



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

FARKLI KABA YEM KAYNAKLARINA (*LEUCAENA
LEUCOCEPHALA, KHAYA SENEGALENSİS, MEDİCAGO
SATİVA*) DAYALI RASYONLARA NİTRAT VE/VEYA
BİTKİSEL YAĞ İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI
RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI

Danışman

Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU

SAMSUN

2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI



**FARKLI KABA YEM KAYNAKLARINA (*LEUCAENA
LEUCOCEPHALA, KHAYA SENEGALENSIS, MEDİCAGO
SATİVA*) DAYALI RASYONLARA NİTRAT VE / VEYA
BİTKİSEL YAĞ İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE RUMEN
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI

Danışman

Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI tarafından, Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU danışmanlığında hazırlanan “Farklı Kaba Yem Kaynaklarına (*Leucaena leucocephala*, *Khaya senegalensis*, *Medicago sativa*) Dayalı Rasyonlara Nitrat ve/veya Bitkisel Yağ İlavesinin Metan Üretimi ve bazı Rumen Parametreleri Üzerine Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10/02/2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy çokluğu ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Adem KAMALAK Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU Ondokuz Mayıs Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Unal KILIÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Mustafa BOĞA Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda İşleme Bölümü		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Arda YILDIRIM Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY
... / ... / 2021
Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

10/02/2021

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCH

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez başlığı: Farklı Kaba Yem Kaynaklarına (*Leucaena leucocephala*, *Khaya senegalensis*, *Medicago sativa*) Dayalı Rasyonlara Nitrat ve/veya Bitkisel Yağ İlavesinin Metan Üretimi ve Rumen Parametreleri Üzerine Etkisi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 18/12/2020 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 6

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

10/02/2021

Doç.Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU

ÖZET

FARKLI KABA YEM KAYNAKLARINA (*LEUCAENA LEUCOCEPHALA*,
MEDİCAGO SATİVA VE *KHAYA SENEGALENSİS*) DAYALI RASYONLARA
NİTRAT VE/ VEYA BİTKİSEL YAĞ İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI
RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı

Doktora, Şubat / 2021

Danışman: Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU

Bu çalışma farklı kaba yemleri (*Leucaena leucocephala* (LL), *Khaya senegalensis* (KS), ve *Medicago sativa*(MS)) içeren rasyonlara nitrat ve/veya bitkisel yağ ilavesinin *in vitro* rumen şartlarında metan (CH₄) üretimi ve rumen parametreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacı ile 3 farklı denemeler kapsamında yürütülmüştür. İlk denemede LL temelli rasyonlara nitrat ilavesinin (46.74 g NO₃⁻/kg rasyon KM'si) CH₄ üretimi ve bazı rumen parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada, erken (%60 karma yem /%40 LL) ve orta (%40 karma yem /%60 LL) laktasyon dönemleri (LD) için hazırlanan rasyonlar kullanılmıştır. İkinci denemede, erken (%60 karma yem /%40 KS) ve orta (%40 karma yem /%60 KS) LD'de kullanılan rasyonlara nitrat (46.89 g NO₃⁻/kg rasyon KM'si) ilavesinin CH₄ üretimi ve bazı rumen parametreleri üzerindeki etkileri 2 x 2 faktöryel deneme planına göre incelenmiştir. Çalışmada, gaz üretimi ölçümünde kullanılan şırıngalarda 48 saat süreyle inkübe edilen rumen sıvısı + rasyon karışımında *in vitro* gas üretimi (İVGÜ), CH₄ üretimi ve rumen parametreleri belirlenmiştir. Her iki denemede de, nitrat ilavesinin *in vitro* gaz ve CH₄ üretimini azalttığı bulunmuştur (p<0.05). Üçüncü denemede MS temelli rasyonlara nitrat ve bitkisel yağ (findık ve soya yağı) ilavesinin CH₄ üretimi ve bazı rumen parametreleri üzerindeki etkileri 2 x 2 x 3 faktöryel deneme planına göre incelenmiştir. Hazırlanan rasyonlara nitrat (45.65 g NO₃⁻/kg rasyon KM'si), soya yağı (36.58 g soya yağı/kg rasyon KM'si) ve findık yağı (36.52 g soya yağı/kg rasyon KM'si) ilave edilmiştir. Kırksekiz saatlik inkübasyon sonucunda 2 laktasyon döneminde her 2 bitkisel yağ çeşidi ilavesi İVGÜ ve CH₄ üretimini düşürmekle birlikte doymamış yağ asitlerince daha zengin olan SY'nın düşürücü etkisi FY'na göre daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Her 2 LD'de, nitrat ve yağın birlikte kullanılması durumunda İVGÜ ve CH₄ üretimi, bu katkı maddelerinin tek başlarına kullanılmaları durumuna göre daha yüksek oranda düşmüştür (p<0.05).

Anahtar kelimeler: *In vitro* gaz üretimi, Metan, Rumen parametreleri, Kaba yemleri.

ABSTRACT

EFFECTS OF NITRATE AND / OR VEGETABLE OIL ADDITION TO DIFFERENT ROUGHAGE SOURCES (*LEUCAENA LEUCOCEPHALA*, *KHAYA SENEGALENSIS*, *MEDICAGO SATIVA*) RATIONS-BASED ON METHANE PRODUCTION AND RUMEN PARAMETERS.

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduates Studies

Department of Animal Science

Doctor of Philosophy, February/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU

The aim of this study is to determine the effects of nitrate and / or vegetable oil addition to rations containing different roughages (*Leucaena leucocephala* (LL), *Khaya senegalensis* (KS), and *Medicago sativa* (MS)) on methane (CH₄) production and rumen parameters under *in vitro* conditions. For that, this study was conducted with 3 different experiments. In the first experiment, the effects of nitrate addition (46.74 g NO₃⁻/kg DM ration) to LL rations-based on CH₄ production and some rumen parameters were investigated. In this experiment, rations prepared for early lactation (60% Compound feed/40% LL) and mid-lactation (40% Compound feed/60% LL) periods (LP) were used. In second experiment, the effect of nitrate supplementation (46.89 g NO₃⁻/kg DM ration) to rations used in early lactation (60% Compound feed / 40% KS) and mid-lactation (40% Compound feed/60% KS) periods on CH₄ production and some rumen parameters. It was examined according to a 2 x 2 factorial design. In this study, *in vitro* gas production, CH₄ production and rumen parameters were determined in ruminal fluid + rations mixture incubated for 48 hours in syringes used for measurement of gas production. In both experiments, nitrate addition was decreased *in vitro* gas (IVGP) and CH₄ productions (p <0.05). In the third experiment, the effects of nitrate and two vegetable oil (hazelnut and soybean oil) addition to MS rations-based on CH₄ production and some rumen parameters were investigated according to 2 x 2 x 3 factorial design. Nitrate (45.65 g NO₃⁻/kg DM ration), soybean oil (36.58 g soybean oil/kg DM ration) and hazelnut oil (36.52 g soybean oil/kg DM ration) were added to rations used. As a result of 48-hour incubation, 2 vegetable oils addition in both lactation periods decreased IVGP and CH₄ production. The lowering effect of SO, which is rich in unsaturated fatty acids, was found to be higher than HO (p <0.05). In both lactation periods, when nitrate and oil were used together, IVGP and CH₄ production decreased more than if these additives were used alone (p <0.05).

Keywords: *In vitro* gas production, methane, rumen parameters, forages.

İTHAF

Bu çalışmayı anneme, abime, Ablalarıma, kız kardeşime ve onların çocuklarına ithaf ediyorum. Sevgili aileme, özellikle anneme, çalışmalarına devam etmem için beni teşvik ettikleri için çok teşekkür ederim. Meleklerim olan ve beni koruyan rahmetli babam ve genç erkek kardeşimi (huzur içinde dinlenmeye devam etsinler) unutamayıp teşekkür ederim.



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle her konuda destek olan danışman hocam Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU'a, Prof. Dr. Ünal KILIÇ'a, Prof. Dr. Nuh OCAK'a analizler sırasında yardımına başvurduğum doktora öğrencisi Abdiwali MOHAMOUD ABDİ'ye, istatistiksel analizleri yapılması ve yorumlanması aşamalarında destek veren Prof. Dr. Hasan ÖNDER ve Arş. Gör. Dr. Samet Hasan ABACI'ya, göstermiş oldukları yakın ilgi, yardımseverlik ve samimiyetten dolayı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Güray ERENER ve bölüm öğretim üyelerine, çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Ünal KILIÇ, Prof. Dr. Mustafa BOĞA ve tez savunma jürisinde yer alan Prof. Dr. Adem KAMALAK, Prof. Dr. Arda YILDIRIM hocalarıma değerli katkı ve değerlendirmelerinden dolayı teşekkür ederim. Bu tez çalışması PYO. ZRT.1904.19.010 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

10/02/2021, Samsun

Euloge A. OGOUKAYODE OLOMONCHI

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İTHAF	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GENEL GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Literatür taraması	5
2.2. Nitrat ilavesinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi	6
2.3. Yağ ilavesinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi ..	8
2.3.1. Yağlar hakkında genel bilgi	8
2.3.2. ÇDYA 'nın yapısı: Soya Yağı (SY) Örneği	9
2.3.2.1. Soya yağı hakkında genel bilgi	9
2.3.2.2. ÇDYA'nın bazı rumen parametreleri ve besin maddelerinin sindirilebilirliği üzerindeki etkisi	10
2.3.3. TDYA'nın Yapısı: Fındık Yağı Örneği	15
2.3.3.1. Fındık yağı hakkında genel bilgi	15
2.3.3.2. TDYA 'nın bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi	15
2.4. <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Khaya senegalensis</i> ve <i>Medicago sativa</i> ile ilgili bilgi	17
2.4.1. <i>Leucaena leucocephala</i> ile ilgili bilgi	17
2.4.1.1. Tanım ve habitatlar	17
2.4.1.2. <i>Leucaena</i> cinsinin taksonomisi	18
2.4.1.3. <i>Leucaena leucocephala</i> bitkisinin farklı kısımlarının kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği	19
2.4.1.4. <i>LL</i> yapraklarının ruminant rasyonlarında kullanımı	20
2.4.1.5. <i>LL</i> yapraklarının bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi	21

2.4.2. <i>Khaya senegalensis</i> ile ilgili bilgi	22
2.4.2.1. Tanım ve habitatlar	22
2.4.2.2. <i>Khaya</i> cinsinin taksonomisi.....	23
2.4.2.3. <i>KS</i> yapraklarının kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği	23
2.4.2.4. <i>Khaya senegalensis</i> yapraklarının ruminant rasyonlarında kullanımı	25
2.4.2.5. <i>KS</i> yapraklarının bazı rumen parametreleri ve CH ₄ üretimi üzerindeki etkisi	25
2.4.3. <i>Medicago sativa</i> ile ilgili bilgi	26
2.4.3.1. Tanım ve habitatlar	26
2.4.3.2. <i>Medicago sativa</i> bitkisinin taksonomisi	27
2.4.3.3. <i>Medicago sativa</i> bitkisinin kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği	27
2.4.3.4. <i>Medicago sativa</i> bitkisinin ruminant rasyonlarında kullanımı.....	28
2.4.3.5. <i>Medicago sativa</i> bitkisinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi	29
2.5. Hedefler	30
2.6. Hipotez	31
3. LEUCAENA LEUCOCEPHALA TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	32
3.1. Giriş	32
3.2. Materyal.....	33
3.2.1. Yem materyali	33
3.2.2. Rumen sıvısı temini	34
3.3. Yöntem	35
3.3.1. Muameleler	35
3.3.2. Rasyonların besin maddeleri içeriklerinin belirlenmesi.....	37
3.3.3. Yemlerin <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi	38
3.3.4. <i>İn vitro</i> gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması.....	41
3.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH ₄ üretiminin belirlenmesi.....	44
3.3.6. Rumen sıvısında NH ₃ miktarının belirlenmesi.....	44
3.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi.....	45
3.3.8. Protozoa sayımının belirlenmesi	46

3.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği	46
3.4. İstatistiksel analiz	47
3.5. Sonuçlar ve tartışma	48
3.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği.....	48
3.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının <i>in vitro</i> gaz üretimi (İVGÜ) üzerindeki etkileri.....	49
3.5.3. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının İVGÜ parametreleri (c ve a+b), metan (CH ₄) üretimi, <i>in vitro</i> organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolik enerji (ME) ve net enerji laktasyon (NE _L) üzerindeki etkileri.....	52
3.5.4. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri	55
3.5.5. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirlik (İVGS), <i>in vitro</i> NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri	61
3.5.6. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri	63
3.6. Sonuç.....	65
4. KHAYA SENEGALENSİS TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	66
4.1. Giriş.....	66
4.2. Materyal.....	67
4.2.1. Yem materyali	67
4.2.2. Rumen sıvısı temini	67
4.3. Yöntemler.....	69
4.3.1. Muameleler	69
4.3.2. Rasyonların besin maddeleri içeriklerinin belirlenmesi.....	70

4.3.3. Yemlerin <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi	71
4.3.4. <i>İn vitro</i> gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması	73
4.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH ₄ üretiminin belirlenmesi.....	75
4.3.6. Rumen sıvısında NH ₃ miktarının belirlenmesi	76
4.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi.....	76
4.3.8. Protozoa sayımının belirlenmesi	77
4.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği	77
4.4. İstatistiksel analiz	77
4.5. Sonuçlar ve tartışma	78
4.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği.....	78
4.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının <i>in vitro</i> gaz üretimi (İVGÜ) üzerindeki etkileri.....	80
4.5.3. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlarının İVGÜ parametreleri (c ve a+b), CH ₄ üretimi, <i>in vitro</i> organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolize edilebilir enerji (ME), ve net enerji laktasyon (NE _L) değerleri.	83
4.5.4. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri.	87
4.5.5. Erken ve orta dönemlerinde rasyonların <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirlik (İVGS), <i>in vitro</i> NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri.....	94
4.5.6. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri.	95
4.6. Sonuç.....	97
5. MEDİCAGO SATİVA TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT VE BİTKİSEL YAĞ İLAVESİNİN, METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....	98
5.1. Giriş.....	98

5.2. Materyal.....	99
5.2.1. Yem materyali	99
5.2.2. Rumen sıvısı temini	99
5.3. Yöntemler.....	100
5.3.1. Muameleler	100
5.3.2. Rasyonların besin madde içeriklerinin belirlenmesi	104
5.3.3. Yemlerin <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi	104
5.3.4. <i>In vitro</i> gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması	106
5.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH ₄ üretiminin belirlenmesi.....	109
5.3.6. Rumen sıvısında NH ₃ miktarının belirlenmesi	109
5.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi.....	109
5.3.8. Protozoa sayımının belirlenmesi	110
5.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği	110
5.4. İstatistiksel analiz	111
5.5. Sonuçlar ve Tartışma.....	111
5.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği.....	111
5.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırı rasyonlarına nitrat ve iki farklı yağlar (Fındık ve soya) ilavesinin <i>in vitro</i> gaz üretimini (İVGÜ)	114
5.5.3. Nitrat ve yağlar (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırı rasyonun IVGÜ parametreleri (c, a+b), CH ₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME, NE _L değerleri üzerindeki etkisi	116
5.5.4. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkisi	123
5.5.5. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirlik (İGVS), <i>in vitro</i> NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlik değerleri.	132

5.5.6. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı iki (erken ve orta) laktasyon dönemi süt sığırı rasyonlarının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) ile ilgili veriler.	134
5.6. Sonuç.....	138
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.



SİMGELER VE KISALTMALAR

KISALTMALAR

AA	: Asetik asit
ADF	: Asit çözücülerde çözünmeyen lif
ADL	: Asit çözücülerde çözünmeyen lignin
AOAC	: Resmi Analitik Kimyacılar Derneği
BA	: Bütirik asit
C	: Karbon
CA	: Canlı ağırlık
CH ₄	: Metan
CO ₂	: Karbon dioksit
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
DOYA	: Doymamış yağ asitleri
FY	: Fındık Yağı
GTÖ	: Gıda ve tarım örgütü
H	: Hidrojen
HK	: Ham kül
HP	: Ham protein
HS	: Ham selüloz
HSEL	: Hemiselüloz
HY	: Ham yağ
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
İVGS	: <i>İn vitro</i> gerçek besin madde sindirilebilirliği
İVOMS	: <i>İn vitro</i> organik madde sindirilebilirliği
KLA	: Konjuge linoleik asit
KM	: Kuru madde

KMS	: Kuru madde sindirilebilirliği
KMT	: Kuru madde tüketimi
KS	: <i>Khaya senegalensis</i>
KT	: Kondanse tanen
KZYA	: Kısa zincirliği yağ asitleri
LL	: <i>Leucaena leucocephala</i>
LNA	: Linolenik asit
LOK	: Lif olmayan karbonhidrat
ME	: Metabolize edilebilir enerji
MFS	: Metil yeşil-formalin çözeltisi
MPS	: Mikrobiyal protein sentezi
MS	: <i>Medicago sativa</i>
N	: Azot
NaNO ₃	: Sodyum nitrat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NDF	: Nötr çözücülerde çözünmeyen lif
NE _L	: Net enerji laktasyon
NH ₃	: Amonyak
NH ₃ -N	: Amonyak azotu
NO ₂	: Nitrit
NO ₃	: Nitrat
NÖM	: Nitrojensiz öz maddeler
NRC	: Ulusal Araştırma Konseyi
OM	: Organik madde
PA	: Propiyonik asit
RKP	: Rumende parçalanmayan (Korunan) protein
RPP	: Rumende parçalanmış protein
SEL	: Selüloz

SOM	: Sindirilebilir Organik madde
SY	: Soya yağı
TDYA	: Tekli doymamış yağ asitleri
TUYA	: Toplam uçucu yağ asitleri
UYA	: Uçucu yağ asitleri
YA	: Yağ asitleri
4KS6KYU	: %40 <i>Khaya senegalensis</i> + %60 Karma yem + Üre
4KS6KYN	: %40 <i>Khaya senegalensis</i> + %60 Karma yem + Nitrat
6KS4KYU	: %60 <i>Khaya senegalensis</i> + %40 Karma yem + Üre
6KS4KYU	: %60 <i>Khaya senegalensis</i> + %40 Karma yem + Nitrat
4LL6KYU	: %40 <i>Leucaena leucocephala</i> + %60 Karma yem + Üre
4LL6KYN	: %40 <i>Leucaena leucocephala</i> + %60 Karma yem + Nitrat
6LL4KYU	: %60 <i>Leucaena leucocephala</i> + %40 Karma yem + Üre
6LL4KYN	: %60 <i>Leucaena leucocephala</i> + %40 Karma yem + Nitrat
4MS6KYU	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Üre
4MS6KYN	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Nitrat
6MS4KYU	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Üre
6MS4KYN	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Nitrat
4MS6KYUFY	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Üre + Fındık yağı
4MS6KYNFY	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Nitrat + Fındık yağı
4MS6KYUSY	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Üre + Soya yağı
4MS6KYNSY	: %40 <i>Medicago sativa</i> + %60 Karma yem + Nitrat + Soya yağı
6MS4KYUFY	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Üre + Fındık yağı
6MS4KYNFY	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Nitrat + Fındık yağı
6MS4KYUSY	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Üre + Soya yağı
6MS4KYNSY	: %60 <i>Medicago sativa</i> + %40 Karma yem + Nitrat + Soya yağı

