki asitliğin bakteri üzerine olumsuz etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Therion ve ark 1982). Bununla birlikte rumen pH'sının 5,2'nin altına düşmesi ile laktik asit kullanan bakterilerin gelişmesinin inhibe olacağına ve subakut asidozisin akut asidozise dönüşebileceğine dair görüşler de bulunmaktadır (Owens ve ark 1998, Krause ve Oetzel 2006, Nagaraja ve Titgemeyer 2007). Arpa ve buğdaya dayalı tane yem ile oluşturulan SARA'da *M. elsdenii* inokulasyonunun rumen pH'sı üzerine olumlu etkisinin olmadığı, ancak ikinci gün yapılan inokulasyon ile birlikte SARA döneminin 4. gününe doğru pH'nın yükselmeye başladığı dikkat çekmektedir. Yüksek düzeyde tane yem içeren rasyonlara adapte edilmiş hayvanlarda direkt yedirilen mikroorganizmaların öğünleri takiben pH'daki düşmeyi azalttığı bildirilirken (Williams ve ark 1991), rasyona direkt yedirilen mikroorganizma ve maya ilave edilmesinin belirgin bir etki oluşturmadığı da ifade edilmektedir (Beauchemin ve ark 2003). Greening ve ark (1991) SARA oluşturulmuş hayvanlarda *M. elsdenii* inokulasyonunun minimum rumen pH'sını ve laktik asit konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirilirken, *M. elsdenii* inokulasyonun rumen pH'sına etkisinin olmadığı da belirtilmektedir (Zebeli ve ark 2012).

4.2.2. Rumen uçucu yağ asiti düzeyleri üzerine gerçekleşen etkiler

İn vivo ortamda tüketilen yem maddelerine, *in vitro* ortamda ise kullanılan substrata bağlı olarak mikroorganizma çeşitliliği, değişen mikroorganizma çeşitliliğine bağlı olarak da üretilen uçucu yağ asidi çeşidi ve oranı değişkenlik göstermektedir. Yüksek düzeyde konsantre yem içeren rasyonla besleme sonrası rumen duvarının iyon değişim geçiş aktivitesinin artması ile rumenden UYA emilimi artmaktadır (McLeod ve Baldwin 2000). Adaptasyon döneminde %60 oranına kadar arpa ve buğdaya dayalı beslemede toplam UYA konsantrasyonunun tane yem çeşidine bağlı olarak farklılık göstermemesi arpa ve buğdayın yıkımlanma hızlarının benzer olduğunu göstermektedir. Buğdayın 4 ve 8 saat sonunda %47,6 ve 61,3'ü rumende yıkımlanırken, arpanın aynı saatlerde %42,3 ve 58,3'ünün yıkımlandığı belirlenmiştir (Umucalılar ve ark 2002). Rumen ortamında bulunan fermente edilebilen substrat miktarı ile bu substratların yıkımlanma oranına bağlı olarak özel bir mikroorganizma grubunun faaliyet göstermesi nedeniyle UYA konsantrasyonu yemleme sonrası değişiklik gösterebilmektedir. Uçucu yağ asitleri düzeylerinin zamana bağlı olarak değişmesi mikrobiyel fermentasyonun da zamana bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Nitekim toplam UYA düzeyinin sabah yemlemesinden 4 saat sonra alınan numunelerde 8. saate göre daha yüksek bulunmuştur. Arpaya dayalı beslemede 1. gün, buğdaya dayalı beslemede ise 3. gün toplam UYA düzeyinin yüksek çıkması (Grafik 3.5) bu görüşü doğrular niteliktedir.

Bu çalışmanın adaptasyon döneminde olduğu gibi tane yem oranının artışı ile birlikte asetik asit oranının azaldığı (Hungate 1966, Penner ve ark 2007, Penner ve ark 2009), bütirik asit oranının arttığı (Horn ve ark 1979, Harmon ve ark 1985, Burrin ve Britton 1986, Penner ve ark 2007, Steele ve ark 2009) ve toplam UYA düzeylerinin etkilenmediği (Zebeli ve ark 2008, Penner ve ark 2009) bildirilmiştir. *Streptococcus bovis* gibi bakteriler ortam pH'sı yüksek olduğu zaman nişastayı asetik asit, formik asit ve etanole dönüştürmektedir (Asanuma ve ark 1999). Rumen pH'sı 5,5'e düştüğü zaman propiyonik asit en yüksek konsantrasyona ulaşmakta, pH azaldıkça fermentasyon son ürünü propiyonik asitten laktik aside doğru değişmektedir (Nocek 1997). Tane yem oranının artışıyla birlikte rumen pH'sının düşmesi (Çizelge 3.2) fibrolitik bakterilerin sayısının azalmasına neden olarak

selüloz sindirimini dolayısıyla asetik asit oranını azaltmaktadır (Calsamiglia ve ark 2008).

Adaptasyon döneminde tane yem oranının artmasıyla birlikte epitel büyümesini teşvik eden propiyonik ve özellikle de bütirik asit oranının artmasının (Flatt ve ark 1958, 1959, Blanch ve ark 2009, Penner ve ark 2009, Steele ve ark 2012), rumen epitelindeki bariyer fonksiyonların (Sakata ve Tamate 1978) ve metabolitlerin rumen duvarından geçiş miktarlarının daha iyi düzenlenmesini (Ingvartsen 2006, Penner ve ark 2011, Martens ve ark 2012) ve emilim kapasitesinin artmasını sağlayarak SARA oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Propiyonik ve bütirik asidin bu etkisi, rumen mukozasındaki uçucu yağ asitlerinin metabolize olmasına (Sander ve ark 1959), mukozadaki kan akışı üzerine uçucu yağ asitlerinin (Fell ve Weekes 1975) ya da bütirik ve propiyonik asidin insülin sekresyonu üzerine dolaylı etkilerine (Anderson ve ark 1999) bağlanmaktadır.

Yüksek düzeyde konsantre yem kullanılarak yapılan çalışmalarda uçucu yağ asitleri ile ilgili sonuçlar çoğunlukla birbirini desteklemekle birlikte toplam UYA konsantrasyonu ile propiyonik asit oranının arttığını, asetik ve bütirik asit oranlarının azaldığını bildiren çalışmalar da (Brown ve ark 2000, Krause ve Oetzel 2006) bulunmaktadır. Buğdaya dayalı rasyonla (%60) besleme ile oluşturulan SARA durumunda toplam UYA konsantrasyonunun yükseldiği, asetik asit oranı ile asetik asit/propiyonik asit oranının azaldığı, bütirik asit oranının arttığı belirlenmiştir (Brossard ve ark 2004). Bu çalışmada da %60 oranında buğdaya dayalı tane yem karışımının yedirilmesiyle toplam UYA ile asetik asit ve bütirik asit oranlarında belirlenen değişiklikler belirtilen araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir.

Yapılan araştırma sonuçları genel olarak dikkate alındığında, konsantre yemlerin özellikle propiyonik ve bütirik asit konsantrasyonları üzerine farklı etkilerde bulunduğu söylenebilir. Rumendeki protozoa sayısındaki artışın laktik asit birikimini azaltarak bütirik asit üretimini teşvik ettiği (Brossard ve ark 2004), protozoa sayısı azaldığı zaman bütirik asit oranının da azaldığı (Eugene ve ark 2004) tespit edilmiştir. Tane yem oranının artmasıyla birlikte bütirik asit oranındaki artışın protozoa sayısındaki artışla (Çizelge 3.8) ilişkili olabileceği, SARA durumunda inokule edilen *M.elsdenii'*nin protozoa sayısı üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı, belki de bütirik asit oranının azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Megasphaera elsdenii substrat olarak laktik asidi glikoza tercih etmekte (Hino ve ark 1994), laktik asidin %77'sini akrilat yoluyla propiyonik aside dönüştürmektedir. Bu araştırmada her iki tane yem karışımı ile oluşturulan SARA dönemlerinde *M. elsdenii* inokulasyonunun propiyonik asit oranını artırıp bütirik asit oranını azalttığı gözlenmiştir. Aikman ve ark (2011) *M. elsdenii* inokulasyonunun propiyonik asit üretimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Rumen pH'sı 6'nın altına düşmeye başladığı zaman kolay fermente olan karbonhidratların fermentasyonunun artması sonucu uçucu yağ asitlerinin profili asetik ve bütirik asitten propiyonik aside doğru kaymaya başlamaktadır (Bannink ve ark 2008).

Glikojenik bir ön madde olan propiyonik asit üretiminin artması metan üretiminin azalmasına bağlı olarak enerji kaybını azaltmaktadır (Nagaraja ve ark 1997). Laktasyondaki hayvanlarda glikoz sentezinin %67'si propiyonik asitten kaynaklanmaktadır (Huntington 2000). Özellikle laktasyon başlangıcındaki hayvanlarda rumende propiyonik asit miktarının azalması adipoz dokularda lipolizisin başlamasına neden olmaktadır (Overton ve ark 1999). Propiyonik asit düzeyinin artması insulin salgısını artırarak kuru madde tüketimini düzenlemektedir (Allen 2000). Bu nedenle *M. elsdenii* inokulasyonunun propiyonik asit oranını artırarak özellikle laktasyon başlangıcında negatif enerji dengesi neticesinde ortaya çıkabilecek bozuklukları hafifletme yönünde faydalı olabileceği düşünülmektedir. *Megasphaera elsdenii'*nin inokulasyonun yapıldığı ilk 2 günden sonra rumen pH'sını artırmaya yönelttiği ve propiyonik asit üretimini artırdığı göz önüne alındığında, bakterinin etkisini ilerleyen günlerde daha etkin bir şekilde ortaya koyabileceği düşüncesi akla gelmektedir.

4.2.3. Laktik asit yoğunluğu üzerine gerçekleşen etkiler

Tüketilen karbonhidrat düzeyiyle ilişkili olarak rumende asit üretimi artmaktadır (Allen 1997, Owens ve ark 1998, Allen ve ark 2009). *İn vivo* çalışmada, tane yem oranının artışıyla birlikte laktik asit yoğunluğunun da artması bu durumu yansıtmaktadır (Çizelge 3.6). Rumen sıvısında laktik asidi kullanan mikroorganizmaların (*Megasphaera elsdenii, Selenomonas ruminantium* gibi) konsantre yeme geçilmesini takiben ilk günlerden itibaren oluşmaya başladığı belirtilmektedir (Klieve ve ark 2003, Brown ve ark 2006, Henning ve ark 2010). SARA durumunda laktik asit kullanan bakteriler sayesinde laktik asit uçucu yağ

asitlerine dönüştürüldüğü için rumen sıvısında laktik asit birikmemektedir (Nagaraja ve Chengappa 1998, Oetzel ve ark 1999). Bu bakteriler ortamda laktik asit çok düşük konsantrasyonlara ininceye kadar glikozu substrat olarak kullanmamaktadırlar (Hino ve ark 1994). Subakut asidozis durumunda rumen laktik asit konsantrasyonunun 5 mM (Nagaraja ve Chengappa 1998) ya da 10 mM'den düşük olduğu (Harmon ve ark 1985, Burrin ve Britton 1986), çoğunlukla 0,17-0,74 mM arasında değiştiğine (Oetzel ve ark 1999, Chiquette 2009) dair farklı yorumlar bulunmaktadır. Deneysel SARA oluşturularak yapılan denemelerde (Mackie ve ark 1978, Oetzel ve ark 1999, Plaizier ve ark 1999, Brossard ve ark 2003, Brossard ve ark 2004) rumende laktik asit düzeyleri çok düşük olduğu için (0,45-0,74 mM) rumen pH'sında gözlenen düşmenin laktik asitten kaynaklanmadığı belirtilmektedir. *İn vivo* denemenin sonuçları değerlendirildiğinde, arpa ve buğdaya dayalı besleme durumunda rumende ortalama laktik asit düzeyinin 0,86-0,79 mM olduğu, dolayısıyla ortamda laktik asit birikiminin olmadığı görülmektedir. Ortalama pH'nın 5,62-5,64 olarak belirlenmesi ortamda laktik asit birikimi olmadan pH'nın SARA için belirlenen seviyeye düştüğünü ve laktik asidin pH'nın düşmesinden birinci derecede sorumlu olmadığını göstermektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda subakut asidozisde rumen pH'sındaki azalmanın, UYA konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Horn ve ark 1979, Mackie ve ark 1979). Subakut asidozis durumunda asetik aside oranla propiyonik ve bütirik asit oranının arttığı bildirilmiştir (Goad ve ark 1998). Bu araştırmanın *in vitro* ve *in vivo* denemelerinde UYA konsantrasyonunun sürekli artış göstermesi ve laktik asidin asidozise sebep olacak düzeyde birikmemesi SARA'daki pH düşüklüğünden UYA birikiminin daha fazla sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Megasphaera elsdenii inokulasyonunun laktik asit üzerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Rumen pH'sının 5,0'e yaklaşması veya altına inmesi durumunda *M. elsdenii*'nin gelişmesinin inhibe olması sonucunda subakut asidozis akut asidozise dönüşebilmektedir (Nagaraja ve Titgemeyer 2007). Bu çalışmanın pH verileri değerlendirildiğinde, kaba yemden konsantre yeme tedricen, alıştırmalı bir geçiş sağlanması nedeniyle akut asidozise neden olabilecek derecede pH düşüklüğü gözlenmemiştir. Çalışmada bakteri inokulasyonu laktik asit düzeyi üzerine önemli

bir etki oluşturmazken, *M. elsdenii* inokulasyonunun laktik asit birikimini azalttığı (Greening ve ark 1991, Robinson ve ark 1992, Kung ve Hession 1995, Henning ve ark 2010) ve rumen pH'sını artırdığı belirlenmiştir (Greening ve ark 1991, Henning ve ark 2010). *Megasphaera elsdenii*'nin rumene inokulasyonu ile laktik asit kullanan bakteri sayısının hızla arttığı (Klieve ve ark 2003) ve rumen stabilitesinin korunduğu (Wîryawan ve Broker 1995) iddia edilmektedir. Bununla birlikte, *M. elsdenii* inokulasyonunun rumen pH'sı, laktik asit ve UYA konsantrasyonu üzerine etki etmediği de bildirilmektedir (Hagg 2007).