SİMGELER

m	: Metre
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetre küp
g	: Gram
kg	: Kilogram
t	: ton
mg	: Miligram
mmol	: Millimolar
l	: Litre
dl	: Desilitre
ml	: Mililitre
Kcal	: Kilokalori
KJ	: Kilojul
%	: Yüzde
°C	: Derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	SY yapısının şematik gösterimi 10
Şekil 2.2.	LL yaprağı ve genç sürgünler..... 17
Şekil 2.3.	LL tohumları ve kabukları 17
Şekil 2.4.	<i>Khaya senegalensis</i> meyveleri, yaprakları ve çiçekleri 23
Şekil 2.5.	<i>Medicago sativa</i> yapraklar, çiçekleri ve tohumları 27
Şekil 3.1.	Yem katkı maddelerin (Nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması..... 36
Şekil 3.2.	Rasyonların muhafazası veya depolanması 36
Şekil 3.3.	HK, KM, NDF, ADF, ADL, ve HS analizleri 38
Şekil 3.4.	HY ve HP analizleri 38
Şekil 3.5.	Daisy inkübatörde sindirilebilirlik çalışması..... 40
Şekil 3.6.	<i>In vitro</i> gaz üretimi 41
Şekil 3.7.	CH ₄ üretiminin belirlenmesi 44
Şekil 3.8.	İnkübasyonun 48. saatinde rumen sıvısında NH ₃ miktarının belirlenmesi..... 45
Şekil 3.9.	Metil yeşil formalin çözeltisi ve Fuchs-Rosenthal 46
Şekil 3.10.	Protozoa sayısının belirlenmesi ve protozoa popülasyonu 46
Şekil 4.1.	Yem katkı maddelerin (Nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması..... 69
Şekil 4.2.	Rasyonların muhafazası veya depolanması..... 69
Şekil 5.1.	Yağların (SY, FY) etanol ile karıştırılması ve yağ (SY, FY) + etanol karışımının rasyona eklenmesi 101
Şekil 5.2.	Rasyonların depolanması ve etüvde (60°C) rasyonların 3 gün boyunca kurutulması 101
Şekil 5.3.	Yem katkı maddelerinin (nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması..... 102
Şekil 5.4.	Rasyonların muhafazası 102

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Doğada en fazla bulunan doymamış yağ asitleri	9
Tablo 2.2.	Soya yağının % YA bileşimi	10
Tablo 2.3.	Fındık yağının % YA bileşimi	15
Tablo 2.4.	<i>LL</i> bitkisinin taksonomik sınıflandırılması	18
Tablo 2.5.	<i>Leucaena</i> cinsine giren 22 türün çiçeklenme ve meyve verme şekilleri.....	19
Tablo 2.6.	Farklı ülkelerde yetişen <i>LL</i> bitkisinin kimyasal bileşimi	20
Tablo 2.7.	<i>LL</i> yapraklarının besin maddeleri içerikleri	20
Tablo 2.8.	<i>LL</i> yaprakları ve tohumunun kimyasal bileşenleri	22
Tablo 2.9.	<i>KS</i> yapraklarının besin maddeleri içerikleri	24
Tablo 2.10.	Farklı <i>KS</i> türlerinde bulunan sekonder bileşikler	24
Tablo 2.11.	<i>KS</i> yapraklarının besin maddeleri içerikleri	26
Tablo 2.12.	<i>MS</i> bitkisinin farklı alt türleri	27
Tablo 2.13.	Yonca bitkisinin besin maddeleri içerikleri.....	28
Tablo 2.14.	Yonca yapraklarının besin maddeleri içerikleri	28
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan karma yemlerin besin maddeleri içerikleri.....	34
Tablo 3.2.	Nitrat ilaveli erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarda bulunan kaba ve karma yem ham maddeleri ve oranları (%).....	36
Tablo 3.3.	Muamele grupları ve rasyon içeriği	37
Tablo 3.4.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için hazırlanan rasyonların besin maddeleri içerikleri (%KM)..	48
Tablo 3.5.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların <i>in vitro</i> gaz üretimi üzerindeki etkisi.....	49
Tablo 3.6.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların <i>in vitro</i> CH ₄ üretimi İVOMS, SOM, ME ve NE _L değerleri üzerindeki etkileri	53
Tablo 3.7.	Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri MPS, KZYA, pH ve PS üzerindeki etkileri	60
Tablo 3.8.	Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlarda nitrat kullanımının <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirlik (İVGS), <i>in</i>	

	<i>vitro</i> NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri.....	63
Tablo 3.9.	Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlarda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri	64
Tablo 4.1.	Nitrat ilaveli ve ilavesiz (Kontrol) erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarını oluşturan kaba ve karma yem ham maddeleri ve oranları (%)	69
Tablo 4.2.	Muamele grupları ve rasyon içeriği (g/kg DM).....	70
Tablo 4.3.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için rasyonların besin maddeleri içerikleri.....	79
Tablo 4.4.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının <i>in vitro</i> gaz üretimi üzerindeki etkileri.....	81
Tablo 4.5.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının İVGÜ parametreleri (c ve a+b) , metan üretimi, <i>in vitro</i> organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolize edilebilir (ME) ve net enerji laktasyon (NE _L) değerleri	84
Tablo 4.6.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için hazırlanan rasyonların rumen parametreleri üzerindeki etkileri.....	90
Tablo 4.7.	Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemleri için hazırlanan rasyonların <i>in vitro</i> sindirilebilirlikleri	95
Tablo 4.8.	Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri.....	96
Tablo 5.1.	Nitrat ve yağ katkılı ilaveli (findık ve soya yağı)erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarını oluşturan kaba ve karma yem ham maddeleri ve oranları (%)	101
Tablo 5.2.	Muamele grupları ve rasyon içerikleri.....	103
Tablo 5.3.	Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının besin maddeleri içerikleri, (KM'nin %'si olarak)	113

Tablo 5.4.	Nitrat ve yağ (Fındık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının <i>in vitro</i> gaz üretimi üzerindeki etkisi.....	115
Tablo 5.5.	Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının İVGÜ parametreleri (c, ve a+b), CH ₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME ve NE _L değerleri üzerindeki etkisi.....	117
Tablo 5.6.	Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) değerleri üzerindeki etkisi.....	125
Tablo 5.7.	Nitrat ve yağ (findık yağ ve soya yağı) ilaveli erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının <i>in vitro</i> gerçek sindirilebilirlik (İVGS), <i>in vitro</i> NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlik değerleri.....	133
Tablo 5.8.	Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri.....	136

1. GENEL GİRİŞ

İnsanların beslenmesinde büyük öneme sahip olan kırmızı et ve sütün en önemli kaynağı olan ruminant hayvanların sindirim kanalında en fazla hacme sahip olan rumen sindirim faaliyetlerinin önemli bir kısmından sorumludur. Rumen, sindirim faaliyetlerinde kendisinden beklenen etkinliği ortaya koyabilmesi için bazı şartları (pH (6.2-6.8), anaerobik ortam, rumen içi sıcaklık (39°C), rumen hareketleri, osmotik basınç) taşımak zorundadır. Rumendeki sindirim faaliyetlerinden birinci derecede sorumlu olan rumen mikroorganizmaları (bakteriler, protozoalar ve mantarlar) bahsedilen bu rumen içi şartlardan önemli düzeyde etkilenmektedir. İşte bu nedenle rumen içi şartlarının ideale yakın olması beklenir. Normal değerlerden sapma rumen sindirim faaliyetlerini ve dolayısıyla hayvanların sağlık ve verim durumlarını olumsuz yönde etkilemektedir.

Rumen fermentasyonu son ürünleri arasında en önemli yeri NH₃, UYA ve CH₄ almaktadır. Bahsedilen son ürünlerin rumendeki düzeylerini etkileyen en önemli faktör rasyonun yapısıdır. Yapılan çalışmalar, rasyonda kullanan kaba yem türünün (baklagil ve buğdaygil) rumen fermentasyonunu etkilediğini ortaya koymuştur. İnsanların dengeli ve yeterli besleme konusundaki bilinç ve hassasiyet düzeylerindeki artış dengeli rasyonların hazırlanması ihtiyacını artırmaktadır. Dengeli rasyonların hazırlanmasında hayvansal gıdaların belirli oranlarda yer alması bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gerçekten de bilimsel çalışmalar hayvansal gıdaların içerdikleri besin maddeleri bakımından bitkisel gıdalara göre üstün olduklarını ortaya koymaktadır. Hayvansal gıdalar kendi içinde değerlendirildiğinde ruminant hayvanlardan elde edilen et ve sütün bazı özellikler bakımından ön sıralara geçtiği görülmektedir. Bu değerli hayvansal ürünlerin (et ve süt) elde edildiği birincil kaynak olan ruminant (sığır, manda, koyun ve keçi) hayvanların rasyonlarını oluşturan kaba ve karma yemlerde bulunan besin maddeleri sindirim olaylarının yaklaşık %90'lık kısmının gerçekleştiği rumende farklı biyokimyasal ve metabolik işlemlere maruz kalmakta ve sonuçta bazı son ürünler (UYA, NH₃, gazlar (metan (CH₄), CO₂ ve H₂S) oluşmaktadır.

Ruminal fermentasyon, rasyonda yer alan besin maddelerinin yararlı ürünlere (UYA, mikrobiyal proteinler ve B vitamini), yararsız ürünlere (CH₄ ve CO₂) ve zararlı ürünlere (amonyak ve nitrat) dönüşmesine izin veren fiziksel ve mikrobiyolojik faaliyetlerden oluşur (Owens and Zinn, 1988). Bu son ürünlerin her biri hayvanın

verim düzeyi ve elde edilen ürünlerin kalitesi üzerinde etkili olmaktadır. Rumende bulunan mikroorganizmalar karbonhidratları daha sonra rumen duvarından absorbe edilerek kana karışan UYA'ne çevirmektedirler. UYA (asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit vd.), mikroorganizmalar tarafından üreme ve büyüme ihtiyaçlarının karşılanması, ruminant hayvan tarafından ise metabolize edilebilir enerji ihtiyaçlarının (yaklaşık %75) karşılanması amacıyla kullanılmaktadır (Bergman, 1990; Moran, 2005). Normal bir sığır rumeninde bir günde enerji karşılığı yaklaşık 8400-20000 kcal olan 2000-4000 g civarında UYA sentezlenmektedir. Ergün vd. (2007) hayvan türü ve besleme rejimine bağlı olarak rumende ortalama 100-120 mmol/l düzeyinde UYA olduğunu belirlemiştir.

Gumilar et al. (2018), rumende mikrobiyel gelişimin normal seyrinde devam edebilmesi için rumen UYA konsantrasyonunun 70-150 mmol/l arasında olması gerektiğini bildirmektedir. Ruminant UYA düzeyini etkileyen faktörler arasında rasyon bileşimi, yemlemeden sonra geçen süre, parçalanmış yem miktarı, yemin fiziksel yapısı, yem türü ve bireysel farklılıklar yer almaktadır. Genel anlamda değerlendirildiğinde kaba yem ağırlıklı rasyonun kullanılması durumunda AA, şeker içeriği yüksek rasyon kullanıldığında BA, nişastaca zengin dane yemleri yüksek oranda içeren rasyonların kullanılması durumunda ise PA üretimi artış göstermektedir (Ergün vd., 2007). Uçucu yağ asitlerinin her biri gerek rumen metabolizması, gerekse genel metabolizma açısından farklı fonksiyon ve görevlere sahiptir.

Sütte bulunan yağ asitlerinin sentezinde kullanılan temel substrat AA'den orijin alan asetil ko-A'dır. AA, izositrat yolu aracılığı ile gerçekleşen lipogenesis (lipid sentezi) için ihtiyaç duyulan karbonun önemli bir kısmını, NADPH bileşiğinin ise yaklaşık yarısını karşılar. NADPH ihtiyacının geri kalan kısmı pentoz fosfat yolu aracılığı ile glukoz metabolizmasından karşılanır. Aynı zamanda, hayvanın enerji ihtiyacının yaklaşık %70'lik kısmı kısa zincirli yağ asitleri tarafından karşılanmaktadır. AA, kısa zincirli yağ asitlerinin yaklaşık %60'ını oluşturmada ve aynı zamanda kısa zincirli yağ asitlerinin metabolizması tarafından gerçekleştirilen enerji üretiminin %45'lik kısmını sağlamaktadır. Bu bilgiler AA'nın süt yağı sentezinde ve hayvanın enerji ihtiyaçlarının karşılanmasında nedenli önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Urrutia and Harvatine, 2017). Rumende PA oranının artması laktik asit ve glukoz üretiminin artmasına ve buna bağlı olarak da insülin üretiminin teşvik edilmesine neden olur. İnsülin üretimindeki artış ise adipoz dokudan serbest yağ

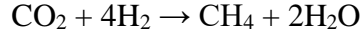
asitlerinin serbest kalmaları ile sonuçlanır ve bu durum süt yağ içeriğinde düşmeye yol açar.

Süt yağ bileşeninin temel yapı taşları (rumen fermantasyonundan sağlanan AA ve BA, rasyonla alınan uzun zincirli yağ asitleri ve endojen kaynaklardan sağlanan AA ve uzun zincirli yağ asitleri) rumen fermantasyonunda meydana gelen değişimlerden etkilenmekte ve sonuçta süt yağ içeriği ve kompozisyonu belirlenmektedir (Linn, 1998). Rumen sıvısındaki NH_3 konsantrasyonu rasyonun yapısıyla değişmekte olup (Wallace, 1996), bu durum özellikle parçalanabilir protein içeriği bakımından zengin rasyonların söz konusu olması durumunda belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (McDonald et al., 2012). Ruminant rasyonlarında bulunan proteinler, rumende parçalanmış protein (RPP) ve rumende parçalanmayan (korunan) protein (RKP) olarak 2 grup altında incelenmektedir (Beever and Cottrill, 1994). Rumene gelen RPP, peptidler, amino asitler ve NH_3 oluşturmak üzere parçalanmakta, RKP ise parçalanmadan (korunarak) sindirim sisteminin alt kısımlarına ulaşmaktadır (Tamminga, 1979). Rumende normal besleme şartlarında 8.5-30 mg/100 ml arasında NH_3 bulunmaktadır.

Gumilar et al. (2018), rumende bulunması muhtemel en düşük NH_3 konsantrasyonunun 5 mg/100 ml civarında olduğunu bildirmektedir. Diğer bazı çalışmalarda da rumen NH_3 konsantrasyonu (8.5-30.0 mg/100 ml) ile ilgili farklı değerler verilmiştir (McDonald et al., 2012). Bu durum rumen NH_3 konsantrasyonunun farklı faktörler tarafından etkilendiğini ortaya koymaktadır. Bahsedilen bu faktörler arasında, rasyon protein içeriği, rasyondaki protein fraksiyonlarının (RPP ve RKP) oranı, rasyonun enerji düzeyi ve rasyonda kullanılan karbonhidrat kaynakları (selülozca zengin kaba yemler ve nişastaca zengin dane yemler) yer almaktadır. Rumende gerçekleşen fermentasyon faaliyetleri sonucunda üretilen son ürünlerden birisi olan gazların (CO_2 , H_2 , CH_4 , N_2O vb.) rumende bulunma oranları diğer son ürünlerde olduğu gibi başta rasyonun yapısı (kaba yem/karma yem oranı, kaba yemlerde partikül büyüklüğü ve rumen pH'sı) olmak üzere farklı faktörler (KMT düzeyi, rumende bulunan mikroorganizma türleri vb.) tarafından etkilenmektedir.

Rumende bulunan mikroorganizmalar arasındaki karşılıklı etkileşimler (sinerjetik veya antagonistik) gazların üretilme oranını etkilemektedir. Johnson and Johnson (1995), polisakkaritleri fermente eden (H kullanıcılar) ve metanojenik

bakteriler (H üreticileri) arasındaki simbiyotik ilişki sonucunda rumende CO₂ ve CH₄ üretim düzeyinin belirlendiğini bildirmektedir. Rumende fermantatif faaliyetler sonucunda açığa çıkan H₂ ve CO₂ metanojenik mikroorganizmalar tarafından CH₄ üretiminde kullanılmaktadır (Hegarty and Gerdes, 1999).



Bazı çalışmalar ruminantlar tarafından tüketilen enerjinin yaklaşık % 12-14'lük kısmının CH₄ oluşumuna bağlı olarak kayba uğradığını ortaya koymuştur (Li et al., 2012; Nolan et al., 2010). Diğer çalışmalar katkı maddesi olarak nitrat ve bitkisel yağ kullanımının CH₄ oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan enerji kayıplarını düşürdüğünü ortaya koymuştur. Nitrat son zamanlarda ruminantlarda CH₄ üretimini azaltma yeteneğine sahip olan bir elektron alıcısı olarak dikkat çekmeye başlamıştır (Li et al., 2012; Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010; 2011). Diyetsetel yağ katkısının ruminal CH₄ üretimi üzerindeki etkisi bazı faktörler (laktasyon dönemi, rasyona ilave edilen yağın doymamışlık derecesi ve rasyonun yapısı vb.) etkilenmektedir. Rasyondaki yağ içeriği ile CH₄ üretimi arasındaki ilişki ilave edilen yağın formu (serbest yağ veya tohum) ve ilave edilen yağdaki temel yağ asitlerinden (C_{12:0}, C_{14:0}, C_{18:1}, C_{18:2} ve C_{18:3}) etkilenmektedir (Beauchemin et al., 2008). C_{12:0} ve C_{14:0} CH₄ üretimi üzerinde daha yüksek düzeyde azaltıcı etkiye sahiptir (Martin et al., 2009).

Ruminant rasyonlarında yağ katılması CH₄ verimini düşürür (Grainger ve Beauchemin, 2011). Doymamış yağ asitleri arasında yer alan ve rumende H emicisi olarak fonksiyon gösteren C_{18:2} yağ asiti rumende doyurulur. Biyohidrojenizasyon sürecinde yer alan izomerizasyon işlemi önemli bir arabileşik olan konjuge linoleik asit (KLA) oluşumuna neden olur. Ruminal ekosistemin stabilizasyonun sağlanması amacı ile belirli kaba yemler (*Leucaena leucocephala*, *Khaya senegalensis* ve *Medicago sativa*) kullanılmaktadır. Bu bitkiler CH₄ üretimin azaltılmasında rol oynadıkları gibi hayvanların verimlerinin artırılmasında da etkili olmaktadır (Ansah et al., 2018; Bodas et al., 2012; Galindo et al., 2016). Bu çalışmada, doymamışlık dereceleri farklı olan 2 farklı bitkisel yağ kaynağı (tekli doymamış yağ asitlerince zengin fındık yağı ve çoklu doymamış yağ asitlerince zengin soya yağı) kullanılmıştır. Çalışmada, CH₄ üretiminin azaltılmasında nitrat ve bitkisel yağların bireysel anlamdaki etkilerinin yanında bu 2 (nitrat ve bitkisel yağ) rasyon katkısının eklemeli etkisinin de ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Literatür taraması

Sera gazı emisyonlarının iklim değişikliği üzerindeki etkileri Dünya gıda güvenliği ve üretimi için büyük ve kalıcı bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya ölçeğinde gıda talebinin önümüzdeki 30 yıl içinde 2006 yılına göre %60 oranında artacağı ve iklim değişikliği ile ilgili önlemlerin alınmadığı takdirde 321 milyondan fazla insanın açlıkla karşı karşıya kalacağı bildirilmektedir (FAO, 2017). Küresel ısınmanın temel sebeplerinden birisi olan sera gazlarının en önemli kaynaklarından birisi enterik fermantasyon sonucunda üretilen CH₄ bileşiğidir.

Farklı kaynaklarda enterik fermantasyon kaynaklı CH₄ bileşiğinin sera gazları üretimindeki payı %14 arasında bildirilmektedir (Global Methane Initiative, 2011). İnsanların yeterli ve dengeli beslenmelerinde önemli bir yer tutan et ve süt gibi hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesi, bu ürünlerin elde edildiği ruminant hayvanların rumenlerinde gerçekleşen mikrobiyal aktivite ile (lif sindirimi, uçucu yağ asitleri ve gazlarının üretimi) ile doğrudan bağlantılıdır.