4.2.4. Amonyak azotu üzerine gerçekleşen etkiler

Proteinlerin metabolizması sonucu mikroorganizmalar tarafından üretilen amonyak mikroorganizmaların gelişmesinde de kullanılmaktadır (Annison 1956). *Megasphaera elsdenii*'nin de görev aldığı amino asit deaminasyonu (Bladen ve ark 1961, Russell ve ark 1988, Rychlik ve ark 2002) sonucu bazen rumende bakterilerin faydalanabileceğinden daha fazla amonyak oluşabilmektedir (Leng ve Nolan 1984). Yapılan çalışmalarda rasyonda konsantre yem oranının artmasıyla ilişkili olarak amonyak konsantrasyonunun da arttığı bildirilmiştir (Goad ve ark 1998, Hristov ve ark 2001, Brossard ve ark 2004). Bu etkinin konsantre yem oranının artmasıyla birlikte rumen pH'sının azalması ve amonyak azotunu kullanan selülolitik bakterilerin sayısının azalmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Hoover 1986). *İn vivo* denemede ortamın amonyak düzeyinin kullanılan tane yem çeşidine bağlı olarak değişiklik gösterdiği, buğdaya dayalı besleme durumunda oranın artmasıyla birlikte amonyak seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir.

İn vitro denemede *M. elsdenii* inokulasyonunun amonyak düzeyi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.11) ($P<0,002$). Bakteri seviyesinin artması ile 24. saatin sonunda oluşan toplam amonyak miktarı artış göstermiştir. *İn vivo* denemede ise SARA sonrası farklı dozlardaki *M. elsdenii* inokulasyonun ortamın amonyak düzeylerini etkilemediği belirlenmiştir.

4.2.5. Protozoa yoğunluğu üzerine gerçekleşen etkiler

Yapılan araştırmalarda rumendeki protozoa sayısının 10^5-10^6/ml arasında olduğu (Dehority 1984, Towne ve ark 1986, Williams 1986, Jouany 1996) belirlenmiştir. Bu araştırmadaki protozoa sayılarının normal sınırlar içerisinde

olduğu görülmektedir (Çizelge 3.8). Adaptasyon dönemi boyunca tane yem oranı arttıkça rumen sıvısındaki protozoa sayısının logaritmik olarak arttığını (Franzolin ve Dehority 1996, Martin ve ark 1999, Brown ve ark 2006, Hook ve ark 2011) ve SARA şekillendikten sonra pH'nın düşmesi ile protozoa sayısının azaldığını (Hook ve ark 2011) bildiren çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tane yem içeriği yüksek rasyonlara adaptasyon sırasında protozoa sayısı artmakta, laktik asit üreten bakterilerin sayısı laktik asidi kullananların sayısını geçince azalan protozoa sayısı fermentasyonu kontrol altına almak için tekrar çoğalmaya başlamaktadır (Mackie ve Gilchrist 1979). Rasyonda konsantre yem oranı arttıkça protozoa çeşitliliği azalırken *Entodinium* türü protozoaların sayısı artmaktadır (Brossard ve ark 2004, Hristov ve ark 2004). Bu çalışmada, sadece ortamda bulunan protozoa sayısı belirlenmiş olup türlere ait sayı ve oranlar tespit edilmemiştir. Mikroskobik gözlemlere dayanarak tane yem oranının artışı ile birlikte artan protozoa sayısı içerisinde belirgin bir şekilde *Entodinium* türlerinin çoğaldığının gözlenmesi literatür veriler ile uyum içerisindedir. *Entodinium* türlerinin ortamdaki laktik asidi kullanmaları ya da nişasta granüllerini içlerine alarak nişasta sindirimini düzenlemeleri nedeniyle SARA ve klinik asidozis riskinin azaltılmasında etkili oldukları bilinmektedir (Schwartzkopf-Genswein ve ark 2003, Dehority 2005). *Entodinium* türü protozoalar amilolitik bakterilerle substrat için rekabete girmekte, nişastayı amilolitik bakterilerden daha yavaş fermente etmekte ve fermentasyonun temel ürünü olarak bütirik asit oluşturmaktadırlar (Owens ve ark 1998, Brossard ve ark 2004). Bu bilgiler ışığında, çalışmanın adaptasyon döneminde artan nişasta tüketimi ile birlikte artan protozoa sayısının özellikle bütirik asit oranlarının yükselmesinde etkili olduğu ve fazla nişasta tüketiminin yol açtığı laktik asit birikimini önleyerek ortamda UYA artışının gerçekleşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Rumen pH'sının azalmasına bağlı olarak protozoa sayısının azaldığı (Goad ve ark 1998) göz önüne alındığında, *M. elsdenii* inokulasyonunun rumen pH'sını (Grafik 3.2) dolayısıyla protozoa sayısını azalttığı (Çizelge 3.8, Grafik 3.16) ortaya çıkmaktadır. Ayrıca *M. elsdenii'*nin ikinci kez inokulasyonundan sonra rumen pH'sında belirlenen artış yönündeki meyilin protozoa sayısında da gözlenebileceği düşüncesi akla gelmektedir.

4.3. Kan parametreleri üzerine etkiler

Normal şartlarda kan pH'sı bikarbonat (HCO_3) ile doyurulduğu için nadiren dalgalanma göstermektedir. Kan asit-baz dengesi; solunum sistemi (CO_2 atılımı), musküler aktivite (laktat üretimi) ve böbrekler (asit veya amonyum tuzlarının atılımı) tarafından düzenlenmekte, emilen iyonların dengesi asit baz durumunu değiştirebilmektedir. Rasyonun katyon-anyon farklılığı (DCAD)'nın değişimi, rumen ve kan pH'sının da değişimini sağlamaktadır (Owens ve ark 1998). Tane yem oranının artışı ile birlikte kan pH'sının ve baz fazlalığı (BE)'nın lineer olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (Odongo ve ark 2006). SARA durumunda sistemik asit-baz durumunda gözlenen değişikliklerin çok düşük seviyede olduğu bildirilmektedir (Horn ve ark 1979, Goad ve ark 1998, Brown ve ark 2000). Akut asidozis durumunda ise, kanın asit-baz durumu önemli düzeyde değişmekte, tane yemin rasyonda fazla miktarda bulunması kan pH'sını, kan HCO_3 konsantrasyonunu ve BE'yi düşürmektedir (Goad ve ark 1998, Owens ve ark 1998, Brown ve ark 2000). Bu araştırmada tane yem tüketimi arttığı halde kan pH'sının ve CO_2 basıncının, kanın HCO_3 konsantrasyonunun ve BE'nin etkilenmemesi kanda asitliğin artmasını önleyen mekanizmaların aktif olarak çalıştığını göstermektedir.

Kanın HCO_3 konsantrasyonu ve BE'nin rumen sıvısındaki UYA konsantrasyonu ile negatif ilişkili olduğu bildirilmektedir (Faverdin ve ark 1999). Bu durum kuru madde tüketimindeki geçici azalmayla da ilişkili olarak değişebilmektedir. SARA döneminde artan toplam UYA üretimi ve emiliminin kan pH, HCO_3 ve BE düzeylerinin düşmesi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

SARA döneminde kanın asit-baz dengesi düzenlendiği ve kan bikarbonat ile doyurulduğu için *M. elsdenii* inokulasyonunun kan pH'sı üzerine etki etmediği düşünülmektedir. Aynı nedenlere bağlı olarak direkt yedirilen mikroorganizmalarının da kan pH'sı üzerine etki etmediği bildirilmiştir (Beauchemin ve ark 2003). Direkt yedirilen mikroorganizmaların kan Ca ve Mg düzeyleri üzerine etkisinin az olduğu ve subklinik asidozisin etkilerinin azaltılmasında da çok az etkili olduğu bildirilmekle birlikte (Beauchemin ve ark 2003) arpa ve buğday karışımlarının artan oranlarda yedirilmesiyle oluşturulan SARA'da kan Ca düzeyinin de genel olarak arttığı, *M. elsdenii* inokulasyonunun ise Ca düzeyini değiştirmediği görülmektedir.

Arpa ve buğdaya dayalı tane yem karışımları ile oluşturulan SARA'da kan glikoz düzeyinin artması glikoneogenesisin dolayısıyla propiyonik asit kullanılabilirliğinin artmasına bağlanmaktadır (Van Soest ve ark 1994). Kan glikoz düzeyinin arpa rasyonlarına adapte edilen hayvanlarda değişmediği bildirilirken (Bevans ve ark 2005) kuzularda içeriğinde buğday-arpa bulunan konsantre yemin tüketimindeki artışa bağlı olarak kan glikoz değerlerinin yükseldiği de (Odongo ve ark 2006) bildirilmektedir.

Yüksek tane yem tüketimine metabolik bir cevap olarak plazma laktik asit düzeyi artmaktadır. Sistemik yangısal olaylar sırasında plazma laktik asit düzeyindeki artışın %50'sinden karaciğerin laktik asidi kullanma kapasitesinin azalması ve glikojenden glikoz üretiminin artmasının sorumlu olduğu belirtilmektedir (Ametaj 2009). *Megasphaera elsdenii* inokulasyonunun kan laktik asit, glikoz ve bikarbonat değerlerine hiçbir etkinin olmadığı belirtilmekle birlikte (Kim 2007), bu çalışmada kan laktik asit düzeyini artırdığı belirlenmiştir.

Megasphaera elsdenii inokulasyonunun kan metabolizması üzerine etkileri açısından yeterli yayın bulunmaması nedeniyle bakterinin gerçekleştirdiği mekanizmalar tam olarak açıklanamamaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tane yem tüketiminin artışına bağlı olarak rumen pH'sının dalgalı bir seyir göstererek düşmesi ve yem tüketiminin baskılanması subakut asidozis (SARA)'in önemli göstergelerindendir. Buğday ile arpanın hızlı bir adaptasyon sürecinde yüksek düzeyde tüketilmesine bağlı olarak rumen sıvısı pH'sında gözlenen dalgalanmaların yem tüketiminde ciddi bir düşüşe neden olmadığı belirlenmiştir. Adaptasyon döneminde toplam UYA üretimi ile birlikte bütirik asit konsantrasyonunun da artması rumen mukozası epitel hücrelerinin büyümesi ve rumen duvarı kütlesi artışını teşvik etmesi açısından önemlidir. Bu sayede rumenin emilim kapasitesi ile metabolitlerin rumen duvarından geçişinin arttığı ve hayvanlarda olası bir akut asidozis durumunun önlendiği düşünülmektedir.

Megasphaera elsdenii inokulasyonu ile rumen laktik asit seviyesinde hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Bakterinin rumen pH'sını düşürmesi, toplam UYA üretimini rakamsal olarak artırmasına bağlanabilir. İnokulasyon sonucunda protozoa sayısının azalması ile düşen rumen pH'sından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *M. elsdenii* inokulasyonu rumende propiyonik asit üretiminin artması ve kan glikoz düzeyinin yükselmesini sağlayacağı, özellikle geçiş döneminde bulunan süt ineklerinde enerji yetersizliğine bağlı metabolik hastalıkların önlenmesinde önemli bir etki oluşturacağı söylenebilir. Bu çalışmada, belirlenen parametrelerin çoğunda istatistiksel olarak farklılığa rastlanmamakla birlikte *M.elsdenii*'nin ikinci kez inokulasyonundan sonra pH'nın artmaya meyletmesi, toplam uçucu yağ asitleri özellikle de propiyonik asitte artışa, As:Pr oranında azalmaya yol açması önemli faydalı etkileri oluşturabileceğini göstermektedir.

Kolay fermente olan karbonhidratların fazla miktarda tüketilmesi durumunda *M. elsdenii* inokulasyonunun diğer çalışmalara göre farklılık göstermesinin bakterinin suş farkından kaynaklanabileceği düşüncesini de akla getirmektedir. Bu nedenle inokulasyon etkilerini tam olarak ortaya çıkarabilmek için farklı suş, yem maddesi ve hayvan gruplarıyla ayrıntılı araştırmalar yapmak gerekmektedir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İn vivo ve *in vitro* şartlarda oluşturulan subakut asidozis durumunda *Megasphaera elsdenii* inokulasyonunun rumen parametreleri üzerine etkisi

"Mustafa Selçuk ALATAŞ"

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

Danışman
Prof. Dr. Huzur Derya UMUCALILAR

DOKTORA TEZİ / KONYA-2013

Bu çalışma subakut asidozisin (SARA) önlenmesi açısından *Megasphaera elsdenii*'nin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla iki deneme halinde yürütülmüştür. *İn vitro* ortamda test diyeti kullanılarak SARA oluşturan oran belirlendikten sonra değişik dozlardaki *M. elsdenii* kültürünün etkileri incelenmiştir. Rumen kanüllü 8 adet koçun kullanıldığı *in vivo* denemede ise arpa (%80 arpa, %20 buğday) ve buğdaya (%80 buğday, %20arpa) dayalı tane yem karışımları ile hızlı adaptasyon (%20, %40 ve %60) uygulanmıştır. Dereceli adaptasyon süresince hayvanların yemleme öncesi ve yemlemeden sonra 2 saat aralıklarla rumen pH'ları ölçülerek SARA oluşma ihtimali takip edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, arpa ve buğdaya dayalı tane yem karışımının %60 düzeyi ile besleme durumunda gün içerisinde ölçülen rumen pH'larının 5,2-5,6 arasında seyrettiği belirlenmiş ve subakut asidozis şekillendiği kabul edilmiştir. Dört günlük SARA döneminde *M. elsdenii* 10^{10} cfu ml^{-1} düzeyinde ilk iki gün inokule edilmiştir.

SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonu ile birlikte yem tüketiminde rakamsal bir azalma gözlenmiştir. *M. elsdenii* inokulasyonu rumen pH'sında önemli ölçüde farklılık yaratmış (P<0,0001), inokulasyon yapılan hayvanlarda ortalama pH 5,55 bulunurken, inokulasyon yapılmayan hayvanlarda 5,63 olarak belirlenmiştir. Toplam UYA'nın tane yeme bağlı olarak bakteri inokulasyonu ile değişme eğiliminde olduğu gözlenmiş (P<0,07), arpaya dayalı beslemede toplam UYA inokulasyonun etkisi ile artarken, buğdaya dayalı beslemede daha stabil seyretmiştir. Bakteri inokulasyonu propiyonik asidin oranını artırırken (%18,33-%21,38), bütirik asit oranında ise azalmaya (%18,90-%16,96) yol açmıştır (P<0,0001). *M. elsdenii* inokulasyonu propiyonik asidin oranını değiştirdiği için asetik/propiyonik oranı da bakteri inokulasyonu ile düşüş göstermiştir. Rumen sıvısı laktik asit yoğunluğu hızlı adaptasyon döneminde artan tane yem oranına bağlı olarak artmış göstermiş(P<0,001), bakteri inokulasyonunun laktik asit yoğunluğu üzerine etkisi olmamıştır. *M. elsdenii* inokulasyonun rumen amonyak yoğunluğunu etkilemediği, bakteri inokulasyonu yapılmayan grupta amonyak düzeyinin (11,34 mmol/L), inokulasyon yapılan gruba (10,39 mmol/L) göre rakamsal olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tane yem oranının artışı ile çoğalan (P<0,0001) protozoa sayısı bakteri inokulasyonu ile düşüş göstermiştir (P<0,0001). Bakteri inokulasyonu sonucu arpaya dayalı beslemede protozoa sayısında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, buğdaya dayalı tane yem karışımında düşüş belirlenmiştir (P<0,003). SARA döneminde *M. elsdenii* inokulasyonu sonrası hayvanlardan alınan kan örneklerinde kan glikoz, laktat ve hematokrit değerlerine önemli oranda artış gözlenmiştir (P<0,0001).