Bu nedenle, mikrobiyal aktivitenin optimum düzeye erişebilmesi açısından rumende uygun şartların (pH (6.2-6.8), anaerobik ortam, rumen iç sıcaklığı (39°C), NH₃-N düzeyi (50 mg/l (Satter and Slyter, 1974) ve 190 mg/l (Miller, 1973)), ruminal hareketleri ve osmotik basınç sağlanması gerekir. Rumende gerçekleşen olaylardan sorumlu olan mikroorganizmalar (bakteri, protozoa ve mantarlar) rumen koşullarından önemli ölçüde etkilenmektedirler.

Rumende gerçekleşen fermentatif faaliyetler sonucunda üretilen fermentasyon ürünleri arasında en önemli yeri NH₃, UYA ve CH₄ yer almaktadır. Rumendeki mikrobiyal ekoloji, hayvana özgü iki faktöre (rasyonlar ve fizyolojik koşullar) bağlı olarak her zaman dinamik bir özellik taşımaktadır. Mikrobiyal popülasyon, esas olarak hayvanın enerji ihtiyaçlarının yaklaşık %75'lik kısmını karşılamaktadır.

Ruminant hayvanların sindirim kanalındaki mikrobiyal fermantasyonunun bir yan ürünü olan CH₄ hayvancılık sektöründen kaynaklanan sera gazı emisyonlarına önemli düzeyde katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda, başta sığır türü olmak üzere ruminant hayvanlardan kaynaklanan enterik CH₄ emisyonlarına daha fazla önem verilmeye başlanmıştır (Gerber et al., 2013; Tubiello et al., 2013). Metan üretimi aynı zamanda ruminant hayvan açısından bir enerji kaybıdır. Metan üretiminden

kaynaklanan enerji kaybının azaltılması durumunda hayvansal verimde artış sağlanabilmektedir.

2.2. Nitrat ilavesinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi

Sharifi vd. (2018), nitrat ilavesinin ruminal NH₃ konsantrasyonunu artırdığını bildirmiştir. Aynı şekilde, diğer bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Guo et al., 2009; Liu et al., 2017; Mamvura et al., 2014; Patra and Yu, 2015). Patra and Yu (2015), nitratın NH₃ bileşiğine dönüşmesi olayının mikrobiyel gelişim açısından avantajlı olduğunu bildirmektedir.

Bunun aksine Guyader et al. (2015) nitrat ilavesinin ruminal NH₃ konsantrasyonunu azalttığını bildirmiştir. Zhao et al. (2015), rasyona nitrat ilavesinin sellülotik bakterilerin (*Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* ve *Fibrobacter succinogenes*) sayısını, asetat ve bütirat oranını ve buna bağlı olarak CH₄ üretimini artırdığını bildirmiştir. Lin et al. (2011), nitrat ilavesinin asetat oranını artırırken bütirat oranını düşürdüğünü bildirmiştir. Guyader et al. (2016), nitrat ilavesinin rumen pH değerini artırdığını ve toplam UYA, NH₃-N ve CH₄ içeriğini azalttığını bildirmiştir.

Ungerfeld ve Kohn (2006) nitrat ilavesinin, rumen içindeki H iyonlarını metanogenezden daha verimli olan nitrat-nitrit-NH₃-N döngü mekanizmasına yönlendirerek ruminal NH₃-N içeriğinde bir artışa yol açtığını bildirmiştir. Aynı şekilde, diğer bazı çalışmalarda da nitrat ilavesine bağlı olarak rumen NH₃-N konsantrasyonunda artış olduğu bildirilmiştir (Guyader et al., 2015; Hulshof et al., 2012; Lee et al., 2015b; Olijhoek et al., 2016). Öte yandan, Lee et al. (2015b), kapsüllenmiş nitrat tüketimi ile amonyak konsantrasyonlarında 4.39'dan 7.32 mmol/l'ye kadar değişen oranda doğrusal artış gözlemlemiştir. Rumende nitrat ve nitritin indirgenme mekanizmaları rumen pH'sı ile ilgilidir.

Tillman et al. (1965), nitrat ve nitritin indirgenme mekanizmaları için geçerli olan optimum rumen pH değerlerini sırasıyla 6.5 ve 5.6 olarak bildirmiştir. Rumende, nitrat önce nitrite ($\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$), daha sonra amonyum iyonuna ($\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$) indirgenir. Nitratın nitrite (-130 kJ) ve nitritin amonyuma (-371 kJ) indirgenmesi sonucunda üretilen enerji miktarı nitratın CH₄ üretiminde (metanogenesis) kullanılması durumunda üretilen enerji miktarına (-67 kJ) göre

yüksektir (Olijhoek et al., 2016; Ungerfeld and Kohn, 2006). Aynı şekilde, Sun et al. (2017), rumende nitrat indirgenme mekanizmasının rumen bakterileri tarafından N kaynağı olarak kullanılan NH_3 üretiminde önemli olduğunu ve 1 mol nitratın NH_3 'a indirgenmesi sonucunda toplam 4[2H] mol H tüketildiğini bildirmiştir. Nitrat indirgenme (nitrit oluşumu) aşamasının genel anlamda nitrit indirgenme (NH_3 oluşumu) aşamasından daha hızlı olduğu ve ortamda nitrat miktarının artması durumunda nitrit birikiminin söz konusu olabileceği bildirilmektedir (Iwamoto et al., 1999). Rumende nitrit birikimi kanda oksijenin taşıma kapasitesini olumsuz yönde etkileyebileceğinden (Dawson et al., 1997) nitratın CH_4 üretiminin azaltılması amacı ile kullanılması konusunda dikkatli olunmalıdır.

Tomkins et al. (2018), nitrat ilavesine bağlı olarak KMT artış gözlemlendiğini belirtirken başka araştırmacılar nitrat ilavesine bağlı olarak KMT'nin değişmediğini ileri sürmüştür (Benu et al., 2015; Nolan et al., 2010; Trinh et al., 2009; van Zijderveld et al., 2010). Bunun aksine, Hulshof et al. (2012), 22 g nitrat/kg KM veya üstünde nitrat verilmesi durumunda sığırlarda KMT'nin düştüğünü bildirmiştir. Lee et al. (2015a) ve Miyazaki (1977), nitrat ilavesinin koyun ve düvelerde yemlerin sindirimini artırdığını bildirmiştir. Rasyonda üre yerine nitrat kullanılmasının et sığırlarında ruminal CH_4 üretiminde %27 (g CH_4 /kg KMT) veya %17 (g CH_4 /gün) oranında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Hulshof et al., 2012; Velazco et al., 2014). Rumende, nitrit birikimi kanın oksijen taşıma yeteneğini olumsuz yönde etkilemektedir (Dawson et al., 1997). Bu nedenle rasyonda nitrat kullanımında dikkat gösterilmesi gerekmektedir. Guyader et al. (2016) nitrat ilavesinin rumen pH'sını artırdığını, toplam UYA, NH_3 -N ve CH_4 içeriğini azalttığını bildirmiştir.

Ungerfeld ve Kohn (2006), nitrat ilavesinin rumende bulunan H iyonlarını metanogenesis yerine enerji üretimi açısından daha verimli olan nitrat-nitrit- NH_3 -N döngü mekanizmasına yönlendirerek ruminal NH_3 -N içeriğinde artışa yol açtığını bildirmiştir. Koyun (Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010) ve sığır türlerinde (Hulshof et al., 2012; van Zijderveld et al., 2011; Veneman et al., 2013) yapılan çalışmalar rasyona nitrat ilavesi yapılması durumunda CH_4 (g/kg KMT) üretiminde %7.9 ila 12.2 arasında düşme olduğunu ortaya koymuştur. Hulshof et al. (2012) ve Zhou et al. (2012) bazı rumen mikroorganizmalarının (*Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*) nitrat ilavesine adaptasyonundan sonra UYA üretiminde bir artış olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde, Nolan et al. (2010), izonitrojenik (eşdeğer

düzyeyde N içeren) rasyonlarla beslenen koyunlarla yürüttükleri çalışmada N kaynağı olarak nitrat (25 g nitrat/kg KM) içeren rasyonların verildiği koyunlarda rumen UYA konsantrasyonunun N kaynağı olarak üre tüketen koyunlarda belirlenen rumen UYA konsantrasyonuna göre yüksek olduğunu belirlemiştir.

Aynı şekilde diğler bazı çalışmalarda da, rasyonda 21 g NO₃⁻/kg KM düzeyinde nitrat kullanımının CH₄ üretiminde bir azalmaya yol açtığını (kilogram KMT başına gram olarak %16 ila 25 veya KMT başına kilogram başına litre olarak) ortaya konmuştur (Klop et al., 2016; Lee and Beauchemin, 2014; Lund et al., 2014; van Zijderveld et al., 2011). Rasyona nitrat ilavesini takiben kontrol grubuna kıyasla ruminal hidrojen emisyonlarında farklı düzeylerde artış gözleendiği bildirilmiştir (Lund et al., 2014; Troy et al., 2015; van Zijderveld et al., 2011). Daha önceki yayınlarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Sar et al., 2004; 2005; Satter and Slyter, 1974).

2.3. Yağ ilavesinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi

2.3.1. Yağlar hakkında genel bilgi

Yağların ruminant rasyonlarında birincil kullanım amaçları enerji sağlamaktır. Bu durum özellikle süt sığırlarında laktasyonun başlangıç döneminde ortaya çıkan enerji eksikliğinin (negatif enerji dengesi) bertaraf edilmesi konusunda önem taşımaktadır. Yağların bir başka kullanım amacı da hayvansal ürünlerin yağ asiti profilinde arzulanen değışikliklerin sağlanmasıdır. Gerçekten de rumendeki biyohidrojenizasyon olayına karşı korunan yağlar (korunmuş yağlar) ruminant hayvanlardan elde edilen et ve süt gibi ürünlerde yağ asiti profilini doymamış yağ asitleri lehinde artırmaktadır. Ayrıca, rasyonlarda yağ kullanımı rumende CH₄ üretiminin azaltılması amacı ile de kullanılabilir (Martin et al., 2010).

Fiorentini et al. (2013, 2014, 2015) ruminant hayvanların rasyonlarında yağların kullanılmasının, rasyondaki enerji oranını artırdığını, ayrıca CH₄ üretimindeki azalmaya, et ve süt gibi hayvansal ürünlerdeki yağ asiti profilinde değışikliğe katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Brzowska and Oprządek (2013), rumende gerçekleşen yağ asiti metabolizmasının süt ve et gibi hayvansal ürünlerdeki yağ asiti profilini etkileyen temel faktör olduğunu belirtmiştir. Yağların belirtilen bu etkileri ortaya koymasında temel etken olan yağ asitleri genel anlamda doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak adlandırılmaktadır.

Doymuş yağ asitlerinin karbon (C) zincirlerinde çift bağ yer almazken, doymamış yağ asitlerinde bir (tekli doymamış yağ asitleri; TDYA) veya birden fazla çift bağ (çoklu doymamış yağ asitleri; ÇDYA) yer almaktadır. ÇDYA kısa zincirli (16-18 C) ve uzun zincirli (>18 C) olarak 2 ana grup altında incelenmektedir (Buckley et al., 2017). Doğada en yaygın bulunan doymamış yağ asitleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Doğada en fazla bulunan doymamış yağ asitleri

Yağ asiti	Kimyasal Yapı
Palmitoleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{C}=\text{CCH}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolenik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2\text{C}=\text{CCH}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araşidonik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{C}=\text{C})_4(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

2.3.2. ÇDYA 'nın yapısı: Soya Yağı (SY) Örneği

2.3.2.1. Soya yağı hakkında genel bilgi

SY, büyük bir kısmını α -linolenik asit ($\text{C}_{18:3}$ cis-9, cis-12, cis-15) ve linoleik asitin ($\text{C}_{18:2}$ cis-9, cis-12) oluşturduğu yaklaşık 850 g/kg DOYA içeriğine sahiptir (Şekil 2.1. ve Tablo 2.2.). Linoleik asitin rumende CH_4 üretiminin düşürülmesi amacı ile kullanılacak en etkili yağ asitlerinden birisi olduğu bildirilmiştir (Doreau et al., 2011). En yüksek doymamışlık derecesinde de SY, gaz üretimini %32.77 oranında düşürmüştür (Wang et al., 2014). Yağ asitlerinin (YA) protozoa sayısı ve metanojenez üzerinde inhibe edici etkileri vardır.

Linoleik asit, rumen içerisinde *Methanobacterium formicicum* inhibisyonu ile metan verimini azaltır (Li et al., 2012). Başka bir araştırmacı, yağların ruminal selülozun sindirilebilirliğini etkileyebileceğini bildirmiştir (Chung et al., 2011). Diğer bazı araştırmacılar SY'nın selülitik bakteriler üzerinde etkisinin olmadığını ancak rumende *Butyrivibrio fibrisolvens* bakteri türününün bulunma oranını arttırdığını ve protozoa konsantrasyonunu azalttığını tespit etmiştir (Wang et al., 2014).

Tablo 2.2. Soya yağının % YA bileşimi (Maia et al., 2007)

	Toplam yağ asitlerinin % 'si
Palmitik asit (C _{16:0})	-
Palmitoleik asit (C _{16:1})	0.08
Stearik asit (C _{18:0})	-
Oleik asit (C _{18:1})	21.35
Linoleik asit (C _{18:2})	56.02
Linolenik asit (C _{18:3})	7.15
Gadoleik asit (C _{20:1})	0.22
Miristoleik asit (C _{17:1})	0.08

Soya yağının yapısı şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. SY yapısının şematik gösterimi (Petrović, Z. S., 2008)

2.3.2.2. ÇDYA'nın bazı rumen parametreleri ve besin maddelerinin sindirilebilirliği üzerindeki etkisi

Birçok çalışmada ele alınan ÇDYA'nın besin maddelerinin sindirilebilirliği üzerindeki etkisi rasyonda kullanılan yem kaynakları başta olmak üzere farklı faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Benchaar et al., 2015; Chung et al., 2011; Salem et al., 1993). ÇDYA'nın besin maddelerin sindirilebilirliği üzerindeki etkisi rumen mikroorganizmalarının sayısı ve gelişimleri üzerindeki etkileri ile ilişkilendirilebilir. Nitekim Hristov et al. (2009) linolenik asit yönünden zengin bitkisel yağların rasyona dâhil edilmesinin, rumende protozoal popülasyonda azalmaya, proteolitik bakteri popülasyonunda ise artışa yol açtığını bildirmiştir.

Rumen protozoalarının sahip oldukları ksilanaz ve karboksimetil selülaz aktiviteleri ile lif kolonizasyonu ve sindiriminde önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmektedir (Newbold et al., 2015). Yukarıda da belirtildiği gibi ÇDYA'nın besin

maddelerin sindirilebilirliği üzerindeki etkileri rasyonda yer alan yem kaynaklarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin rasyonda nişastaca zengin dane yemlerin yüksek düzeyde bulunması durumunda ruminal pH'daki düşmeye bağlı olarak selülotik bakterilerin sayısı azalmakta ve bunun sonucunda lifli maddelerin sindirim dereceleri düşmektedir. Rasyondaki yüksek nişasta konsantrasyonu, daha düşük bir rumen pH'si ve mikroorganizma zenginliği ile ilişkilendirilebilir (Zened et al., 2013).

Kolay çözünebilir karbonhidratlarca (nişasta vb.) zengin dane yemlerin (buğday, arpa, mısır vb.) rasyonda yüksek düzeyde bulunması durumunda rumen pH'sı düşmekte ve bu düşüşe bağlı olarak da diğer ruminal fermantasyon mekanizmaları (rumende gerçekleşen farklı sentez ve parçalanma olayları) farklı yön ve şekillerde etkilenmektedir. Rumen pH'sındaki düşme lifli maddelerin sindiriminden birinci derecede sorumlu olan selülotik bakterilerin gelişimini olumsuz yönde etkilemekte, bunun sonucunda asetat üretimi ve buna bağlı olarak da CH₄ üretimi düşmektedir (Drehmel, 2017).

Rumen fermantasyonunu hayvanın verim düzeyi ve sağlık durumunu olumlu yönde etkileyecek tarzda yönlendirmek amacı ile farklı yollara başvurulmaktadır. Farklı yağ kaynaklarının besin maddelerinin sindirimi üzerindeki etkilerini belirleyen diğer bir faktör de bu yağ kaynaklarının yağ asiti profilleridir. ÇDYA bakımından zengin yağları içeren diyetler besin maddelerinin sindirilebilirliğini TDYA içeriği yüksek diyetlere göre daha yüksek oranda düşürmektedir (Fievez et al., 2007). Jenkins (2007), lipidlerin lifli maddelerin sindirilebilirliğini yem partiküllerini kaplayarak mikrobiyel adezyonu (yapışma) önlemek ya da doğrudan selülotik bakteriler üzerine toksik etkide bulunmak suretiyle önlediğini bildirmiştir. Yağ asitlerinin doymamışlık derecelerindeki artışa bağlı olarak selülotik bakteriler üzerindeki toksik etkileri artış göstermekte olup bu durum ÇDYA ile TDYA' nin lifli maddelerin sindirimi üzerindeki etki farklılığını açıklamaktadır. Bu konuda farklı yönde bildirişler de bulunmaktadır.

Rasyonlara eklenen bitkisel yağlar CH₄ üretimini a) rumen metanojenlerinin aktivitesi ile bakteri ve protozoa sayısını düşürmek (Beauchemin et al., 2009; Chung et al., 2011; Lillis et al., 2011), b) fermente edilebilir substrat miktarını düşürmek ve c) rumen ortamından H atomlarını çekmek suretiyle (biyohidrojenizasyon) önlemektedir (Johnson ve Johnson, 1995). Chung et al. (2011), çayır kuru otu veya

arpa silajı temelli rasyonlara (475 g/kg KM) öğütülmüş keten tohumu (72 g /kg DM) ilave etmiş ve CH₄ üretimi ve protozoa sayısının sadece arpa silajı temelli rasyonlarda düştüğünü belirlemiştir. Kırmızı üçgül ve mısır silajı (570 g/kg) temelli rasyonların karşılaştırıldığı çalışmada keten tohumu yağı ilavesi (40 g/kg KM) mısır silajı temelli rasyonlarda CH₄ üretiminde daha yüksek oranda bir düşüşe yol açmıştır (Benchaar et al., 2015).

Yağların CH₄ üretimini azaltıcı etkileri doymamışlık derecelerindeki artışa paralel olarak artış göstermektedir (Vargas et al., 2017). Linoleik asit (C_{18:2}) (SY ve ayçiçeği yağı) ve linolenik asit açısından zengin (C_{18:3}) (keten tohumu yağı) yağların ruminal üretimini sırasıyla % 4.1 ve 4.8 oranında azalttığı bildirilmiştir. Kakao yağında bulunan orta zincir uzunluklu yağ asitleri CH₄ üretimini önemli ölçüde azaltır. Laurik asit (C_{12:0}) ve miristik asidin (C_{16:0}), tek başına kullanıldığında CH₄ üretimi üzerinde benzer bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir, ancak bu 2 yağ asidi birlikte kullanıldığında, sinerjik etki ortaya çıkarmıştır (Dohme et al., 2001; Soliva et al., 2004).

Kubelková et al. (2018), rasyonda kullanılan doymamış yağ kaynaklarının, rumen içindeki NH₃-N konsantrasyonunu azalttığını ve mikrobiyal azot sentezinin etkinliğini arttırdığını bildirmiştir. SY'da bulunan α -linolenik asitin (C_{18:3} cis-9, cis-12, cis-15) ve linoleik asitin (C_{18:2} cis-9, cis-12) varlığına bağlı olarak, yüksek bir biyolojik hidrojenizasyon seviyesine sahiptir. Bahsedilen yağ asitleri ayrıca selüloolitik bakteri ve protozoa popülasyonunun gelişimini olumsuz yönde etkilemekte ve sonuç olarak lif sindirimini azaltmaktadır (Maia et al., 2007; Yang et al., 2009; Rodrigues et al., 2017).

Yağ ilavesinin CH₄ üretimi, rumen fermantasyonu ve lif sindirimi üzerindeki etkisi rasyondaki kaba yem tipine göre değişmektedir (Hassanat et al., 2013; Salem et al., 1993). Nitekim Chung et al. (2011), öğütülmüş keten tohumu ilavesinin (72 g yağ/kg KM rasyon) arpa silajı içeren rasyonlarda CH₄ üretimi ve protozoa sayısını düşürürken, çayır kuru otu temelli rasyonda aynı etkiyi göstermediğini belirlemiştir. Çayır üçgülü ve mısır silajı temelli rasyonların karşılaştırıldığı bir başka çalışmada keten tohumu yağı ilavesinin (40 g/kg KM) CH₄ üretimini mısır silajı temelli rasyonlarda daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiştir (Benchaar et al., 2015).

Bunun aksine, Rodrigues et al. (2017), CH₄ üretiminde yağ ilavesine bağlı olarak ortaya çıkan azalma düzeyinin kaba yem türünden etkilenmediğini bildirmiştir.

Bazı çalışmalarda rasyona ilave edilen yağların metanojenlerin (CH₄ üreten bakteriler) aktivitesi ve bakteriler ile protozoaların sayısını düşürmek (Beauchemin et al., 2009; Chung et al., 2011; Lillis et al., 2011), CH₄ üretiminde kullanılacak fermente edilebilir substrat miktarını düşürmek veya DOYA'ni doyurmak (hidrojenizasyon) yoluyla CH₄ üretiminde düşmeye yol açtığı (Johnson ve Johnson, 1995) bildirilmiştir.

Rumen NH₃-N içeriğinde SY ilavesine bağlı olarak artış gerçekleştiği bildirilmektedir (Doreau ve Ferlay, 1995). Nitekim Yang et al. (2009), yonca (100 g/kg KM), çavdar (280 g/kg KM) ve mısır silajından (220 g/kg KM) oluşan rasyona 40 g/kg KM düzeyinde katılan SY'nın NH₃-N konsantrasyonunu 6.2 mg/dl'den 7.7 mg/dl'ye yükselttiğini belirlemiştir. Rasyona linolenik asit (C_{18:3}) içeriğince zengin bitkisel yağ ilavesinin rumende protozoal popülasyonda düşme, proteolitik bakteri popülasyonunda ise artışa yol açtığı ortaya konulmuştur (Hristov et al., 2009).

Bitkisel yağ ilavesinin bu etkisi bakterilerin protozoalar tarafından tüketilme oranını azaltmak suretiyle rumende NH₃-N konsantrasyonunu artırmaktadır (Newbold et al., 2015; Yang et al., 2009). NH₃-N konsantrasyonundaki artış aynı zamanda rumen bakterileri tarafından kullanılabilir formdaki enerji düzeyinin azalması ile de açıklanabilir (Rodrigues et al., 2017). Çalışmalarda farklı bitkisel yağ kaynaklarının rumende besin maddelerinin sindirim derecelerini farklı düzey ve yönlerde etkilediği ortaya konulmuştur.

Chelikani et al. (2004), kolza yağı verilen sığırlarda ham protein parçalanabilirliğinin kontrol grubuna göre arttığını, Majewska et al. (2017) ise düştüğünü bildirmiştir. Palmquist (1988), DOYA'nın ruminal lif sindirimi üzerindeki olumsuz etkisinin rasyonda kaba yem oranının artırılması suretiyle azaltılabileceğini belirterek kaba yemlerin bu konudaki etkisini rumen fermantasyonunun kaba yem kullanımıyla ruminal biyohidrojenizasyon için ideal duruma gelmesiyle ilişkilendirmiştir.

Bateman and Jenkins (1998), Bermuda ot rasyonlarına SY'nın (80 g/kg KM) dahil edilmesinin toplam NDF sindirilebilirliğini düşürmediğini gözlemlemiştir. Bu araştırmacılar, rasyonda yüksek düzeyde SY kullanımına rağmen NDF sindirilebilirliğinde düşme olmamasını rasyondaki yüksek NDF içeriğine bağlı olarak DOYA'nın biyohidrojenasyonunu fibrolitik bakteriler üzerindeki toksik etkilerinin azalmasına bağlamışlardır. Moran (2005), rasyona % 5 düzeyinde katılan yağın rumen ortamını olumsuz yönde etkilemediğini ve sindirilebilirliği düşürmediğini bildirmiştir.

Rumen protozoaları lif sindirimi üzerindeki etkilerini ksilanaz ve karboksimetilselülaz enzimleri aracılığı ile ortaya koyduklarından (Newbold et al., 2015) SY ilavesinin protozoa popülasyonu ve lif sindirimi üzerindeki etkisinin diyetle kullanılan kaba yemlerin NDF içeriğine ve karbohidratlarla ilgili olan diğer özelliklerine bağlı olduğu söylenebilir. Cieslak et al. (2015), kolza yağı ve balık yağı içeren rasyonları tüketen süt sığırlarının rumenlerindeki protozoa popülasyonunun önemli düzeyde azalma gösterdiğini bildirmiştir. Biyohidrojenizasyon işleminin mikrobiyal metabolik aktivitenin bir sonucu olarak rumende meydana geldiği bilinmektedir. Selülitik ruminal mantarların çoğalması ÇDYA tarafından inhibe edilmektedir. ÇDYA, biyohidrojenizasyon işleminde rol alan ruminal bakterilerin (özellikle de *C. proteoclasticum* bakterisi) sayısını azaltıcı rol oynamaktadır (Maia et al., 2007).

Tüm ÇDYA, rumen mikroorganizmalarına karşı farklı toksisiteye sahiptir (Maia et al., 2007; Zhang et al., 2008). Rasyonda bulunan lipidlerin bu antimikrobiyal etkisi, yağ asitlerinin doymamışlık derecesi ile ilişkilidir (Szumacher-Strabel et al., 2004; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2008). SY'nın yağ asidi bileşimi Tablo 2.2.'de verilmiştir. Rasyon kompozisyonu başta olmak üzere bazı faktörlere (sağılan gün sayısı, günlük süt verimi ve ölçüm saati vb.) bağlı olarak ortalama 6.2-6.8 arasında değişim gösteren rumen pH'sı (Geishauser et al., 2012) farklı yağ kaynaklarından farklı düzey ve yönde etkilenmektedir.

Majewska et al. (2017), rasyona kolza yağı ilavesinin rumen pH'sını yükselttiğini bildirmiştir. Szumacher-Strabel et al. (2009), yağ asiti profilleri farklı olan çuha çiçeği yağı (%84.6 ÇDYA, %7.4 TDYA) ve hondan yağı (%48.4 ÇDYA, %27 TDYA) yağ kaynaklarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, tekli doymamış yağ asitlerince ($C_{18:1}$ gibi) zengin olan hondan yağı içeren rasyonları tüketen keçilerde rumen pH'sının daha düşük olduğunu belirlemişlerdir.

Bunun aksine, Szumacher-Strabel et al. (2004), rasyona %5 düzeyinde katılan bitkisel yağların rumen pH'sı ve NH_3-N düzeyini etkilemediğini belirlemişlerdir. Aynı şekilde, Dong et al. (1997), rumen pH'sı ve NH_3-N düzeyinin rasyonda kullanılan kolza yağından etkilenmediğini, ancak UYA içeriğinin etkilendiğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, Doreau and Ferlay (1995), rasyona SY ilavesinin NH_3-N konsantrasyonunu artırdığını bildirmiştir.

2.3.3. TDYA'nın Yapısı: Fındık Yağı Örneği

2.3.3.1. Fındık yağı hakkında genel bilgi

Fındık yağı, yüksek düzeyde oleik asit (%72.8 ila 83.5) ve linoleik asit (%7.6 ila 16.6) ve düşük düzeyde palmitik asit (% 4.1 ila 6.8), stearik asit (% 1.9 ila %2.8) ve linolenik asit %0.6 içeriğine sahiptir (Benitez-Sanchez et al., 2003) (Tablo 2.3.). Türkiye Gıda Kodeksi'nde, FY'nın %71-91 oleik asit,% 5.70-22.20 linoleik asit ve % 4.32- 8.89 palmitik asit içeriğine sahip olduğu bildirilmektedir (Anonymous, 2012).

Tablo 2.3. Fındık yağının % YA bileşimi (Benitez-Sanchez et al., 2003)

	Toplam yağ asitlerinin % 'si
Palmitik asit (C _{16:0})	4.0 – 7.0
Palmitoleik asit (C _{16:1})	Max. 0.4
Stearik asit (C _{18:0})	1.0 – 4.0
Oleik asit (C _{18:1})	70.0 – 90
Linoleik asit (C _{18:2})	7.0 – 15.0
Linolenik asit (C _{18:3})	Max. 0.5
Gadoleik asit (C _{20:1})	Max. 0.2
Miristoleik asit (C _{17:1})	-

2.3.3.2. TDYA 'nın bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi

FY'nın CH₄ ve diğer rumen parametreleri üzerindeki etkisi hakkında çok az çalışma vardır. FY diğer bazı yağ kaynakları (zeytinyağı ve kanola yağı) gibi oleik asit (C_{18:1}) bakımından zengindir. Beauchemin and McGinn (2015), kanola yağının rasyona eklenmesinin metan emisyonunda düşüşe neden olduğunu bildirmiştir. Dohme et al. (2000), KM'nin %5.3'ünde rasyona eklenen kanola yağının toplam metan üretimini %20 oranında azalttığını gözlemlemişlerdir.

McGinn et al. (2004), arpa temelli bir rasyona benzer miktarda (diyetsel KM'nin %5'i) ayçiçeği yağı eklenmesinin, CH₄ üretimini brüt enerji tüketimini %2'i oranında azalttığını bildirmiştir. Ayçiçeği yağı, oleik asit (%45) ve linoleik asit (%40) bakımından zengindir. Kanola yağı ise %54 oleik asit, %22 linoleik asit ve %11 oranında linolenik asit içerir (NRC, 2001). Chelikani et al. (2004), kontrol grubundaki süt ineklerine göre rasyonlarında günlük 1 kg kanola yağı alan süt ineklerinde besin maddelerinin toplam sindirim sistemi sindirilebilirliğinin düşmediğini bildirmiştir.

Loor et al. (2002), süt ineklerinde %3.3 kanola yağı, kanolamid yağı, kanola ve kanolamid yağları karışımının KMT'de bir düşüğe yol açtığını, ancak toplam KM, lif ve proteinin sindirilebilirliğinin etkilemediğini bildirmiştir. Majewska et al. (2017), kolza yağının (oleik asit bakımından zengin), rumen protozoa popülasyonunu, ruminal ADF ve HP sindirilebilirliğini keten tohumu yağına kıyasla (linolenik asit bakımından zengin) daha yüksek oranda etkilediğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, kolza tohumu yağının keten tohumu yağı ile karşılaştırıldığında rumen asetat üretimini daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Freitas et al. (2018), TDYA içeriği bakımından zengin olan pequi yağının, selülitik bakteri popülasyonunu ve CH₄ üretimini (g/gün) %17.5 oranında düşürdüğünü, ancak KMT'ni etkilemediğini bildirmiştir.

Ayrıca, Nagaraja et al. (1997) pequi yağının yüksek palmitik ve oleik asitleri içeriği nedeniyle metan üretiminde bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada ise (Cieslak et al., 2006), koyun rasyonlarında %5 kolza yağı ilavesinin CH₄ üretiminde yaklaşık %14 oranında düşme gerçekleştiği, ancak silli protozoa sayısında bir farklılık gözlenmediği belirlenmiştir. Ruminal CH₄ üretimindeki azalmanın, rumende CH₄ üretimiyle ilgili olan mikroorganizma türlerinin miktarında ortaya çıkan azalma ile ilişkili olabileceği akla gelmektedir. Nitekim, bazı çalışmalarda rasyona zeytinyağı ilavesinin selülitik ve metanojenik bakteri popülasyonunda bir azalma tespit edilirken (Harvatine et al., 2006; Nathaly et al., 2019; Nur Atikah et al., 2018), diğer çalışmalarda ruminal CH₄ üretiminin azalması ile ilgili *Succinivibrionaceae* ve *Prevotella* popülasyonlarında bir artışa yol açtığı (Nathaly et al., 2019) bildirilmiştir.

Aynı şekilde, TDYA içeriği yüksek olan kolza yağı (Szumacher-Strabel et al., 2004) ve ekhium yağının (Huws et al., 2015) kullanıldığı çalışmalarda bakteri popülasyonunda azalma gözlemlendiği belirlenmiştir. Diğer bazı araştırmalarda ise rasyonda kolza yağı kullanımına bağlı olarak rumendeki silli protozoa popülasyonunda azalma olduğu belirlenmiştir (Bayat et al., 2017; Cieslak et al., 2015; Majewska et al., 2017; Wencelova et al., 2014). Bununla birlikte, Duarte et al. (2017 and 2018), pequi yağının (rasyonda 1.5 ml/gün) rasyon yağ içeriğinde bir artışa (%6) neden olduğunu ve *in vitro* CH₄ üretimini etkilemediğini ortaya koymuştur. Diğer bazı çalışmalarda ise kolza yağı kullanımına bağlı olarak kuru madde tüketiminde azalma (Bayat et al., 2017), ruminal protein parçalanabilirliğinde bir artış (Chelikani et al., 2004) olduğu bildirilmiştir. FY'nın YA bileşimi Tablo 2.3'te sunulmaktadır.

Nur Atikah et al. (2018), keçilerde yürüttüğü çalışmada yağ kaynağı olarak zeytinyağı tüketen grupta yer alan keçilerin rumenlerinde pH'nın daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Vargas et al. (2011), Merinos ırkı koyunlarla yaptığı çalışmada zeytinyağı kullanımının propiyonik asit üretiminde artışa, bütirik asit üretiminde ise düşmeye yol açtığını bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Getachew et al., 2001; Jalc et al., 2006; 2007; Toral et al., 2009). Ruminant diyetlerinde zeytinyağı kullanımının mikrobiyel protein sentezini etkilemeksizin NH₃ konsantrasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Kolver et al., 2002; Vargas et al., 2011).

2.4. *Leucaena leucocephala*, *Khaya senegalensis* ve *Medicago sativa* ile ilgili bilgi

2.4.1. *Leucaena leucocephala* ile ilgili bilgi

2.4.1.1. Tanım ve habitatlar

Tropik bölgelerde ruminant hayvanların beslenmesinde yaygın olarak kullanılan *Leucaena leucocephala* (LL) *Fabaceae* familyasına ait olup (Meena et al., 2013) protein, mineral ve karotence zengindir (Akingbade et al., 2001). Bu ağaç türü 4-8 yıl arasında, 18-37 cm çapa ve 18 m yüksekliğe ulaşabilmektedir (Pottinger ve Hughes, 1995). Tropik bir bitki türü olan LL yüksek sıcaklıklara (25-30°C) dayanıklıdır. LL'nin yaprakları, tohumları ve kabukları Şekil 2.2 ve 2.3'te sunulmuştur.



Şekil 2.2. LL yaprağı ve genç sürgünler



Şekil 2.3. LL tohumları ve kabukları

Subtropikal bölgelerde (kış aylarında), düşük sıcaklıklıklarda, büyüme hızı önemli ölçüde azalır (Hughes, 1998). Ruminant hayvan beslemede (Prasad et al., 2011), kâğıt üretiminde (Diaz et al., 2007; Lopez et al., 2008), ve odun üretiminde (Prasad et al., 2011; Tewari et al., 2004) kullanılan *LL* aynı zamanda, toprak erozyonuna bağlı olarak bozulmuş alanların ıslahında kullanılmaktadır (Pandey et al., 2013).

2.4.1.2. *Leucaena* cinsinin taksonomisi

Türlerin çoğu diploittir (kromozom sayısı: 52 veya 56 ($2n = 52$ veya $2n = 56$)). Bilinen 4 tetraploid türü (kromozom sayısı: 104 veya 112 ($2n = 104$ veya $2n = 112$)) vardır. Bunlar *L. leucocephala*, *L. diversifolia*, *L. pallida* ve *L. confertiflora*'dır (Hughes, 1998). *LL*, *Mimosoideae* alt familyasının diğer türleri, alt türleri ve diğer ilgili cinslerle ilgilidir (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4. *Leucaena leucocephala* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (Hughes, 1998)

Adı	<i>Leucaena leucocephala</i> (syn. <i>Leucaena glauca</i> Benth)
Aile	Leguminosae
Alt aile	Mimosoideae
Alt kabile	Mimoseae
Cins	<i>Leucaena</i>
Türler	<i>leucocephala</i>
Alt türler	Glabrata (Rose; S. Zarate); Ixtahuacana (Hughes) ve <i>Leucocephala</i> (Benth) Var. Peru ve Cunningham
İlgili cins	<i>Desmanthus</i> ; <i>Schleinitzia</i> ; <i>Calliandropsis</i> ; <i>Alantsilodendron</i> ; <i>Gagnebina</i> ; <i>Dichrostachys</i> ; <i>Neptunia</i> and <i>Kanaloa</i>

LL bitkisinin 22 türü mevcuttur (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. *Leucaena* cinsine giren 22 türün çiçeklenme ve meyve verme şekilleri (Hughes, 1998).

Tür adı	Çiçeklenme zamanı	Meyve zamanı
<i>L. collinsii</i>	Eylül - Kasım	Mart - Nisan
<i>L. confertiflora</i>	Ocak – Şubat ve Aralık	Ocak – Şubat ve Aralık
<i>L. cuspidata</i>	Şubat - Mayıs	Kasım - Aralık
<i>L. diversifolia</i>	Mayıs - Haziran	Ocak-Şubat ve Ağustos-Aralık
<i>L. greggii</i>	Nisan - Haziran	Ekim - Kasım
<i>L. esculenta</i>	Ekim - Kasım	Şubat - Mart
<i>L. involucrata</i>	Temmuz - Eylül	Ekim - Kasım
<i>L. lanceolata</i>	Eylül - Ekim	Ocak - Mart
<i>L. lempirana</i>	Eylül - Ekim	Mart - Nisan
<i>L. leucocephala</i>	Bütün yıl boyunca	Bütün yıl boyunca
<i>L. magnifica</i>	Ekim - Kasım	Şubat - Mart
<i>L. macrophylla</i>	Eylül - Ekim	Mart - Mayıs
<i>L. matudae</i>	Temmuz - Ağustos	Ocak-Şubat
<i>L. multicapitula</i>	Haziran - Ağustos	Ağustos - Kasım
<i>L. pallida</i>	Mayıs - Eylül	Ocak – Şubat ve Kasım - Aralık
<i>L. pulverulenta</i>	Şubat - Haziran	Ağustos - Kasım
<i>L. pueblana</i>	Kasım - Aralık	Ocak – Şubat ve Aralık
<i>L. retusa</i>	Mayıs - Temmuz	Eylül - Ekim
<i>L. salvadorensis</i>	Mart - Nisan	Şubat - Mart
<i>L. shannonii</i>	Eylül - Kasım	Şubat - Mart
<i>L. trichandra</i>	Haziran - Eylül	Mart - Mayıs
<i>L. trichodes</i>	Nisan- Ekim	Ocak - Ağustos

2.4.1.3. *Leucaena leucocephala* bitkisinin farklı kısımlarının kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği

LL bitkisinin yaprakları ve tohumları farklı miktarlarda lipid, protein ve karbonhidrat içerir. Ek olarak, tohumlar tanen ve oksalik asit içerir (Azeemoddin et al., 1988; Padmavathy and Shobha, 1987). *LL* bitkisinin farklı kısımlarının kimyasal bileşimi ve besin değerleri Tablo 2.6.'da verilmiştir.