Genel olarak değerlendirildiğinde, *Megasphaera elsdenii* inokulasyonunun rumen parametreleri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı, bu nedenle inokulasyon etkilerini tam olarak ortaya çıkarabilmek için farklı suş, yem maddesi ve hayvan gruplarıyla ayrıntılı araştırmalar yapmak gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Subakut asidozis; *Megasphaera elsdenii;* rumen fermentasyon; *in vivo; in vitro*

7. SUMMARY

Effects of *Megasphaera elsdenii* inoculation on rumen parameters induced subacute acidosis in *in vivo* and *in vitro* conditions

This project, two subsequently experiments was carried out to determine the activity of *Megasphaera elsdenii* in terms of being prevented subacute acidosis (SARA). It was investigated the effects of *M. elsdenii* culture in various dosage after determining the ratio that forms the SARA being used the test diet in vitro. In vivo experimentation, it was used eight ruminally cannulated rams and it was applied the rapid adaptation with the mixture of grain based on wheat (%80 wheat, %20 barley) and barley (%80 barley, %20 wheat). During the systematic adaptation, it was followed the probability of SARA formation by being measured the rumen pH with two hours intervals after and before feeding. After being evaluated the data, it was determined the ruminal pH ranged from 5,2-5,6 on the condition of feeding with 60 percentage of grain mixture based on barley and wheat, that assured the definite form of subacute acidosis. In four days SARA period, *M. elsdenii* (10^{10} cfu ml^{-1}) was inoculated during the first two days.

During the SARA period, it was observed the decrease of feed intake with *M. elsdenii* inoculation. Inoculation of *M. elsdenii* was caused to differenciation of rumen pH ($P<0,0001$), while it was found the pH level approximately 5,55 in animals applied the inoculation, it was 5,63 pH in other animals. It was observed that total UYA with the bacterium inoculation tended to change in terms of grain feed ($P<0,07$). It increased with the effect of total VFA inoculation in barley based diet, but it was more stabilized in wheat based diet. Bacterium inoculation increased the ratio of propionic acid (18,33%-21,38%) but it caused to decrease the butyric acid, and asetic/propionic acid. During the rapid adaptation, the concentration of lactic acid in the rumen liquid increased depending upon grain level ($P<0,0001$). On the other hand bacterium inoculation did not have an effect on concentration of lactic acid. *M. elsdenii* inoculation did not affect ruminal ammonia concentration. In the group that did not apply inoculation, the level of ruminal ammonia concentration was higher than the others applied inoculation. *M. elsdenii* inoculation did not changed protozoa count in barley-based diet whereas it decreased in wheat-based diet. In the period of SARA, it was observed that the level of blood glucose, lactate and hematocrit increased greatly after inoculation ($P<0,0001$).

When it is generally evaluated, it is seen that *M. elsdenii* inoculation has not a positive impact on rumen parameters. Therefore, to reveal the full impact of the inoculation with different strains, feedstuffs and animal groups, further research is required.

Key Words: Subacute acidosis; *Megasphaera elsdenii;* rumen fermentation; *in vivo; in vitro.*

8. KAYNAKLAR

1. Aikman PC, Henning PH, Humphries DJ, Horn CH. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with Megasphaera elsdenii nCImB 41125 in early lactation. J Dairy Sci. 2011; 94: 2840–2849.

2. Allen, MS. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. J Dairy Sci. 1997; 80: 1447–1462.

3. Allen MS. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. J Dairy Sci. 2000; 83: 1598-1624.

4. Allen MS, Bradford BJ and Harvatine KJ. The cow as a model to study food intake regulation. Annu Rev Nutr. 2005; 25: 523–547.

5. Allen MS, Bradford BJ, Oba M. Board-Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. J Anim Sci. 2009; 87: 3317-34.

6. Allison MJ. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. Appl Environ Microbiol. 1978; 35; 5, 872-876.

7. Ametaj BN, Emmanuel DGV, Zebeli Q and Dunn SM. Feeding high proportions of barley grain in a total mixed ration perturbs diurnal patterns of plasma metabolites in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2009; 92: 1084-1091.

8. Andersen PH, Bergelin B, Christensen KA. Effect of feeding regimen on concentration of free endotoxin in ruminal fluid of cattle, J Anim Sci. 1994; 72: 487-491.

9. Anderson JB, Sehested J and Ingvartsen KL. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. Acta Agric Scand. 1999; 49: 149–155.

10. Andersen PH. Bovine endotoxicosis: aspects of relevance to ruminal acidosis. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen. Dr Vet Sci. 2000.

11. Annison EF, Nitrogen Metabolism in the Sheep. Protein Digestion in the rumen. Bioch. 1956; 64: 705-714.

12. AOAC-official methods of analysis. 14th Edition, Ed by Sidney Williams, Arlington, Virginia 22009 USA 73, 1984.

13. Asanuma N, Iwamoto M and Hino T. Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate–lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. Microbiol. 1999; 145: 151–157.

14. Bannink A, France J, Lopez S, Gerrits WJJ. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. Anim Feed Sci Technol. 2008; 143: 3-26.

15. Bannink A, Gerrits WJJ, France J, Dijkstra J. Variation in rumen fermentation and the rumen wall during the transition period in dairy cows. Anim Feed Sci Technol. 2012; 72: 1-2, 80-94.

16. Barker SB, Summerson WH. The colorimetric determination of lactic acid in biological material, J Biol Chem. 1941; 138: 535-554.

17. Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef. J Anim Sci. 2001; 79: 1925-1936.

18. Beauchemin KA, Yang WZ, Morgavi DP, Ghorbani GR, Kautz W, Leedle JAZ. Effects of bacterial direct-feed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. J Anim Sci. 2003; 81: 6, 1628-1640.

19. Beauchemin KA, Yang WZ. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. J Dairy Sci. 2005; 88: 6, 2117-2129.

20. Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, McKinnon JJ, McAllister TA. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. J Anim Sci. 2005; 83: 5, 1116-1132.

21. Bladen HA, Bryant MP and Doetsch RN. A Study of Bacterial Species from the Rumen Which Produce Ammonia from Protein Hydrolyzate. Appl Microbiol. 1961; 9:2, 175-180.