Tablo 2.6. Farklı ülkelerde yetişen *LL* bitkisinin kimyasal bileşimi.

	Yaprakların kimyasal bileşenleri	Literatür
<i>LL</i> bitkisinin tüm aksamı (Çin)	Ficaprenol-11 (poliprenol), skualen, lupeol, sitostenon, trans-kumarik asit, cis-kumarik asit, feofitin-alfa fosforbit alfa metil ester, metil-1, 3,2-hidroksi- (132-S) -florobid-beta aristophyll-C.	Chen and Wang (2010)
<i>LL</i> yaprakları (Meksika)	2(H)-benzofuranon-5,6,7,7 atetrahidro-4,4,7 alfa-trimetil penta dekanolik asit; 14-metil-metil ester; 6,10,14-trimetil-2-penta decanon alfa keton	Salem et al. (2011)
<i>LL</i> yaprakları (Malezya)	Skualen (% 41.02); Fitol (%33.80); 3, 7,11,15-tetrametil-2-heksadeken-1-ol (%30.86); 3,7,11-Tridekatrienenitril, 4,8,12-trimetil (% 25.64)	Zayed M. and Benedict S. (2016)

LL bitkisinin besin maddeleri içerikleri farklı çalışmalarda ele alınmıştır (Tablo 2.7.).

Tablo 2.7. *LL* yapraklarının besin maddeleri içerikleri

Literatür	HP	HS	HY	HK	KMS	ADF	NDF
				%			
Wheeler et al. (1995)	29.50				57.7		
Atawodi et al. (2008)	22.76	22.29	4.60	9.73			
Pineiro-Vazquez et al. (2017)	16.02					42	58
Bacab-Pérez et al. (2011)	27.68		2.31	6.92		12.30	32.42
Ahmed et al. (2018)	23.30	16.10	3.98	7.30		28.38	52.18
Meale et al. (2012)	30.1			8.1		28.90	37.70
Soltan et al. (2013)	23.60	23.9				51.1	78.9

2.4.1.4. *LL* yapraklarının ruminant rasyonlarında kullanımı

Yüksek protein içeriği ile ruminant hayvanların beslenmesinde kullanılma potansiyeli olan *LL* yağışlı mevsimlerde 6-18 ton KM/hektar (20-80 ton taze materyal/hektar), yağışsız dönemlerde ise 2-3 ton KM/hektar üretim kapasitesine sahiptir. *LL* tüm kısımları yem kaynağı olarak kullanılabilirlikle birlikte bu konuda özellikle yapraklar ön plana çıkmaktadır. Tropik bölgelerde yem kaynağı olarak kullanılacak *LL* yapraklarının hasadı genelde 8-12 haftalık yaşta yapılmaktadır. Birçok çalışmada *LL* yapraklarının süt verimi (Giang et al., 2016; Herawati et al., 2013; Jones 1994; Jones ve Bunch, 2000; Kakengi et al., 2001; Kennedy and Charmley, 2012; Meale et al., 2012; McSweeney et al., 2011; Radrizzani et al., 2010) ve süt yağ (Larsen et al., 1998) içeriğini artırıcı yönde etki yaptığı belirlenmiştir.

LL kullanımına bağlı olarak süt veriminde ortaya çıkan artışın rasyonda kullanılan *LL* yapraklarının KMT'ni artırıcı etkisi (Babayemi and Bamikole, 2006; Delgado et al., 1996; Longo et al., 2008) ile ilişkilendirilebileceği söylenebilir. *LL* gövdesi esnek yapıda olduğundan ruminant hayvanlar tarafından büküldüğünde zarar görmez. *LL* yapraklarının ruminant besleme açısından diğer önemli bir özelliği de yüksek düzeyde tanen içeriğine sahip olmasıdır. Birçok bitkide yer alan sekonder metabolitlerden birisi olan tanenler proteinleri rumendeki mikrobiyel parçalanmadan korumak suretiyle bağırsaklara yüksek oranda amino asit gönderilmesini sağlamaktadır (Barry et al., 1986; Wanapat et al., 2015). Meena et al. (2013), *LL* yapraklarında bulunan tanenlerin KM ve proteinlerin sindirilebilirliğini azalttığını, bağırsaklara ulaşan protein miktarını artırdığını bildirmiştir. *LL* yapraklarının ruminant rasyonlarında protein ve kolay fermente olan karbonhidrat içeriğini artırdığı bildirilmiştir (Archimede et al., 2011).

2.4.1.5. *LL* yapraklarının bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi

Ruminant rasyonlarında kullanılan *LL* rumen parametrelerini farklı şekil ve düzeylerde etkilemektedir. Waghorn et al. (2002), *LL* içeren rasyonu tüketen koyunlarda CH₄ üretimini ayır kuru otu tüketen koyunlara göre düştüğünü bildirirmiştir. *LL* yapraklarının ruminal CH₄ üretimini azaltıcı etkisi yapraklarda yüksek düzeyde bulunan tanen ve saponin gibi sekonder bileşiklerin varlığıyla açıklanmaktadır (Animut et al., 2008). Tanenlerin ruminal CH₄ üretimini azaltıcı etkisinin CH₄ üretiminden birinci derecede sorumlu olan protozoa populasyonu üzerindeki azaltıcı etkilerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Galindo et al., 2007, 2008; 2009; Tan et al., 2011).

Galindo et al. (2008), dve rasyonunda % 30 oranında kullanılan *LL* yapraklarının rumen protozoa popülasyonunda %39.4 oranında düşmeye yol açtığını saptamıştır. Delgado et al. (2013), koyun rasyonlarında kullanılan *LL* yapraklarının ruminal CH₄ retiminde yaklaşık %16 oranında azalmaya yol açtığını bildirmiştir. Aynı şekilde, Piņeiro-Vázquez et al. (2018) dve rasyonunda %80 oranında kullanılan *LL* yapraklarının ruminal CH₄ üretimini yaklaşık %61.6 oranında düşürdüğünü, NH₃ üretimini ise artırdığını bildirmiştir. Ruminant rasyonlarında *LL* kullanımına bağlı olarak CH₄ retiminde düşme gerçekleştiği farklı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Molina-Botero et al., 2013; Rira et al., 2015; Soltan et al., 2013; Tan et al., 2011).

Rasyonda yüksek düzeyde (>%20 KM), *LL* kullanılması durumunda rumende NH_3 konsantrasyonunda ortaya çıkan artışa bağlı olarak idrarla atılan N miktarında gerçekleşen artış (Pineiro-Vazquez et al., 2017) atmosferde önemli bir sera gazı olan nitroz oksit gazı üretimini artırıcı rol oynamaktadır (Stergiadis et al., 2015). Bunun aksine, Muhlisin et al. (2019) koyun rasyonlarında yer alan kral otunun (*Pennisetum hybridum*) %25'i yerine *LL* kullanıldığında NH_3 üretiminin düştüğünü bildirmiş ve bu durumun *LL*'de bulunan tanen metabolitinin (% 5.5 toplam tanen ve % 0.45 KT) proteinleri ruminal parçalanmadan koruma etkisi ile (Waghorn, 2008) ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Ruminant rasyonlarında kullanılan *LL* önemli rumen parametrelerinden birisi olan UYA üretiminde de etkili olmaktadır.

Soltan et al. (2013), koyun rasyonlarında %50 düzeyinde kullanılan *LL* yapraklarının ruminal UYA konsantrasyonunda %17.3 oranında artışa yol açtığını bildirmiştir. Diğer bir çalışmada ise Teksel ırkı koyunların rasyonlarında %44 seviyesinde kullanılan *LL* yapraklarının ruminal asetik asit düzeyinde %5.6 düşme, propiyonik asit konsantrasyonunda ise %22.8 düzeyinde bir artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Piñeiro-Vázquez et al., 2018). *LL*'nin yapraklarının ve tohumlarının kimyasal bileşenleri Tablo 2.8.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.8. *LL* yaprakların ve tohumunun kimyasal bileşenleri (Ojo and Fagade, 2002; Orwa et al., 2009)

Kimyasal bileşenler	Yapraklar	Tohum
Ham protein (%)	25.9	46
Karbonhidrat (%)	40	45
Tanen (%)	4	1.2
Mimosin (%)	7.19	10
Toplam kül (%)	11	3.79
Toplam N (%)	4.2	-
Kalsiyum (%)	2.36	4.4
Fosfor (%)	0.23	0.189
Beta - karoten (mg / g)	536.0	-
Brüt enerji (KJ / g)	20.1	-

2.4.2. *Khaya senegalensis* ile ilgili bilgi

2.4.2.1. Tanım ve habitatlar

Yaklaşık 25-35 m yükseklik, 2 m çap ve 13-33 cm uzunluğunda yapraklara sahip büyük yapılı bir ağaç olan *Khaya senegalensis* *Meliaceae* familyasında yer

almaktadır. (Orwa et al., 2009). Yapraklar dalların ucunda yer alır. *KS* ağacı derin ve drenajı yeterli tercih etse de yüzeysel arazilere de adapte olabilmektedir. Afrika, Madagaskar, Asya ve tropikal Amerika'da yaygın şekilde bulunmakla birlikte (Schmelzer et al., 2010) Gine bölgesinin savan ormanlarında, orman bölgesi sınırlarındaki tipik geçiş bölgelerinde de rastlanılmaktadır (Keay et al., 1964).

Nesli tükenmekte olan bir ağaç olan *KS* Uluslararası Doğa Koruma Birliği'nin (UDKB) koruması altındadır (Danthu et al., 1999). *KS* ağacının tohumları tıbbi amaçlarla ve köpek yemi olarak da kullanılmaktadır (Neya, 2006).



Şekil 2.4. *Khaya senegalensis* meyveleri, yaprakları ve çiçekleri

2.4.2.2. *Khaya* cinsinin taksonomisi

Afrika kıtasında dört tanesi Batı Afrika'da (*K. anthoteca*, *K. senegalensis*, *K. İvoriensis* ve *K. Grandifoliola*), biri Orta Afrika'da (*K. Nyasica*) olmak üzere beş *KS* türü bulunmaktadır (Hutchinson and Dalziel, 1954; Ibrahim et al., 2006). *KS* yaprakları terpenoid ve azadiraktin gibi sekonder bileşiklerin varlığına bağlı olarak acı bir tada sahiptir (Aganga and Tshwenyane, 2003; Olowokudejo and Nyananyo, 1990).

2.4.2.3. *KS* yapraklarının kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği

KS bitkisinin besin maddeleri içerikleri farklı çalışmalarda ele alınmıştır (Tablo 2.9.)

Tablo 2.9. *KS* yapraklarının besin maddeleri içerikleri

Literatür	HP	HS	HY	HK	NDF
	%				
le Houérou, 1980	12,5				
Ouédraogo-Koné et al. (2006)	12	23.40		6.9	50.80
Njidda (2010)	14,1		3	18	38.4
Njidda et al. (2012)	13.96	18.25	2.75	10.76	48.60
Awohouedji et al. (2013)	12	-	-	17	43

KS yapraklarının tanen içerdiği ve sindirilebilirlik değerlerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Awohouedji et al., 2013; Ketzis et al., 2006). Bazı çalışmalarda *KS* yapraklarının sindirilebilirlik değerlerinin yüksek tanen içeriğine bağlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir (Awohouedji et al., 2013; Ketzis et al., 2006). *KS* yapraklarında tanenler yanında diğer bazı sekonder bileşikler de (saponinler, alkaloidler, glikozitler, steroidler, kalicedrin, terpenoidler, limonoidler ve flavonoidler) yer almaktadır (Makut et al., 2008; Nakatani et al., 2002; Yuan et al., 2013). Farklı *KS* türlerinin yapraklarında yer alan sekonder bileşikler Tablo 2.10'da gösterilmiştir.

Tablo 2.10. Farklı *KS* türlerinde bulunan sekonder bileşikler (İbrahim et al., 2006)

Taksonomi	Bitki kısmı	Fitokimyasal bileşikler								
		Alk	Flav	Tan	Flo	Sapo	Fen	Karbo	Pro	Ant
<i>K. grandifoliola</i>	Yaprak	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	Kabuk	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>K.S</i>	Yaprak	-	-	+	-	+++	+	+	-	-
	Kabuk	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>K. ivoriensis</i>	Yaprak	-	-	+	-	++	+	+	-	-
	Kabuk	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>K. anhoteca</i>	Yaprak	-	-	+	-	+++	+	+	+	+
	Kabuk	-	-	+	-	+++	+	+	-	-
<i>K. nyasica</i>	Kabuk	-	-	+	-	+	-	+	+	+

Alk: alkaloidler; Flav: flavonoid; Tan: tanen; Flo: Flobatanenler; Sapo: saponinler; Fen: fenoller; Karbo: karbonhidratlar; Pro: Protein; Ant: Antrakinon.

- = yok, + = mevcut, ++ = yüksek, +++ = çok yüksek.

2.4.2.4. *Khaya senegalensis* yapraklarının ruminant rasyonlarında kullanımı

KS yaprakları, ruminant rasyonlarında kullanıldığı gibi sindirim sistemi ile ilgili bazı hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Batı Afrika bölgelerinde bazı ağaç türlerinin (*Afzelia afrika*, *Khaya senegalensis* ve *Pterocarpus erinaceus*) ruminant hayvanların rasyonlarında kullanıldığı bilinmektedir (Bayer, 1990; Petit, 2000). Gautier et al. (2005), *KS* yapraklarının özellikle kurak dönemlerde ucuz bir protein kaynağı olarak kullanılabilceğini ileri sürmektedir. Ruminant rasyonlarında kullanılan *KS* yapraklarının hayvanların farklı paraziter hastalıklara karşı dayanma güçlerini artırdığı ve buna bağlı olarak verim düzeylerinde olumlu bazı etkilere yol açtığı ileri sürülmektedir (Hao and Ledin, 2001; Sánchez et al., 2006; Waller, 1999).

Neya (2006), *KS* yaprakları yanında dallarının da yem kaynağı olarak kullanılabilceğini bildirmiştir. Aynı şekilde diğer bazı çalışmalarda da *KS* başta olmak üzere farklı tropik ağaç türlerinin yapraklarının sindirilebilir besin maddeleri yönünden zengin olduğu bildirilmektedir (Devendra and McLeroy, 1982; le Houérou, 1980).

2.4.2.5. *KS* yapraklarının bazı rumen parametreleri ve CH₄ üretimi üzerindeki etkisi

KT içeren bitkilerin ve çalılıkların, rumende CH₄ azalmasını düşürme kabiliyeti birkaç çalışmada ele alınmıştır. Böylece, Hess et al. (2003), yem baklagillerinin ve *Sapindus saponaria* meyvelerinin rasyona ilavesinin ruminal metanojenezde bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. *KS* yapraklarının bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. *KS* hem hayvan yemlerinde hem de gastrointestinal parazitoz dahil olmak üzere hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Offiah et al., 2011).

Ansah et al. (2018), *C. pentandra*, *F. gnaphalocarpa* ve *KS* ağaç türlerinde KT içeriğinin 60 g/kg'ın üzerinde olduğunu bildirmiştir. Getachew et al. (2000), KT içeren bazı bitkilerde ADF içeriğinin NDF'den daha yüksek olduğunu bildirmiş ve bu durumu KT-protein ve KT-lifli kısım kompleksinin ADF çözeltisinde çözünmezliği ile ilişkilendirmiştir. Rumende NH₃-N konsantrasyonu, mikrobiyel protein sentezinde kullanılan N ile ve amonyak tüketimi arasındaki bir denge sonucunda belirlenmektedir (Hariadi and Santoso, 2010).

Araştırmalar, uçucu yağlar, flavonoidler, saponinler ve tanenler gibi bileşikler içeren bazı bitkilerin, ruminantlarda rumen fermantasyonunu ve besin kullanımını iyileştirdiğini göstermiştir (Hristov et al., 1999; Rochfort et al., 2008). Ruminantlarda deaminasyon işlemlerini inhibe eder, asetat ve metan üretimini azaltır, propiyonat ve bütirat üretimini artırır (Calsamiglia et al., 2007).

Oh et al., (2008) yüksek konsantrasyonda çözünür protein içeren rasyonların artan rumen amonyak konsantrasyonuna yol açtığını bulmuşlardır. KT, özellikle rumen pH'sinin yüksek olduğu durumlarda rumen içindeki proteine bağlandığı bildirilmiştir (Getachew et al., 2000; Hariadi and Santoso, 2010). Düşük seviyelerde tanen içeren yemlerin faydalı etkisi, proteinlerin tanenlerin mikrobiyal parçalanmasından korunması ve böylece ince bağırsağa giren parçalanmış protein miktarının artırılması olabilir (Barry et al., 1986). KS yapraklarının kimyasal kompozisyonları Tablo 2.11'de verilmiştir.

Tablo 2.11. KS yapraklarının besin maddeleri içerikleri (g/kg KM) (Abdel-Wareth et al., 2014).

	Besin bileşimi
Kuru madde	942
Kül	10.10
Ham protein	13.35
NDF	44.54
Kalsiyum	1.78
Fosfor	0.16
Brüt enerji (MJ/kg)	16.50

2.4.3. *Medicago sativa* ile ilgili bilgi

2.4.3.1. Tanım ve habitatlar

Asya'ya özgü çok yıllık otsu bir baklagil olan yonca (*MS*), Dünya'da en yaygın yetiştirilen yem baklagillerinden birisidir (Annicchiarico et al., 2015; Ehsanpour and Razavizadeh, 2005). Yonca bitkisi, yem kalitesinin yüksekliği ve farklı iklim şartlarına karşı dayanıklılığına bağlı olarak yaygın kullanım alanı bulmuş bir yem bitkisidir (Biazzi et al., 2017; Hanson et al., 1988; Martin, 2014; Teixeira et al., 2011). Kuzey Amerika ve Avrupa'nın kuzey ılıman bölgelerinin soğuk iklimlerinde bulunan çok yıllık bir otsu bir bitkidir. Derin köklere sahip olan ve sapsız 1 m yüksekliğe ulaşabilen (Ecoport, 2009) yonca bitkisi ruminantların beslenmesinde başlıca protein kaynağı olarak kullanılmaktadır (Ahmed, 2010; Radovic et al., 2009).



Şekil 2.5. *Medicago sativa* yaprakları, çiçekleri ve tohumları

2.4.3.2. *Medicago sativa* bitkisinin taksonomisi

Ploidi ve morfoloji açısından iki alt grupta (diploid ve tetraploid) gruplandırılan yonca bitkisinin bazı alt türleri bulunmaktadır (İlhan et vd., 2016; Quiros and Bauchan, 1988) (Tablo 2.12). *Medicago* cinsine dahil yıllık ve çok yıllık olmak üzere 60'tan fazla tür bulunmaktadır (Hanson et al., 1988; Michaud et al., 1988).

Tablo 2.12. *MS* bitkisinin farklı alt türleri

	Diploid Alt Türleri	Tetraploid alt türleri
<i>Medicago sativa</i> türleri	<i>M. sativa</i> subsp. <i>caerulea</i>	<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i>
	<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>	<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>
	<i>M. sativa</i> subsp. <i>hemicycla</i>	<i>M. sativa</i> subsp.

2.4.3.3. *Medicago sativa* bitkisinin kimyasal bileşimi ve besin maddeleri içeriği

Yonca bitkisi yüksek protein (% 15-25) ve düşük lif içeriğine (% 28-30) sahip olan bir yem bitkisidir (Kantha Raju et al., 2018; Koukoura et al., 2009; Kuchenmeister et al., 2013; Muir et al., 2003). Yonca bitkisinin özellikle üst kısımlarında yüksek düzeyde sekonder bileşikler (flavonoidler, saponinler ve fenolik bileşikler) yer almaktadır (Burda and Jurzysta., 1998; Gorski et al., 1984; Kicel and Olszewska, 2015). Gorski et al. (1984) yonca bitkisindeki flavonoidler ve saponin içeriklerini %3.5 KM olarak bildirirken, Kicel and Olszewska (2015) fenolik bileşik içeriğini 162.4 g/kg KM olarak bildirmiştir. Tablo 2.13'de, yonca bitkisinin besin maddeleri içerikleri verilmiştir.