22. Blanch M, Calsamiglia S, Dilorenzo N, Dicostanzo A, Muetzel S, Wallace RJ. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers, J Anim Sci. 2009; 87: 5, 1722.

23. Britton RA, Stock RA. Acidosis, rate of starch digestion and intake. In: Proceedings of the 1986 Feed Intake Symposium, MP 121, 125–137, 1986, Oklahoma Agricultural Experiment Station, Norman, Oklahoma.

24. Brossard L, Martin C, Michalet-Doreau B. Ruminal fermentative parameters and blood acido-basic balance changes during onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. Anim Res. 2003; 52: 513–530.

25. Brossard L, Martin C, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. Reprod Nutr Dev. 2004; 44: 195-206.
26. Brown MS, Krehbiel CR, Galyean ML, Remmenga MD, Peters JP, Hibbard B, Robinson J, Moseley WM. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake , ruminal fermentation , blood chemistry , and endocrine profiles of beef steers. J Anim Sci. 2000; 78: 3155-3168.
27. Brown MS, Ponce CH, Pulikanti R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. J Anim Sci. 2006; 84: E25.
28. Burrin DG, Britton RA. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. J Anim Sci. 1986; 63: 888-893.
29. Calsamiglia S, Cardozo PW, Ferret A and Bach A. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. J Anim Sci. 2008; 86: 702–711.
30. Campbell A. Optimizing the adaptation rate of feedlot steers dosed with Megasphaera elsdenii NCIMB 41125 and fed high starch, Animals. 2010; 1: 112.
31. Chiquette J. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. Anim Feed Sci Technol. 2009; 153: 3-4, 278-291.
32. Cooper SBD, Kyriazakis I and Nolan JV. Diet selection in sheep: the role of the rumen encironment in the selection of a diet from two feeds that differ in their energy density. Br J Nutr 1995; 74: 39-54.
33. Counotte GHM, Prins RA, Janssen RHAM, Debie MJA. Role of Megasphaera elsdenii in the fermentation of DL- [2-'3C] lactate in the rumen of dairy cattle. Appl Environ Microbiol. 1981; 42: 649–655.
34. Dehority BA. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. Appl Environ Microbiol. 1984; July: 182-185.
35. Dehority BA. Effect of pH on viability of Entodinium caudatum, Entodinium exiguum, Epidinium caudatum, and Ophryoscolex purkynjei in vitro. J Eukaryot Microbiol. 2005; 52: 4, 339–342.
36. Doreau M, Ollier A and Michalet-Doreau B. An atypical case of ruminal fermentations leading to ketosis in early lactating cows. Revue Méd Vét. 2001; 152: 301–306.
37. Emmanuel DGV, Dunn SM, Ametaj BN. Feeding High Proportions of Barley Grain Stimulates an Inflammatory Response in Dairy Cows, J Dairy Sci. 2008; 606-614.
38. Enemark JMD, Jørgensen RJ, Enemark PS. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. Veterinarija ir Zootechnika. 2002; 20: 16–29.
39. Enemark JMD, Jørgensen RJ, and Kristensen NB. An evaluation ofparameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. Vet Res Commun. 2004; 28: 8, 687-709.
40. Enemark JMD. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. The Vet J. 2009; 176: 32–43.
41. Euge`ne M, Archime`de H, Sauvant D. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. Livest Prod Sci. 2004; 85: 81–97.
42. Faverdin P, Bareille N, Vérité R. Effects of rumen energy supply timing on feed ntake control in lactating dairy cows, J Dairy Sci. 1999; 82: 2443–54.
43. Fell BF, Weekes TEC. Food intake as a mediator of adaptation in the ruminal epithelium. Digestion and Metabolism in the Ruminant: Proceedings of the IV International Symposium on Ruminant, 101–118, 1975, Sydney, Australia.
44. Flatt WP, Warner RG & Loosli JK. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. J Dairy Sci 1958; 41: 1593–1600.
45. Flatt WP, Warner RG & Loosli JK. Evaluation of several techniques used in the study of developing rumen function. Cornell Univ Memoir. 1959; 361: 3–31.
46. Franzolin R and Dehority BA. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. J Anim Sci. 1996; 74: 2803-2809.
47. Fulton WR, Klopfenstein TJ, Britton RA. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. I. Adaptation to corn and wheat diets. J Anim Sci. 1979a; 49: 775–784.
48. Fulton WR, Klopfenstein TJ, Britton RA. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. II. Effect of ruminal pH alteration on rumen fermentation and voluntary intake of wheat diets, J Anim Sci. 1979b; 49: 785-789.
49. Garrett EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. J Dairy Sci. 1999; 82: 1170–1178.
50. Goering HK, Van Soest PJ. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents and some Applications).

Agriculture Handbook, 1st edition, USA, Agricultural Research Service, 1970; 379.
51. Ghorbani GR, Morgavi DP, Beauchemin KA and Leedle JAZ. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. J Anim Sci. 2002: 80: 1977-1985.
52. Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. J Anim Sci. 1998; 76: 234-241.
53. González L, Manteca X, Calsamiglia S, Schwartzkopf-Genswein KS, Ferret A. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). Anim Feed Sci Technol. 2012; 172: 1-2, 66-79.
54. Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release andtriggers an inflammatory response. J Dairy Sci. 2005; 88: 1399-1403.
55. Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers, J Dairy Sci, 2006; 89: 11, 4404-13.
56. Greening RC, Smolenski WJ, Bell RL, Barsuhn K, Johson MM, Robinson JA. Effect of inoculation of Megasphaera elsdenii strain 407A (UC 12497) on ruminal pH and organic acids in beef cattle. J Anim Sci. 1991; 69: (Suppl. 1), 518 (Abstr.).
57. Hagg FM. The effect of Megasphaera elsdenii, a probiotic, on the productivity and health of Holstein cows, University of Pretoria. Faculty of Natural and Agricultural Science, Dep of Anim Wildlife Sci. PhD thesis, 2007.
58. Harmon DL, Britton RA, Prior RL, Stock RA. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. J Anim Sci. 1985; 60: 560-569.
59. Hayırlı A, Umucalılar HD, Gülşen N, Çitil ÖB. Role of lactulose as a modifier in rumen fermentation, J Anim Vet Advances, 2010; 9: 19, 2537-2545.
60. Henning PH, Horn CH, Leeuwa KJ, Meissnera HH, Hagg FM. Effect of ruminal administration of the lactate-utilizing strain Megasphaera elsdenii (Me) NCIMB 41125 on abrupt or gradual transition from forage to concentrate diets. Anim Feed Sci Technol. 2010; 157: 20–29.
61. Hino T, Shimada K, Maruyama T. Substrate preference in a strain of Megasphaera elsdenii, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition, Appl Environ Microbiol. 1994; 60: 6, 1827-1831.
62. Hook SE, Steele MA, Northwood KS, Wright AG, McBride BW. Impact of High-Concentrate Feeding and Low Ruminal pH on Methanogens and Protozoa in the Rumen of Dairy Cows. Microb Ecol. 2011; 62: 94–105.
63. Hoover WH. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. J Dairy Sci. 1986; 69: 2755-2766.
64. Horn GW, Gordon JL, Prigge EC, Owens FN. Dietary buffers and ruminal and blood parameters of subclinical lactic acidosis in steers. J Anim Sci. 1979; 48: 683-91.
65. Hristov AN, Ivan M, Rode LM, Mcallister TA. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. J Anim Sci. 2001; 79: 515–524.
66. Hristov AN, Ivan M and McAllister TA. In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. J Anim Sci. 2004; 82:2693-2704.
67. Hungate RE. The rumen and its microbes, New York: Academic Press. 1966; pp: 533.
68. Huntington GB. High-starch rations for ruminant production discussed. Feedstuffs. 2000; 12–13: 23.
69. Ingvartsen KL. Feeding- and management-related diseases in the transition cow Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases, Anim Feed Sci Technol. 2006; 126: 175-213.
70. Jouany JP. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. J Nutr. 1996; 126: 4, 1335S-1346S.
71. Keunen JE, Plaizier JC, Kyriazakis L, Duffield TF, Widowski TM, Lindinger MI, Mcbride BW. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. J Dairy Sci. 2002; 85: 3304-3313.
72. Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO, Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis, Appl Environ Microbiol, 2007; 75: 22, 7115-24.
73. Khafipour E, Krause DO and Plaizier JC. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. J Dairy Sci. 2009a; 92: 1060–1070.