Tablo 2.13. Yonca bitkisinin besin maddeleri içeriği (Kuchenmeister et al., 2013)

Besin bileşimi	
	%KM
HP	21.8
HS	21.9
HY	3.3
Kül	12.7
Lignin (%KM)	4.5
Fosfor (g/Kg KM)	3.1
Brüt enerji (MJ/Kg KM)	18.7

Yonca bitkisinin besin maddeleri içerikleri farklı çalışmalarda ele alınmıştır (Tablo 2.14)

Tablo 2.14. Yonca yapraklarının besin maddeleri içerikleri

Literatür	HP	HS	HY	HK	ADF	NDF	ME
	%KM						(MJ/kg KM)
Kurihara et al. (1999)	26.9	22.1	1.9	10.25	27.7	40.8	9.70
Tavendale et al. (2005)	30.1		3.3	10.7	26	34.8	9.68
Malik and Singhal (2009)	16.20		3.20	10.58	35.83	43.64	9.55
Kuchenmeister et al. (2013)	21.8	21.9	3.3	12.7	26	43	9.73
Uslu vd. (2018)	20.55		2.26	9.98	26.65	35.50	9.76
Mohsen and Valizadeh (2019)	24.95	18.86	1.76	9.60	23.27	36	9.65

2.4.3.4. *Medicago sativa* bitkisinin ruminant rasyonlarında kullanımı

MS bitkisi birim alandan yüksek oranda protein üretimini sağlaması ve aynı zamanda ruminant hayvanlar tarafından sevilerek tüketilen bir yem bitkisi olması nedeniyle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hayvancılık sektörünün vazgeçilmez yem kaynakları arasında yer almaktadır. Protein içeriğinin yüksekliği yanında lifli kısım başta olmak üzere tüm besin maddelerinin sindirilebilirlik derecelerinin yüksek olması bu bitkiyi ruminant beslemede değerli bir yem maddesi konumuna getirmektedir (De Blas and Mateos, 2010).

Yonca bitkisi, kendi yem değerinin yüksek olması yanında rasyonda yer alan diğer yem kaynaklarındaki besin maddelerinin sindirim ve emilim derecelerini de olumlu yönde etkilemek suretiyle ruminant hayvanların verim düzeylerinde artışa yol açmaktadır (Brandt and Klopfenstein, 1986a; Brandt and Klopfenstein, 1986b; Hunt

et al., 1985; Leng 1990; Ørskov et al., 1999; Paterson et al., 1982). Hadda (2000), arpa samanı temelli bir rasyona yonca katılması durumunda KMT ve rasyonun HP oranı ile KM ve İVOMS'in artış gösterdiğini bildirmiştir.

Diğer bazı çalışmalarda ise buzağı rasyonlarında kullanılan yonca bitkisinin KMT'ini artırdığı (Broderick, 1995; Vagnoni et al., 1997; Calberry et al., 2003; Coverdale et al., 2004; Beiranvand et al., 2014; EbnAli et al., 2015) ve buna bağlı olarak rumen gelişiminin teşvik edildiği ve sonuç olarak da süten kesim sonrası dönemde yem tüketiminin arttığı belirlenmiştir (Coverdale et al., 2004; Khan et al., 2011; Castells et al., 2013).

2.4.3.5. *Medicago sativa* bitkisinin bazı rumen parametreleri ve metan üretimi üzerindeki etkisi

Ruminant hayvanların rasyonlarında kullanılan yonca kuru otu rumen parametrelerinde farklı şekil ve düzeylerde etkili olmaktadır. Rasyonda yonca bitkisi kullanımına bağlı olarak ruminal pH artış göstermektedir (Khadem et al., 2009; Mirzaei et al., 2015; Nemati et al., 2016). Healy et al. (2000), ruminant rasyonlarında yonca kuru otu kullanımının ruminal asidosis rahatsızlığı üzerindeki etkisini ortaya koymak amacı ile yürüttükleri çalışmada rasyonda kullanılan yonca kuru otu miktarının %5'den %10'a çıkarılması durumunda rumen UYA konsantrasyonunun düştüğünü, rumen pH'sının ise artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Kaba yem olarak yonca kuru otu veya melasla takviye edilmiş mısır sapının kullanıldığı rasyonların karşılaştırıldığı bir çalışmada rasyonların rumen pH'sı üzerindeki etkileri arasında fark olmadığı belirlenmiştir (Wei et al., 2019).

Aynı çalışmada, rumen NH₃-N içeriğinin muamelelerden etkilenmediği, asetik asit konsantrasyonunun mısır sapının kullanıldığı muamele grubunda, toplam UYA konsantrasyonunun ise yonca kullanılan grupta daha yüksek tespit edildiği belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda ise ruminant rasyonlarında kullanılan yonca bitkisinin UYA (Calberry et al., 2003) ve rumen NH₃-N konsantrasyonu (Beauchemin et al., 1997; Plaizier, 2004; Vagnoni et al., 1997) artırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, yonca kullanılan grupta toplam UYA konsantrasyonunda gözlenen yükselmeyi yoncadaki düşük NDF içeriği ve yüksek lif olmayan karbonhidrat içeriği ile ilişkilendirirken NH₃-N konsantrasyonları arasında fark olmamasını (yonca kullanılan grupta daha yüksek NH₃-N konsantrasyonu beklenirken) rakamsal da olsa yonca kullanılan gruptaki pH yüksekliği ile açıklamışlardır. Bilindiği üzere yüksek pH

dereceleri rumen duvarından gerçekleşen NH₃-N absorpsiyonunu artırmakta ve sonuçta rumen NH₃-N konsantrasyonu düşmektedir.

Yonca kuru otu çok düşük düzeyde KT (<%0.001) içermesine karşın (Tavendale et al., 2005) CH₄ üretiminde düşmeye yol açmaktadır (Kume, 2002). Yonca kullanımına bağlı olarak rumen CH₄ üretiminde ortaya çıkan düşme yoncanın düşük NDF, yüksek HP içeriği ile açıklanabilir. Yonca kuru otu kullanımına bağlı olarak CH₄ üretiminde ortaya çıkan düşme bu bitkide bulunan saponin varlığı ile de açıklanabilir. Yonca kuru otunda bulunan sekonder metabolitlerden biri olan saponinler steroidal, triterpenoid ve amfifilik özelliklere sahiptirler (Cheok et al., 2014; Szumacher-Strabel et al., 2019).

Saponinler, antibakteriyel özelliklerine bağlı olarak rumendeki fermantatif aktiviteleri etkiler ve bunun sonucunda da protozoa sayısında düşüşe neden olur. Saponinler protozoa sayısındaki düşmeye bağlı olarak da *in vivo* (McMurphy et al., 2014) ve *in vitro* CH₄ üretimini (Rira et al., 2015) azaltıcı yönde etkili olurlar. Bir başka çalışmada, saponinlerin CH₄ ve amonyağın salınımını bloke ederek rumen içindeki fermantasyonu etkilediği ve yolla bu metabolitlerin (CH₄ ve NH₃-N) daha etkin şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Liu et al. (2018), yonca otu kullanımının KM, HP ve ADF sindirilebilirliği üzerinde önemli bir etkisi olduğunu bildirmiştir.

2.5. Hedefler

Bu çalışmanın amacı ruminant rasyonlarında kullanılacak bazı katkı maddelerinin rumen fermentasyonuna etkilerini belirlemektir. Bu amaçla laboratuvar koşullarında *in vitro* gaz üretim teknikleri uygulanarak aşağıdaki hedeflere ulaşılabacaktır. Bu çalışma aşağıdaki gibi tanımlanan dört özel hedefe dayanmaktadır:

- *Leucaena leucocephala*, *Khaya senegalensis* ve *Medicago sativa* bitkilerinin yem kaynakları olarak kullanılan bazı rumen parametreleri (pH, NH₃, UYA, CH₄ ve protozoa sayısı) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.
- Rasyona nitrat ilavesinin bazı rumen parametreleri (pH, NH₃, UYA, CH₄, protozoa sayısı) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.
- Rasyondaki doymamış yağ kaynaklarının (TDYA bakımından zengin FY ve ÇDYA bakımından zengin SY) bazı rumen parametreleri (pH, NH₃, UYA, CH₄ ve protozoa sayısı) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.

- Nitrat ve bitkisel yağ ilavesinin (nitrat + yağ) eklemeli etkisinin bazı rumen parametreleri (pH, NH₃, UYA, CH₄ ve protozoa sayısı) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.

2.6. Hipotez

H1: Erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonlar ruminal CH₄, NH₃ ve TUYA üretimini orta laktasyon dönemi rasyonlarına kıyasla artıracaktır.

H2: Erken ve orta laktasyon süt sığırı rasyonlarına nitrat ilavesi üre ilavesine kıyasla CH₄, NH₃ ve TUYA üretimini düşürecektir.

H3: Erken ve orta laktasyon süt sığırı rasyonlarına SY (ÇDYA zengin) ilavesi FY (TDYA zengin) ilavesine kıyasla CH₄ NH₃ ve TUYA üretimini düşürecektir.

H4: Orta laktasyon süt sığırı rasyonları erken laktasyon süt sığırı rasyonlarına kıyasla CH₄ NH₃ ve TUYA üretimini artıracaktır.

H5: Her 2 laktasyon döneminde nitrat ve bitkisel yağın (nitrat + yağ) birlikte kullanımını CH₄ üretimi üzerinde eklemeli tarzda düşürücü yönde etki yapacaktır.

3. *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

3.1. Giriş

Benin gibi tropikal ülkelerde hayvansal üretim sektöründe en büyük sorun yıl boyunca kaliteli yem, özellikle de kaba yem temininde söz konusu olan yetersizlikdir (Babayemi and Bamikole, 2004; Odenyo et al., 1997; Shelton and Dalzell, 2007). Bu gibi ülkeler de oldukça yaygın olan kalitesiz kaba yem kullanımı hayvansal üretim düzeyinde düşmeye yol açması yanında çevresel sorunlara da (kalitesiz kaba yem kullanımına bağlı olarak sera gazları olarak bilinen CH₄, CO₂ ve NO₂ gibi gazların üretiminde ve idrar-dışkıyla atılan N bileşiklerinin oranındaki artış) yol açmaktadır. Bu gerçek, araştırmacıları enterik fermantasyon sonucunda ortaya çıkan bu gibi son ürünlerin çevreye salınımlarının azaltılması konusunda araştırma yapmaya sevk etmiştir.

Kurak ve yarı-kurak bölgelerde yer alan ülkelerde yukarıda bahsedilen sorunun bertaraf edilmesi amacı ile başvurulacak yollardan birisi proteince ve mineral maddelerce zengin, yem değeri yüksek olan ağaç yapraklarının (*LL* gb) kullanılmasıdır. Marjinal tarım alanlarında yetişebilen ve diğer yem bitkileri ile rekabet etmeyen (Sokumbi and Egbunike, 2000) bu tür ağaç yapraklarının ruminant hayvanların otlatılması amacı ile kullanılabilmesi belirtilmiştir (Aganga and Tshwenyane, 2003). Afrika'nın tropikal bölgelerinde, doğal meralarda farklı yemlik ağaç çeşitleri bulunmaktadır. Ruminant rasyonlarında kullanılan bu yemlik ağaçlar CH₄ üretiminin azaltılması ve hayvanların verimlerinin artırılması konusunda etkili olmaktadır.

Bahsedilen bu yemlik ağaçlar çoğunlukla baklagiller familyasında yer almakta olup metanojenik bakteri, protozoa konsantrasyonunun ve dolayısıyla CH₄ üretiminin azaltılmasında etkili olan KT'ce zengindirler (Min et al., 2014; Gunun et al., 2016). Ruminantların rasyonlarında kullanılan yemlik ağaçlardan birisi olan *LL* CH₄ üretiminin azaltılması yanında hayvanların sindirilebilir protein ve enerji ihtiyaçlarının karşılanması konusunda etkili olmaktadır (Bruinenberg et al., 2002; Rira et al., 2015; Wahyuni et al., 1982). Tan et al. (2011), *LL* yapraklarında düşük düzeyde bulunan KT'nin ruminal protozoa ve metanojenik bakteri sayısındaki düşmeye bağlı olarak CH₄ üretimini yaklaşık %33 oranında düşürdüğünü belirlemiştir.

Bu amaçla *LL* yaprakları ve nitrat kullanımının metan üretimi ve rumen parametreleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi önemli olacaktır. Mevcut çalışmanın amacı *LL* yapraklarının ve nitratın iki farklı toplam karma rasyon (konsantre) ile birlikte laktasyondaki inekler için (erken ve orta laktasyon dönemlerinde) metan üretimi ve bazı rumen parametreleri (pH, NH₃, protozoa sayıları, ve UYA) üzerindeki etkisinin belirlenmesidir.

3.2. Materyal

3.2.1. Yem materyali

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Hayvan Besleme Laboratuvarında yürütülen çalışmada, erken ve orta laktasyon döneminde bulunan süt sığırları için hazırlanan iki farklı rasyon kullanılmıştır. Rasyonda yer alan karma yem özel bir yem fabrikasından satın alınmıştır. Kullanılan karma yemin besin madde içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Erken laktasyon dönemi rasyonu %40 *Leucaena leucocephala* + %60 Karma yemi, orta laktasyon dönemi rasyonu ise %60 *Leucaena leucocephala* + %40 Karma yemi formülasyonuna göre hazırlanmıştır. Rasyonlarda N dengesinin sağlanması amacı ile nitrat içermeyen rasyonlara üre ilavesi yapılmıştır.

Gaz üretimi ölçümü için 250 mg rasyon numunesi hazırlanıp şırıngalara konulmuştur. Rumen parametreleri (pH, CH₄, NH₃ ve UYA) 48 saat inkübasyon süresi sonunda enjektörlerdeki sıvıda belirlenmiştir. Rasyonda kullanılan *LL* yaprakları, Batı Afrika'da bir ülke olan Benin'den getirilmiştir. Katkı maddesi olarak kullanılan nitrat tuzu (NaNO₃) piyasadan temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan rumen sıvısı Samsun'un Atakum ilçesinde faaliyet gösteren özel bir mezbahadan temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan karma yemlerin besin madde içerikleri

Besin madde (%DM)	Erken laktasyon dönemi	Orta laktasyon dönemi
KM	87.88	87.81
OM	79.65	79.43
HP	21	19
HK	8.23	8.38
NDF	28.57	31
ADF	13.44	14.49
HS	10.55	11.93
ADL	4.14	5.08
Sodyum	0.42	0.41
Potasyum	1.06	1.03
Metiyonin	0.43	0.37
Lizin	0.74	0.69
Kalsiyum	1.04	1.01
Fosfor	0.80	0.83
HY	4.10	4.46
Şeker	5.6	5.02
Nişasta	17	16.03
Korunmuş nişasta	7.09	8.05
UFL	83.54	81.02
UFV	79	76.12
PDIN (g/kg KM)	147.35	132.72
PDIE (g/kg KM)	120.96	101.25
ME (kcal. kg ⁻¹ KM)	2550	2500

Vitamin büyükbaş A⁺ (1g/kg KM), mermer tozu (20 g/kg KM), tuz (5 g/kg KM), Niacin 200 (1g/kg KM), Novatan (1g/kg KM), Magnezyum oksit (2 g/kg KM), Maya (2 g/kg KM).

3.2.2. Rumen sıvısı temini

Mevcut çalışmada kullanılan rumen sıvısı, Samsun ili Atakum ilçesinde bulunan özel bir mezbahanedeki kesilen, rumen gelişimini tamamlamış 2 yaş ve 300 kg canlı ağırlığında olan Yerli Kara ırkı inekten alınan rumen sıvısı ve içeriği kullanılmıştır. Rumen içeriği süzgeçler yardımıyla süzülerek 38-40°C'deki termosada doldurulmuş ve seri bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

Rumen sıvısı alınan hayvanlar besi süresince sığır besi yemi ve fiğ kuru otundan oluşan rasyonla beslenmişlerdir. Mezbahanedeki alınan rumen sıvısında pH (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre), NH₃N, UYA analizleri ve protozoa sayımı yapılmıştır. Rumen sıvısı toplam UYA içeriği Wiedmeier et al.

(1987)'nın bildirdiği gibi gaz kromatografisi (Agilent Tech. 6890N GC, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df. Max. Sıcaklık: 260°C. Cat. 11023) ile Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü'nde iki tekerrürlü olarak belirlenmiştir.

Yaklaşık 5 ml rumen sıvısı içerisine dört damla sülfürik asit ilave edilerek soğuk zincir korunarak -20°C'de bekletilmiş ve 10000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş, her bir numuneden 2 ml örnek alınarak GC vialine aktarılmış ve okumalar yapılmıştır. Protozoa sayımı için 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (%37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvılarına benzerliğini ortaya koymak amacıyla rumen sıvısının pH, protozoa popülasyonu, amonyak azotu ve uçucu yağ asitleri (UYA) içerikleri yukarıdaki gibi belirlenmiştir. Böylece, denemede kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvısının özelliğine sahip olup-olmadığı kontrol edilmiştir.

Rumen sıvısının standart rumen sıvısı özellikleri taşıdığı yapılan pH (5.13-5.15), protozoa popülasyonu (11.41×10^4 /ml rumen sıvısı), uçucu yağ asitleri (TUYA: 106.60 ± 1.09 mmol/l; AA: 60.67 ± 0.56 mmol/l; PA: 22.22 ± 0.42 mmol/l; BA: 16.02 ± 0.09 mmol/l; izobütirik asit: 2.67 ± 0.02 mmol/l; izovalerik asit: 2.45 ± 0.01 mmol/l; valerik asit: 2.57 ± 0.02 mmol/l) ve amonyak azotu (5.37 ± 0.07 mg/dl) içerikleri analizleri sonrasında belirlenmiştir (Blümmel et al., 1997; Wiedmeier et al., 1987).

3.3. Yöntem

3.3.1. Muameleler

Mevcut çalışma 2 x 2 düzeninde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Nitrat ilaveli erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarda bulunan kaba/kesif yem ham maddeleri ve oranları (%KM)

Rasyonlar	Ham maddeler	Erken laktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
		Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
Kaba yem	LL	40	40	60	60
Kesif yem	Karma yem	60	60	40	40

Bu çalışmada, erken (%40 *Leucaena leucocephala* / %60 Karma yem) ve orta (%60 *Leucaena leucocephala* / %40 Karma yem) laktasyon aşamaları için iki farklı rasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan rasyonlar iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta nitrat (NaNO₃) kullanılmazken (üre kullanılmıştır), ikinci grupta % 5 NaNO₃ (yani 45.67 g NaNO₃/kg KM rasyon) kullanılmıştır. Rasyonların hazırlanması Şekil 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir. Muamele gruplarının rasyon içeriği Tablo 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Yem katkı maddelerinin (Nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması



Şekil 3.2. Rasyonların muhafazası veya depolanması

Tablo 3.3. Muamele grupları ve rasyon içeriği (g/kg KM)

İçindekiler	Muameleler (g.kg ⁻¹ KM)			
	Erken aktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
	Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
<i>Leucaena leucocephala</i>	400	400	600	600
Buğday kepeği	140.14	140.14	128	128
A.T.K. (%28)	-	-	62.08	62.08
D.D.G.S (Mısır)	78.6	78.6	48	48
A.T.K. (%36)	185.29	185.29	43.06	43.06
Mısır ekstrası	60	60	30.45	30.45
Kırık buğday (s-b)	42	42	28	28
A.T.K. elekalıtı	18	24	16	16
Melas	23.4	23.4	15.6	15.6
Mısır	13.2	13.2	-	-
Susam elekalıtı	9	9	8	8
Susam kepeği (tuzsu)	9	9	8	8
Potasyum	1.06	1.06	0.41	0.41
Metiyonin	0.43	0.43	1.03	1.03
Lizin	0.74	0.74	0.37	0.37
Sodyum nitrat	-	45.67	-	46.74
Üre	16.35	0	16.73	-
Kalsiyum	1.04	1.04	1.01	1.01
Fosfor	0.80	0.80	0.83	0.83
Şeker	5.6	5.6	5.02	5.02
Niştasta	17	17	16.03	16.03
Korunmuş niştasta	7.09	7.09	8.05	8.05
UFL	83.54	83.54	81.02	81.02
UFV	79	79	76.12	76.12
PDIN (g/kg KM)	147.35	147.35	132.72	132.72
PDIE (g/kg KM)	120.96	120.96	101.25	101.25
ME (kcal. kg ⁻¹ KM)	2550	2550	2500	2500

Vitamin büyükbaş A⁺ (0.6; 0.4 g/kg KM), mermer tozu (12; 8 g/kg KM), tuz (3; 2 g/kg KM), Niacin 200 (0.6; 0.4 g/kg KM), Novatan (0.6; 0 g/kg KM), Magnezyum oksit (0.6; 0.4 g/kg KM), Maya (0.6; 0.4 g/kg KM).

3.3.2. Rasyonların besin maddeleri içeriklerinin belirlenmesi

LL yaprakları 55°C'de 48 saat boyunca etüvde kurutulmuş ve daha sonra 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür. Laboratuvarda kimyasal kompozisyonu belirlenen öğütülmüş LL yaprakları karma yemle karıştırılarak rasyon elde edilmiştir.

Hazırlanan rasyonlarda KM (AOAC, 2000; yöntem 985.26), HP (AOAC, 2000; yöntem 990.03) ve HK (AOAC. 2000; yöntem 942.05) analizleri yapılmıştır.

ADF (AOAC, 2000; yöntem 7.074), NDF (AOAC, 2000; yöntem 2002.04), HS (AOAC,2000; yöntem 992.09) analizleri ise Van Soest et al. (1991) tarafından bildirildiği gibi ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır. HY içeriği (AOAC, 2000; yöntem 2003.05) ANKOM XT15 (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Kutlu, 2008). OM, selüloz (SEL= NDF-(HSEL+ADL)), hemiselüloz (HSEL= NDF-ADF) ve lif olmayan karbonhidrat (LOK= 100 -(HP+HK+ADF+HY)), NÖM (NÖM= OM - (HY+HP+HS)) içerikleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4.).



Şekil 3.3. HK, KM, NDF, ADF, ADL, ve HS analizleri



Şekil 3.4. HY ve HP analizleri

3.3.3. Yemlerin *in vitro* gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi

Mevcut çalışmada kullanılan rasyonların *in vitro* gerçek sindirilebilirlikleri, rumen gelişimini tamamlamış ve yukarıda tanımlanmış olan rumen içeriği (3.2.2. Rumen sıvısı temini) kullanılarak Ankom Daisy II inkubatör D220 cihazı ile belirlenmiştir. Mezbahanedeki kesimi takiben alınan ve sıcaklığı muhafaza edilerek

laboratuvara (içerisinde 39°C su bulunan iki adet termos içinde) taşınan rumen sıvısı karbondioksit tüpü ile beslenen 2 litrelik 39°C'de ısıtılmış bir erlen içine iki kat tülbentten, peynir süzgeci ile süzölmüş ve içerisine 2 avuç rumen katı içeriği ilave edilmiştir. Daisy inkübatörde 50 mm × 55 mm ebatlarında, polyester/polietilen karışımından yapılmış ve 25 µm den büyük partiköllerin geçemeyeceği porlardan oluşmuş azot içermeyen özel torbalar (Ankom F₅₇ torba) kullanılmıştır.

Her bir torbaya 1 mm' lik elekten geçirilmiş yem örneği tartılmış ve bütün rasyonlar 3 paralelli olarak test edilmiştir. İnkübatörde 4 (3 kavanozda tampon çözeltilisi, 1 kavanozda saf su bulunmaktadır) kavanoz yer almaktadır. Her 3 kavanoza 2 lt'lik inkübasyon sıvısı (1600 ml tampon çözeltilisi + 400 ml rumen sıvısı) CO₂ tüpü eşliğinde ilave edilmiştir. Kavanozlara CO₂ gaz akımı altında konulan torbalar 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolunca tüm torbalar kavanozlardan çıkartılıp su ile temizlendikten sonra 5 dakika boyunca asetonda bekletilen torbalar havada kurutulduktan sonra 105°C'deki etüvde 3 saat tutulmuştur.

Etüvden çıkartılan torbalar tartıldıktan sonra besin madde analizleri AOAC (2000) de belirtilen yöntemlere göre belirlenmiş, kuru madde bazında *in vitro* gerçek besin madde sindirilebilirlikleri (IVGS: *in vitro* gerçek sindirilebilirlik) süzgeç torba tekniği (Van Soest et al., 1991) kullanılarak Ankom Daisy inkübatör'de (Ankom, 2002) aşağıdaki gibi yapılmıştır. Mevcut çalışmada kullanılan tampon çözeltileri (A çözeltilisi ve B çözeltilisi) aşağıda detaylandırılan şekilde hazırlanmıştır.

A çözeltilisi: 2 litrelik balon içerisinde 20g KH₂PO₄, 1g MgSO₄.7H₂O, 1g NaCl, 0.2g CaCl₂.2H₂O ve 1g üre saf su ile çözüldürölmüştür.

B çözeltilisi: 1 litrelik balon içerisinde 15g Na₂CO₃ ve 1g Na₂S.9H₂O saf su ile çözüldürölmüştür.

Tampon Çözeltilerin Hazırlanması (Her bir silindir için): A ve B çözeltileri 39°C' ye kadar ısıtılmış; ayrı kaplarda bulunan B çözeltilisinden 266 ml, 1330 ml A çözeltilisi üzerine ilave edilmiştir. A ve B çözeltilerin hazırlanması aşamasında çözeltili pH'larının 39°C'de 6.8 civarında olmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan yaklaşık 1600 ml çözeltili (A + B çözeltileri) bir silindire ayrı ayrı koyulmuştur. Silindirler cihaza yerleştirilerek, ısıtma ile agitasyon düğmeleri aktif hale getirilmiş ve 20-30 dakika süresince tüm silindirlerin sıcaklığının eşit olması beklenmiştir. Bu bekleme süresinde rumen sıvısının toplanması ve rumen inokulumun hazırlanması sağlanmıştır.

Torbaların ve numunelerin hazırlanması: Çalışmamızda kullanılan F₅₇ filtre torbalarının daraları alındıktan (W₁) sonra 0.5 g numune (W₂) torbaya konulmuş ve torbaların ağzı sıcak mühürleme yardımıyla kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan torbalar kavanozlara eşit oranda olacak şekilde yerleştirilmiştir Her bir kavanoza bir adet boş F₅₇ torbası (C₁'in belirlenmesi amacı ile) yerleştirilmiştir. Daisy II inkübatöründe 48 saat bekletilen F₅₇ torbaları kavanozlardan çıkarılıp yıkandıktan sonra 3-5 dakika aseton içinde bekletilmiştir ve daha sonra tamamen havada kuru hale getirilmiştir.



Şekil 3.5. Daisy inkübatörde sindirilebilirlik çalışması

İnokulum ve İnkübasyonun Hazırlanması: Hazırlanan rumen inokulumundan 400 ml alınarak inkübatör kavanozlarına konulmuştur. Kavanozların her birine 30 saniye CO₂ gazı ilave edilip balon oluşumuna müsaade edilmeden kapağı kapatılmıştır. Cihaz iç sıcaklığı 48 saatlik inkübasyon süresince 39±0.5°C’de sabit tutulmuş ve elektrik kesilmesine karşı cihaza güç kaynağı bağlanmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında çıkartılan F₅₇ torbalarında NDF, ADF, ADL analizleri yapılmıştır. NDF analizinden sonra çıkan değer W₃ olarak kaydedilmiştir. *In vitro* gerçek besin madde sindirilebilirliği (İVGS) aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$\%iVGS = 100 - \left[\frac{(W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100}{W_2} \right]$$

- W₁: F₅₇ torbalarının darası
W₂: Kuru örnekteki NDF miktarı
W₃: İnkübasyon sonunda torbada kalan atıktaki NDF miktarı
C₁: Kör ağırlığı (inkübasyondan çıkartılıp etüvde kurutulduktan sonraki boş torba ağırlığı/orijinal torba ağırlığı)

3.3.4. *İn vitro* gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması

Toplam gaz üretiminin ölçülmesinde *in vitro* gaz üretim tekniği (Hohenheim) aşağıdaki detaylandırıldığı şekilde uygulanmıştır (Menke and Steingass, 1988). Yem örneği 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş, yaklaşık 250 mg havada kuru yem maddesi (200 mg KM) tartılarak enjektörün dibine yerleştirilmiş ve enjektörün pistonları gaz kaçışını engellemek amacıyla ilk 2-3 cm'lik kısmı hariç vazelinle yağlanmıştır. Örnek miktarının sınırlı tutulması toplam gaz üretiminin 90 ml'yi aşmayacak şekilde ayarlanmak istenmesiyle ilgili olup gaz üretiminin 90 ml'yi aştığı durumlarda ise biriken gaz (sıvı kısım hariç) dışarı atılmıştır ve bu değer hesaplamalarda dikkate alınmıştır.



Şekil 3.6. *İn vitro* gaz üretimi

Çalışmamızda kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Mikro mineral çözeltisi: 13.2g CaCl₂.2H₂O, 10.0 g MnCl₂.4H₂O, 1.0 g CoCl₂.6H₂O ve 8.0 g FeCl₃.6H₂O 100 ml saf suya tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisi: 4.0 g NH₄HCO₃ ve 35.0 g NaHCO₃ 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 8.1'e ayarlanmıştır.

Makro mineral çözeltisi: 5.7 g Na₂HPO₄ susuz, 6.2 g KH₂PO₄ susuz ve 0.6 g MgSO₄.7H₂O 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 6.8'e ayarlanmıştır.

Resazurin çözeltisi: 100 mg resazurin saf suda çözündürülerek, 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

İndirgeme çözeltisi: 1 Normal 4 ml NaOH, 625 mg Na₂S.9H₂O ve 95 ml saf su katılarak, her zaman taze olarak hazırlanmıştır.

Rumen sıvısı alınmadan hemen önce hazırlanan vasat (400 ml saf suya 0.1 ml mikromineral çözeltisi, 200 ml rumen tampon çözeltisi, 200 ml makromineral çözeltisi, 1.0 ml resazurin çözeltisi ve 40 ml indirgeme çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır) CO₂ gazı altında 39°C' deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak tutulmuş, rumen sıvısı eklenmeden önce sıcaklığın 39°C olup, olmadığı kontrol edilerek, ortamın renginin maviden pembeye ve şeffafa dönüp dönmediği gözlenmiştir (Renk değişimi ortamın indirgenmiş olduğunu göstermektedir).

Yemlemeden hemen önce alınan rumen sıvısı CO₂ ile beslenen 39°C' de ısıtılmış 2 litrelik bir erlen içine iki kat tülbentten süzülmüştür. Manyetik bir karıştırıcı üzerine oturtularak bir su banyosunda (39°C) tutulan bir şişede bir kısım rumen sıvısı iki kısım vasat ile karıştırılarak, sıvı içine bir tüp ile sürekli olarak karbondioksit gazı verilmiştir. Rumen sıvısı+vasat karışımından 30 ml bir otomatik pipet (dispenser) yardımıyla her biri daha evvel 39°C' de etüvde tutulmuş olan enjektörlere çekilmiştir. Enjektör içindeki gaz kabarcıkları ortamdaki uzaklaştırılarak, silikon boru üzerindeki plastik kısıkaçlar kapatılmış ve daha sonra enjektör içine alınan karışım miktarı (yaklaşık 30 ml) okunarak kaydedilmiştir.

Bütün enjektörlerin doldurulma işlemi yarım saati geçmeyecek şekilde tamamlanmış ve 39°C'ye ayarlı özel su banyosundaki enjektör desteklerine yerleştirilmiştir. İnkübasyonlar süresince okumalar 3, 6, 9, 12, 24, ve 48. saatlerde sıcaklık değişikliklerinin önüne geçebilmek amacı ile mümkün olduğu kadar hızlı yapılmıştır. Her okumadan sonra enjektörler enjektörün yan yüzeylerine yapışmış yem örneğinin tekrar rumen sıvısı içine alınması amacıyla hafifçe dört kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Gaz üretim (GÜ) miktarları aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$GÜ \text{ (ml/200mg KM, 24 saat)} = \frac{\frac{F_k + F_c}{2} (V_{24} - V_0 - GÜ_0) \times 200 \times \left(\frac{F_k + F_c}{2}\right)}{\text{ÖA}}$$

- V₀: İnkübasyon başlangıcında pistonun pozisyonu
V₂₄: 24 saatlik inkübasyondan sonra pistonun pozisyonu
GÜ₀: Örnek içermeyen rumen sıvısının 24 saatlik inkübasyonda ürettiği ortalama gaz miktarı.
ÖA: Enjektöre konulan örneğin ağırlığı (mg KM)

Gaz üretim parametreleri, NEWAY adlı PC paket program yardımıyla Ørskov and McDonald (1979)'ın bildirdiği aşağıdaki modele göre hesaplanmıştır.

$$Y = a + b(1 - e^{-ct})$$

- a : Hemen çözünebilir fraksiyondan oluşan gaz miktarı (ml)
b : Zamana bağlı oluşan gaz miktarı (ml)
c : Gaz üretim hızı
a+b: Potansiyel gaz üretimi (ml)
t : İnkübasyon süresi (saat)
y : t zamandaki gaz üretimi

Gaz üretimi sonucu elde edilen 24 saatlik gaz ölçüm değerleri ve örneklerin besin madde içerikleri kullanılarak örneğin metabolize edebilir enerji (ME) miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke et al., 1979).

$$ME(MJ/kg KM) = 1.06 + 0.1578GÜ + 0.084HP + 0.22HY + 0.081HK$$

GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM)

%İVOMS, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke and Steingass, 1988).

$$\%İVOMS = 0.45HP + 0.651HK + 14.88 + 0.889GÜ$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%)

Net Enerji Laktasyon (NE_L) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır(Schöner, 1981).

$$NE_L (MJ/kg KM) = 0.075GÜ + 0.087HP + 0.161HY + 0.056NÖM - 2.422$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%), HY: Ham yağ (%), NÖM: Azotsuz öz madde.

SOM aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke and Steingass, 1988).

$$\text{SOM(g/kg KM)} = 0.9991\text{GÜ} + 0.595\text{HP} + 0.181\text{HK} + 9$$

MPS aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (AFRC, 1993).

$$\text{MPS(mg/ml)} = \text{SOM} \times 0.032$$

KZYA aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Makkar, 2005).

$$\text{KZYA(mmol/l)} = 0.022\text{GÜ} - 0.00425$$

3.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesi

Denemede kullanılacak rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesinde infrared metan analizörü (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany model) kullanılmıştır (Goel et al., 2008). CH₄ miktarının belirlenmesi, *in vitro* gaz üretiminde 24 saatlik inkübasyon sonrasında yapılmış olup, 24 saat sonra enjektörlerde biriken gaz özel bir boru vasıtasıyla (plastik enjektörler kullanılarak) metan analizörüne alınmış ve CH₄ üretimi (ml) toplam gazın yüzdesi olarak belirlenmiştir. CH₄ üretiminin belirlenmesi Şekil 3.7.'de gösterilmiştir.

$$\text{CH}_4 \text{ üretimi (ml)} = \text{Toplam gaz üretimi (ml)} \times \% \text{CH}_4$$



Şekil 3.7. CH₄ üretiminin belirlenmesi.

3.3.6. Rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılacak rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi amacı ile 48 saat *in vitro* gaz üretiminden sonra enjektörlerden alınan 5 ml rumen sıvısında ham protein analizinde olduğu gibi bir damıtma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen titrasyon işleminde harcanan HCl (0.1) hacmi not belirlenerek altta verilen formülle NH₃ miktarı belirlenmiştir. NH₃ miktarı belirlenmesi Şekil 3.8.'de gösterilmiştir.

$$\text{NH}_3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \text{ rumen sıvısı} \right) = 0.1 \times 14 \times 1.22(\text{A} - \text{B}) \times 20$$

A: Örnek için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

B: Şahit için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

0.1: HCl titrasyon çözeltisinin normalitesi

14: Azotun mol ağırlığı



Şekil 3.8. İnkübasyonun 48 saatinde rumen sıvısında NH_3 miktarının belirlenmesi

3.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısında UYA içeriğinin belirlenmesi amacı ile inkübasyon öncesinde 2 adet wheaton şişesine 5 ml rumen sıvısı alınmış ve 4 damla H_2SO_4 ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan rumen sıvıları analizler yapılincaya kadar oda ısısında muhafazaya devam edilmiştir. 48. saatteki alınan rumen sıvısı da aynı işleme tabi tutulmuştur. Denemede kullanılan rumen sıvısının pH'ı laboratuvara getirilir getirilmez dijital pH metre (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre) ile belirlenmiştir.

Rumen sıvısı UYA Wiedmeier et al. (1987)'nin bildirdikleri yöntemle göre Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı laboratuvarlarında analiz edilmiştir. Rumen sıvısı uçucu yağ asitleri (asetik, bütirik, propiyonik, valerik, izovalerik ve izobütirik asit) analizi için rumen sıvısı 3000 devir/dakika santrifüj edilmiş ve üstte biriken kısımdan 10 ml alınmış ve üzerine 1.0 ml %25'lik fosforik asit ilave edilmiştir. Daha sonra gaz kromatografi cihazında okunması için 14000 devir/dakika santrifüj edilmiş ve örnekten 1.5 ml alınarak Agilent 6890N marka Gaz Kromatografi cihazına enjekte edilerek (Agilent Technologies 6890N gaz kromatografisi, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um df. Max. temp: 260°C. Cat. 11023) rumen sıvısı UYA içeriği saptanmıştır.

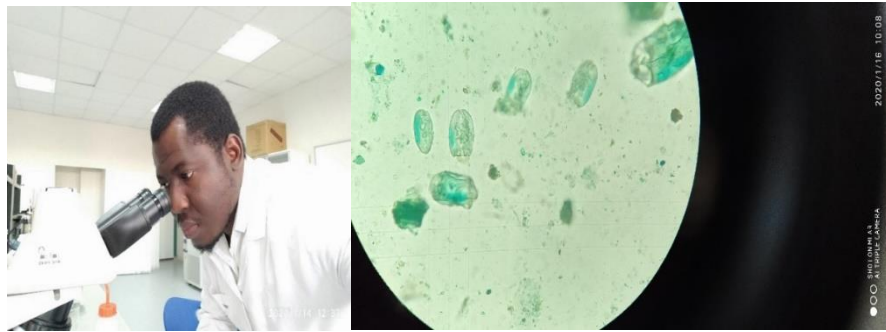
3.3.8. Protozoa sayımın belirlenmesi

Çalışmamızda, protozoa sayımı için 48 saatlik inkübasyon sonucunda enjektörden alınan 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (% 37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Hazırlanan bu karışım analiz zamanına kadar -20 C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır. Hesaplama alta verilen formülle yapılmıştır:

$$\text{cm}^3 \text{ (ml)'deki hücre sayısı} = 1000 \times \frac{\text{Sayılan hücre sayısı}}{\text{Sayılan toplam kare} \times \text{Sulandırma} \times \text{Hacim}}$$



Şekil 3.9. Metil yeşil formalin çözeltisi ve Fuchs-Rosenthal



Şekil 3.10. Protozoa sayısının belirlenmesi ve protozoa popülasyonu

3.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği

Rasyonların sindirilebilirlikleri belirlenmesinde kuru madde tüketimi ve kuru madde hesaplanmıştır.

$$\text{KMT}(\%CA) = \frac{120}{\%NDF}$$

KMT: Kuru madde tüketimi (%CA)

$$\text{KMS} = 88.9 - (0.779 \times \% \text{ADF})$$

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği

3.4. İstatistiksel analiz

Araştırma sonucunda elde edilen veriler (besin içeriği, *in vitro* gaz üretimi, *in vitro* sindirilebilirlik, vb.) gerekli varsayımlar (normallik ve varyansların homojenliği gibi) kontrol edildikten sonra 2 x 2 tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme tertibine göre istatistik analize tabi tutulmuştur. Denemenin matematik modeli,

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

olup, eşitlikte;

Y_{ijk} : i.inci uygulamaya tabi tutulan j.inci rasyon çeşidindeki k.inci örneğe ait gözlem değerini (gaz üretimi, vb.).