74. Khafipour E, Krause DO and Plaizier JC. Alfalfa pelletinduced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. J Dairy Sci. 2009b; 92: 1712–1724.
75. Kim SW, Standorf DG, Roman-Rosario H, Yokoyama MT and Rust SR. Potential use of *Propionibacterium acidipropionici*, strain DH42, as a direct-fed microbial for cattle. J Anim Sci. 2000; 78:(Suppl. 1), 292.
76. Kimberley A, Taylor CC. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl Biochem Biotechnol. 1996; 56: 1, 49-58.
77. Kleen JLG, Hooijer A, Rehage J, Noordhuizen JPTM. Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. J Vet Med. 2003; A50: 406–414.
78. Kleen JL, Cannizzo C. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. Anim Feed Sci Tech. 2012; 172: 4– 8.
79. Klieve AV, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster RJ, Mackie RI, Attwood GT. Establishing populations of Megasphaera elsdenii YE 34 and Butyrivibrio fibrisolvens YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. J Appl Microbiol. 2003; 95: 621-630.
80. Koenig KM, Beauchemin KA, Rode M. Effect of grain processing and silage on microbial protein synthesis and nutrient digastibility in beef cattle fed barley-based diets. J Anim Sci. 2003; 81: 1057-1067.
81. Koers WC, Britton RA, Klopfenstein TJ and Woods WR. Ruminal histamine, lactate and animal performance. J Anim Sci. 1976; 43: 684-691.
82. Krause KM, Oetzel GR. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review, Anim Feed Sci Tech. 2006; 126: 215–236.
83. Krehbiel CR, Burciaga-Robles LO. Caloric Density in Feedlot Diets. Plains Nutrition Council Spring Conference. Publication No. AREC 10-57; Texas AgriLife Research and Extension Center, Texas A&M System, Amarillo, 2010.
84. Kung L, Hession AO. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with Megasphaera elsdenii, J Anim Sci. 1995; 73: 250-256.
85. Leng RA, Nolan JV. Nitrogen metabolism in the rumen. J Dairy Sci. 1984; 67:1072–1089.
86. Lopez S, Dhanoa MS, Dijkstra J, Bannink A, Kebreab E, France J. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. Anim Feed Sci Technol. 2007; 135: 139–156.
87. Mackie RI, Gilchrist FMC, Robberts AM, Hannah PE and Schwartz HM. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. J Agric Sci. 1978; 90:241-254.
88. Mackie RI and Gilchrist FMC. Changes in lactate producing and lactate utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high concentrate diet. Appl Environ Microbiol. 1979; 38: 422-430.
89. Marounek M, Fliegrova K, Bartos S. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of Megasphaera elsdenii, Appl Environ Microbiol. 1989; 55: 1570-1573.
90. Martin C, Devillard E, and Michalet-Doreau B. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. J Anim Sci. 1999; 77: 979-987.
91. Martens H, Rabbani I, Shen Z, Stumpff F, Deiner C. Changes in rumen absorption processes during transition, Anim Feed Sci Technol. 2012; 172: 1-2, 95-102.
92. McDaniel MR, Higgins JJ, Heidenreich JM, Shelor MK, Parsons GL, Henning PH, and Drouillard JS. Effects of Megasphaera elsdenii on Ruminal pH, Ruminal Concentrations of Organic Acids, and Bacterial Genomes Following a Grain Challenge. Beef Cattle Research. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 2009; 62-65.
93. McLeod KR and Baldwin RL. Effects of diet forage:concentrate ratio and metabolizable energy intake on visceral organ growth and in vitro oxidative capacity of gut tissues in sheep. J Anim Sci. 2000; 78: 760-770.
94. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J Agric Sci Camb. 1979; 93: 217-222.
95. Nagaraja TG, Towne G, Beharka AA. Moderation of ruminal fermentation by ciliated Protozoa in cattle fed a high-grain diet. Appl Environ Microbiol. 1992; 58: 8, 2410-2414.
96. Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ and Demeyer DI. Manipulation of ruminal fermentation, In: Hobson PJ, Stewart CS, editors. The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd ed. London: Blackie Acad Profess; 1997. p. 523-632.
97. Nagaraja TG, Chengappa MM. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. J Anim Sci. 1998; 76:

287–298.
98. Nagaraja TG, Titgemeyer EC. Ruminal asidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. J Dairy Sci. 2007; 90: E17- E18.
99. Nocek JE. Bovine acidosis: Implications on laminitis, J Dairy Sci. 1997; 80: 1005–1028.
100. Nocek JE, Alman JG, Kautz WP. Evaluation of an indwelling ruminal probe methodology and effect of grain level on diurnal pH variation in dairy cattle, J Dairy Sci. 2002; 85: 422–428.
101. Nordlund KV, Garrett EF. Rumenocentesis: a technique for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds. Bovine Practitioner. 1994; 28:104-107.
102. NRC- National Research Council Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th Revised Edition, Washington DC: National Academy Press, 2001.
103. Odongo NE, Alzahal O, Lindinger MI, Duffield TF, Valdes EV. Terrell S.P., Effects of mild heat stress and grain challenge on acid-base balance and rumen tissue histology in lambs. J Anim Sci. 2006; 84: 447-455.
104. Oetzel GR, Nordlund KV, Garett EF. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentration in dairy cows. J Dairy Sci. 1999; 82: (Suppl. 1), P35.
105. Oetzel GR. Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. Adv Dairy Tech. 2003; 15: 30.
106. Overton TR, Drackley JK, Ottemann Abbamonte CJ, Beaulieu AD, Emmert LS and Clark JH. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. J Anim Sci. 1999; 77: 1940–1951.
107. Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. Acidosis in cattle: a review. J Anim Sci. 1998; 76: 275-286.
108. Penner GB, Beauchemin KA, Mutsvanga T. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. J Dairy Sci. 2007; 90: 365-375.
109. Penner GB, Taniguchi M, Guan LL, Beauchemin KA, Oba M. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. J Dairy Sci. 2009; 92: 6, 2767-81.
110. Penner GB, Steele MA, Aschenbach JR, Mcbride BW. Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets, J Anim Sci. 2011; 89: 4, 1108-19.
111. Phy TS and Provenza FD. Sheep fed grain prefer foods and solutions that acidosis. J Anim Sci. 1998a; 76: 954-960.
112. Phy TS and Provenza FD. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. J Anim Sci. 1998b; 76: 1578-1583.
113. Plaizier JC, Martin A, Duffield T, Bagg R, Dick P, Mcbride BW. Monitoring acidosis in the transition cow, J Dairy Sci. 1999; 82: 110 (Abstract).
114. Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, Mcbride BW. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences, T Vet J. 2009; 176: 21–31.
115. Robinson JA, Smolenski WJ, Greening RC, Ogilvie ML, Bell RL, Barsuhn K, Peters JP. Prevention of acute acidosis and enhancement of feed intake in the bovine by Megasphaera elsdenii 407A. J Anim Sci. 1992; 70: (Suppl. 1), 310.
116. Russell JB, Strobel HJ and Chen GJ. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54:4, 872-877.
117. Rustomo B, Alzahal O, Cant JP, Fan MZ, Duffield TF, Odongo NE, Mcbride BW. Acidogenic value of feeds. II. Effects of rumen acid load from feeds on dry matter intake, ruminal pH, fiber degradability and milk production in the lactating dairy cow. Can J Anim Sci. 2006; 86: 119–126.
118. Rychlik JL, Lavera R, Russell JB. Amino acid deamination by Megasphaera elsdenii starins, Current Microbiology, 2002; 45: 340-345.
119. Sakata T and Tamate H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. J Dairy Sci. 1978; 61: 1109–1113.
120. Sander EG, Warner RG, Harrison HN & Loosli JK. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on development of rumen mucosa in the young calf. J Dairy Sci. 1959; 42: 1600–1605.
121. Sauvant D, Meschy F and Mertens D. Components of ruminal acidosis and acidogenic effects of diets. INRA Prod Anim. 1999; 12: 49-60.
122. Schwartzkopf-Genswein KS, Beauchemin KA, Gibb DJ, Crews DH, Streeter M, Mcallister TA. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. Society. 2003; 81: E149-158.

123. Slyter LL. Influence of acidosis on rumen function. J Anim Sci. 1976; 43: 910-929.
124. Slyter LL, Tung RS, Kung Jr L. Effect of monensin and lysocellin on growth and fermentation by pure cultures of ruminal bacteria. J Appl Anim Res. 1992; 1: l.
125. Smith CM, Krishnamurtiic R, Kitts WD. Effect of lactic acid administration on rumen myoelectric activity and pressure changes in the sheep, Can J Anim Sci. 1979; 59: 255-263.
126. Soto-Navarro SA, Duff GC, Krehbiel CR, Galyean ML, Malcom-Callis KJ. Influence of feed intake fluctuation, feeding frequency, time of feeding and rate gain on performance by limit-fed steers. Prof Anim Sci. 2000; 16: 13–20.
127. SPSS for Windows. Released 16.0 Sep 13, 2007 Copy right (c.SPSS Inc. 1989–2007).
128. Steele MA, Alzahal O, Hook SE, Croom J, Mcbride BW. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. Acta Vet Scand. 2009; 6: 1-6.
129. Steele MA, Dionissopoulos L, Alzahal O, Doelman J and Mcbride BW. Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme 1. J Dairy Sci. 2012; 95: 318–327.
130. Stock RA, Laudert SB, Stroup WW, Larson EM, Parrott JC, Britton RA. Effect of monensin and monensin and tylosin combination on feed intake variation of feedlot steers. J Anim Sci. 1995; 73: 39–44.
131. Stone WC. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminal Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. J Dairy Sci. 2004; 87: E13–E26.
132. Sung HG, Bae HD, Lee JH, Kim DK, Shin HT. Application of LDH enzyme and viable LDH-producing bacteria to prevent lactate accumulation during in vitro rumen fermentation, Anim Feed Sci Technol. 2004; 117: 235-243.
133. Tafaj M, Zebeli Q, Maulbetsch A, Steingass H, Drochner W. Effects of fibre concentration of diets consisting of hay and slowly degradable concentrate on ruminal fermentation and digesta particle size in mid-lactation dairy cows. Arch Anim Nutr. 2006; 60: 3, 254-66.
134. Therion JJ, Kistner A, Kornelius JH. Growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria. Microbiol. 1982; 44: 2, 428-434.
135. Towne G, Nagaraja TG, Owensby C, Harmon D. Ruminal evacuation's effect on microbial activity and ruminal function. J Anim Sci. 1986; 62: 783-788.
136. Tremere AW, Merrill WG and Loosli JK. Adaptation to high concentrate feding as related to acidosis and digestive disturbances in dairy heifers. J Dairy Sci. 1968; 51(7): 1065-1072.
137. Umucalılar HD, Şeker E. Tampon etkili madde olarak kullanılan sodyum bikarbonat ve magnezyum oksitin ineklerde süt verimi üzerine etkileri, Vet Bil Derg. 2001; 17.1: 51-56.
138. Umucalılar HD, Coşkun B, Gülşen N. In situ rumen degradation and in vitro gas production of some selected grains from Turkey, J Anim Physiol Anim Nut. 2002; 86: 288-297.
139. Umucalılar HD, Gülşen N, Hayirli A, Alataş MS. Potential role of inulin in rumen fermentation, Revue Méd Vét. 2010; 161: 1, 3-9.
140. Van Soest PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant,(second ed.) Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.
141. Wallace RJ. Catabolism of Amino Acids by Megasphaera elsdenii LC1. Appl Environ Microbiol. 1986; 51(5):1141-1143.
142. Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, Anal Chem. 1967; 39: 971-974.
143. Williams AG. Rumen Holotrich Ciliate Protozoa. Microbiol Rev. 1986; 50: 25-49.
144. Williams PEV, Tait CAG, Innes GM, Newbold CJ. Effects of the inclusion of yeast culture (Saccharomyces cerevisiae plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the ruminal of steers. J Anim Sci. 1991; 69: 3016-3026.
145. Wiryawan KG, Broker JD. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep, Aust J Agric Res. 1995; 46: 1555-68.
146. Zebeli Q, Dijkstra J, Tafaj M, Steingass H, Ametaj BN, Drochner W. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. J Dairy Sci. 2008; 91: 2046–2066.
147. Zebeli Q, Mansmann D, Steingass H, Ametaj BN. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. Livest Sci. 2010; 127: 1–10.
148. Zebeli Q, Terrill SJ, Mazzolari A, Dunn SM, Yang WZ, and Ametaj BN. Intraruminal administration of Megasphaera elsdenii modulated rumen fermentation profile in midlactation dairy cows. J Dairy Res. 2012; 79: 01, 16-25.

10. ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Selçuk ALATAŞ 1981 yılında Karaman'da doğdu. İlköğrenimini 1992'de Karaman Cumhuriyet İlkokulunda, orta öğrenimini 1995'de Karaman Yunus Emre Orta Okulunda, lise öğrenimini ise 1999'da Karaman (Süper) Lisesinde tamamladı. 1999'da kazanmış olduğu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2005 yılında mezun oldu. Mezuniyet sonrası 2005-2006 yılları arasında Karaman Çavaş Yem Fabrikası'nda sorumlu Veteriner Hekim olarak çalıştı. 2006 yılı eylül ayında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Doktora programı devam ederken 2008 yılında açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, 28.12.2008 tarihinde Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görev yapmaktadır. Evli ve bir kız çocuk babasıdır.