μ : popülasyon ortalamasını,

α_i : i.inci rasyonun etkisi

β_j : j.inci katkı maddesinin etkisi

$(\alpha\beta)_{ij}$: i.inci rasyon ile j.inci katkı maddesi çeşidinin interaksyonu

e_{ijk} : tesadüfi hatayı göstermektedir

Uygulamalar veya yem çeşitleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olması durumunda ortalamalarının karşılaştırılması için Duncan Çoklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisanslı SPSS 22.0 istatistiksel paket programından faydalanılmıştır.

3.5. Sonuçlar ve tartışma

3.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği

Çalışmamızda erken ve orta laktasyon için hazırlanan rasyonların besin maddeleri içerikleri Tablo 3.4'te sunulmuştur. İzonitrojenik rasyonlar elde etmek amacıyla kontrol gruplarında üre kullanılmıştır. Çalışmamızda erken ve orta laktasyonda kullanılan rasyonların HP ve lif (NDF ve ADF) içerikleri bazı çalışmalar ile uyumlu (Ahmed et al., 2017; Balgees et al., 2015; Macome et al., 2017; Ntiranyibagira et al., 2015; Veneman et al., 2015; Wanapat et al., 2009) bulunurken diğer bazı çalışmalar (Sharifi et al., 2018; Veneman et al., 2015) ile uyumsuz bulunmuştur. Mevcut ve daha önceki araştırma sonuçları arasındaki bu farklılıklar, çalışmamızda kullanılan kaba yemin (*Leucaena leucocephala*) HP içeriği ilişkili olabilir. Bir baklagil olan *Leucaena leucocephala* yüksek düzeyde HP (%25) içermektedir (Musco et al., 2016).

Tablo 3.4. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için hazırlanan rasyonların besin maddeleri içerikleri, (KM'nin %'si olarak)

Besin maddesi	Erken laktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
	4LL6KY		6LL4KY	
	Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
HK	9.28	9.15	8.50	8.02
NDF	33.80	35.09	36.86	37.74
ADF	20.71	21.25	23.00	23.65
HY	3.67	4.57	4.02	3.62
HP	23.55	23.65	22.67	23.07
HS	16.13	16.05	18.58	17.34
ADL	11.54	10.90	11.40	11.70
Hemiselüloz	13.09	13.84	13.86	14.09
Selüloz	9.17	10.35	11.60	11.95
OM	81.61	83.37	85.87	83.53
NÖM	38.26	39.10	40.60	39.50
LOK	42.79	41.38	41.81	41.64
Kondanse tanen (g/kg KM)	3.46	3.46	5.21	5.21

3.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının *in vitro* gaz üretimi (İVGÜ) üzerindeki etkileri

İVGÜ yöntemi, mali kaynakların sınırlı olduğu az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yem ham maddelerinin ve rasyonların besleyici değerinin değerlendirilmesinde kullanılabilir bir tekniktir (Maccarana et al., 2016). Bu yöntem çözünmeyen ve çözünen besin maddelerinin parçalanabilirliği (Babatoundé et al., 2011), fermantasyon kinetiği ve son ürünler (NH₃-N ve UYA vb.) hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır (Musco et al., 2016). Erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarına üre (kontrol gruplar) ve nitrat ilavesinin İVGÜ'ni önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Tablo 3.5.).

Kırksekiz saatlik inkübasyon süresinde laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksiyonu önemli bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 3.5.). Tüm inkübasyon sürelerinde nitrat ilavesi İVGÜ'ni azaltıcı yönde etki yapmıştır (p<0.05). Ayrıca, orta laktasyon dönemi rasyonlarının kullanılması durumunda İVGÜ'nin erken laktasyon rasyonlarının kullanılması durumuna göre düştüğü belirlenmiştir (p<0.05).

Tablo 3.5. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların *in vitro* gaz üretimi üzerindeki etkisi

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	3 Saat	6 Saat	9 Saat	12 Saat	24 Saat	48 Saat
Erken (4LL6KY)	Kontrol	17.48 ^a	29.66 ^a	40.25 ^a	46.18 ^a	49.23 ^a	55.15 ^a
	NaNO ₃	13.06 ^c	22.78 ^c	28.27 ^c	33.69 ^c	36.41 ^c	37.08 ^d
Orta (6LL4KY)	Kontrol	14.40 ^b	24.22 ^b	33.04 ^b	34.94 ^b	39.98 ^b	45.54 ^b
	NaNO ₃	13.40 ^c	22.89 ^c	28.69 ^c	32.11 ^d	36.19 ^c	38.25 ^c
Laktasyon dönemi (LD)							
Erken		15.27	26.22	34.26	39.94	42.82	46.12
Orta		13.90	23.56	30.87	33.53	38.09	41.90
Yem katkı maddesi (YKM)							
Kontrol		15.94	26.94	36.64	40.56	44.60	48.35
NaNO ₃		13.23	22.83	28.48	32.90	36.30	37.66
O.S.H		0.480	0.799	1.538	1.606	1.665	1.733
Ana etkileri							
LD		0.001	0.001	0.004	0.018	0.019	0.001
YKM		<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM		0.003	0.001	0.008	0.003	0.015	0.002

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Rasyonların fermantasyonundan kaynaklanan İVGÜ'nin azalması parçalanabilir hücre duvarı elemanları (NDF ve ADF) ve HP içerikleri ile ilişkili olabilir. Benzer bulgular Macome et al. (2017) tarafından da bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda rasyonda N kaynağı olarak üre kullanılması durumunda İVGÜ'de artış olduğu belirlenmiştir (Mazinani et al., 2018; Phesatcha and Wanapat, 2016; Phuong et al., 2011). Bu durum, ürenin rasyondaki lifli maddelerin sindirilme dereceleri üzerindeki artırıcı etkisiyle açıklanabilir (Kropp et et al., 1977; Lee et et al., 1987).

Bazı çalışmalarda, rasyonda üre kullanımına bağlı olarak lifli maddelerin sindiriminde düşüş olduğu bildirilirken (Köster et al., 2002), diğer bazı çalışmalarda lif sindiriminin üre kullanımından etkilenmediği ve artışlar olduğu bildirilmiştir (Lee et al., 1987; Robinson et al., 1998). Lifli maddelerin sindiriminde ortaya çıkan artışa bağlı olarak İVGÜ'de artış gerçekleşmektedir (Gunun et al., 2013; Nguyen et al., 2012). Çalışmamızda nitrat ilavesi ile (erken laktasyon ve orta laktasyon) saptanan en düşük İVGÜ değerleri Lee et al. (2017) çalışmalarında bulunan değerleri ile uyumludur.

Erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarının İVGÜ üzerindeki etkileri ile ilgili farklılıklar bu dönemlerde kullanılan rasyonların HP ve lifli maddeler (ADF ve NDF) içeriğindeki farklılıklara atfedilebilir (Durmaz ve Kamalak, 2019). Bu araştırmacılar, katran yoncasında NDF ve ADF içeriğinde HP aleyhine gözlenen artışın fermente olan maddelerin miktarını azalttığını ve bunun sonucu olarak gaz üretiminin düştüğünü bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, süt ineklerinin rumende stabil bir ortam sağlayarak rumen sağlığı ve mikrobiyal protein sentezini (MPS) sürdürebilmeleri için karmanın HP içeriği kadar lif içeriğinin de çok önemli olduğu fikrini desteklemektedir (Xu et al., 2014). Süt sığırlarının beslenmesinde kullanılan rasyondaki karma yem oranının artması (Ramos et al., 2009) veya karma yem karmasının farklı yem ham maddelerinden (buğday, samanı) oluşması (Sakthivel et al., 2012; Xu et al., 2014) durumunda OM, NDF ve ADF'nin ruminal sindirilebilirliğinin ve buna bağlı olarak da İVGÜ'nin arttırdığı bildirilmektedir. Bu bilgi, mevcut çalışmada erken laktasyon döneminde kullanılan rasyon'nin İVGÜ'ni düşürme sebebini açıklayabilir.

Aynı şekilde, rasyonda HP içeriğinin artışına bağlı olarak İVGÜ'de düşme olduğunu bildiren Cone and van Gelder (1999)'in bulgusu da bu sonucu destekler niteliktedir. Bu bilgiden hareketle rasyonlarda kullanılan lif kaynağı yem ham maddelerinde değişiklik yapmak suretiyle İVGÜ'nin arzulanan yönde

değiştirilebileceği söylenebilir (Xu et al., 2014). Mevcut çalışmada elektron alıcısı olarak nitrat ilavesinin erken ve orta dönem rasyona eklenmesinin İVGÜ üzerindeki etkileri, Bachruddin et al. (2019) tarafından bildirilen nitrat ilavesinin *in vitro* rumen fermantasyon koşullarını etkilemediği bulgusu ile aynı doğrultudadır. Lee and Beauchemin (2014), nitrat ilavesi ile toplam gaz üretiminde yaklaşık %30 oranında azalma olduğunu ve bunun da besin maddelerinin sindirilme derecelerindeki düşme ile ilişkilendirilebileceğini belirtmiştir. Bazı çalışmalarda, alternatif bir elektron alıcı olarak rasyona nitrat ilavesinin koyunlarda gaz üretimini azalttığı ortaya konulmuştur (Mamvura et al., 2014; van Zijderveld et al., 2010; Wang et al., 2016). Guyader et al. (2016) ve Sharifi et al. (2018) nitrat ilavesinin İVGÜ'ni inhibe ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada erken laktasyon ve orta laktasyonda nitrat ilavesi ile İVGÜ düşme göstermiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda erken laktasyon rasyonların (yüksek konsantre yem içeriği (% 60)) ve orta laktasyon rasyonlara kıyasla (yüksek kaba yem içeriği (% 60)) İVGÜ'ni düşürmüş bu bulgu daha önceki çalışmalar ile uyumludur (Guo et al., 2009; Lin et al., 2011, Liu et al., 2017; van Zijderveld et al., 2010). Sığır, koyun ve keçi gibi geniş getiren hayvanlar, proteinleri özellikle düşük kaliteli proteinleri ve üre gibi protein olmayan azotlu bileşikleri et veya süt gibi yüksek kaliteli hayvan proteinlerine dönüştürme konusunda eşsiz bir yeteneğe sahiptir. Bu yetenek rumen mikrobiyotasına atfedilmektedir (Xu et al., 2019).

Rasyonlara üre ilavesine bağlı olarak KMT ve KMS'de ortaya çıkan farklılık rumende karbonhidrat ve azot kullanımının senkronizasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Reid, 1953; Xu et al., 2019; Zadeh and Kor, 2013). Ayrıca, üre ilaveli (kontrol) karmaların nitrat ilaveli karmalardan daha yüksek İVGÜ'ne sahip olması, ruminal amonyak konsantrasyonunda üre kullanımı ile ortaya çıkan artışın sonucu olarak mikrobiyal fermantasyonda gözlenen artışın bir sonucu olabilir (Wang et al., 2016; Xu et al., 2019).

3.5.3. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının İVGÜ parametreleri (c ve a+b), metan (CH₄) üretimi, *in vitro* organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolik enerji (ME) ve net enerji laktasyon (NE_L) üzerindeki etkileri

Mevcut çalışmada, ele alınan muamelelere ait *in vitro* gaz üretim parametreleri (c, a+b), CH₄ üretimleri, *in vitro* organik madde sindirilebilirlikleri (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolize edilebilir enerji (ME), net enerji laktasyon (NE_L) içerikleri ile ilgili veriler Tablo 3.6'da sunulmuştur. Bütün muameleler arasında CH₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME ve NE_L bakımından farklılıklar tespit edilmiştir (p<0.05).

Gaz üretim hızını ifade eden “c” parametresi bakımından en yüksek değerler üre (kontrol gruplarında) katkılı erken (0.29 ml/saat) ve orta (0.28 ml/saat) laktasyon dönemi rasyonlarda belirlenmiştir. Öte yandan, bu çalışmada, laktasyon dönemi ve yem katkı maddesinin c değeri üzerine etkisi görülmemiştir (p>0.05). Ancak, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonunun c değeri üzerine etkisi önemli bulunmuştur (p=0.015). En yüksek ve en düşük toplam gaz üretim (a+b) değerleri sırasıyla üre katkılı (kontrol grup) orta laktasyon dönemi rasyonları (50.49 ml) ve nitrat katkılı orta laktasyon dönemi rasyonları (33.25 ml) için belirlenmiştir (p<0.01). Bazı çalışmalarda üre ilavesine bağlı olarak a + b parametresinde artış olduğu belirlenmiştir (Gunun et al., 2017; Phesatcha and Wanapat, 2016). Mevcut çalışmada nitrat ilavesi a+b parametresini düşürücü yönde etki yapmıştır (p<0.05).

Her 2 laktasyon döneminde de CH₄ üretimi nitrat kullanımına bağlı olarak azalmıştır (p<0.001). Bu bulgu nitrat ilavesinin kontrol grubuna kıyasla CH₄ üretimini yaklaşık %70 oranında azalttığını bildiren Zhou et al. (2011; 2012)'ın bildirişleriyle uyum içindedir. Aynı şekilde diğer bazı çalışmalarda da mevcut çalışmada bulunan sonuçlarla uyumlu olan bulgular elde edilmiştir (Liu et al., 2017; Olijhoek et al., 2016; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2015).

Tablo 3.6. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların *in vitro* CH₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME, ve NE_L değerleri üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	c	a+b	CH ₄	ME	NE _L	SOM	İVOMS
Erken (4LL6KY)	Kontrol	0.29 ^b	37.53 ^b	7.72 ^a	10.84 ^a	5.67 ^a	73.04 ^a	74.11 ^a
	NaNO ₃	0.21 ^a	37.00 ^c	6.91 ^c	9.79 ^b	4.93 ^d	60.77 ^c	63.61 ^c
Orta (6LL4KY)	Kontrol	0.28 ^b	50.49 ^a	7.30 ^b	9.46 ^c	5.51 ^b	65.34 ^b	68.19 ^b
	NaNO ₃	0.21 ^a	33.25 ^d	6.13 ^d	9.07 ^d	4.98 ^c	60.15 ^d	62.38 ^d
Laktasyon dönemi (LD)								
Erken		0.25	37.27	7.31	10.32	5.30	66.91	68.86
Orta		0.24	41.87	6.72	9.27	5.25	62.75	65.29
Yem katkı maddesi (YKM)								
Kontrol		0.29	44.01	7.51	10.15	5.59	69.19	71.15
NaNO ₃		0.21	35.13	6.91	9.43	5.00	60.46	62.99
O.S.H		0.016	1.871	0.434	0.234	0.096	1.518	1.359
Ana etkiler								
LD		0.892	0.027	0.014	0.008	0.043	0.032	0.038
YKM		0.964	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM		0.015	0.001	0.008	0.046	0.004	0.027	0.032

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

c (ml/saat), a+b (ml), CH₄ (ml), ME (MJ/kg KM), NE_L (MJ/kg KM), SOM (g/Kg KM), İVOMS (%)

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Bu arada, El-Zaiat et al. (2014), rasyon kuru maddesinin % 2.7'si oranında katılan kapsüllenmiş nitratın üre ilavesine göre %33 daha az enterik CH₄ ürettiğini bildirmiştir. Hulshof et al. (2012) sığırlarda %60 şeker kamışı + %40 konsantre yemi karmasına üre (KM'nin% 1.2'si) veya nitrat (KM'nin% 2.2'si) ilave etmiş ve sonuçtan nitrat ilaveli karmanın üre ilaveli karmaya göre CH₄ üretimini %32 oranında azalttığını belirlemiştir. Leng (2014) ise nitratın CH₄ üretimi üzerindeki etkisinin rasyonda kullanılan nitrat seviyeleri ile arttığını bildirmiştir.

Nitrat ilavesinin CH₄ üretimi üzerindeki azaltıcı etkisi nitratın CH₄ üretiminde (metanogenesis) kullanılan ruminal H₂ konsantrasyonunu azaltıcı etkisinden (hidrojen bataklığı) (Adejoro and Hassen, 2017; Guyader et al., 2015) ve nitratın bir indirgenme ürünü olan nitritin metan üreten (metanojenik) bakterilerin rumende bulunma oranları üzerindeki azaltıcı etkisinden (Lee et al., 2017; Lund et al., 2014) kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Mevcut çalışmada CH₄ üretimi ile ilgili bulunan bulgular, zamana bağlı olarak bazı yem katkı maddelerinin ruminal koşullara uyum sağladığını ve bu durumda

katkı maddelerinin etkisinin ortaya çıkmadığını ileri süren Duthie et al. (2017)'nin bulguları ile çelişmektedir.

Bazı çalışmalarda rasyona *Leucaena leucocephala* kullanıldığında CH₄ üretimini azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak, *Leucaena leucocephala*'nın CH₄ üretimi üzerindeki etkisi proteinler ve polisakkaritler ile kompleksler oluşturan yoğunlaştırılmış tanen içeriği ile ilişkilendirilebilir. Bu durumun rumendeki besin maddelerinin parçalanma oranı düşürdüğü belirlenmiştir (Makkar et al., 1995; Schofield et al., 2001). Bununla birlikte, Soltan et al. (2013), *Leucaena leucocephala*'nın rasyona % 40 dahil edilmesiyle CH₄ üretimin yaklaşık %32.1 oranında azaldığını bildirmiştir.

Erken laktasyon dönemi rasyonu için CH₄ üretimi (7.31 ml) orta laktasyon dönemi rasyonu için bulunan değere (6.72 ml) göre yüksek bulunmuştur (p=0.014). Yem tüketimi ve rasyon bileşimi ruminal CH₄ üretimini etkilemektedir. Normalde konsantre yemlerce zengin rasyonların kaba yemlere dayalı rasyonlara kıyasla daha az CH₄ ürettiği bilinmektedir (Gemeda and Hassen, 2014; Mirzaei-Aghsaghali and Meheri-Sis, 2011). Kaba yem oranı daha yüksek olan orta laktasyon dönemi rasyonların için CH₄ üretiminin beklenenin aksine düşük olması, çalışmada kaba yem kaynağı olarak kullanılan *Leucaena leucocephala* bitkisindeki yüksek tanen içeriği ile açıklanabilir (Hariadi and Santoso, 2010).

Mevcut çalışmada laktasyon dönemi (p<0.05) ve yem katkı maddeleri ilavesinin (p<0.05) ME, NE_L, SOM, İVOMS değerlerini etkilendiği belirlenmiştir. En yüksek ME (10.84 MJ/kg KM), NE_L (5.67 MJ/kg KM), SOM (73.04 g/kg KM) ve İVOMS (%74.11) değerleri üre ilaveli (kontrol grubunda) erken laktasyon rasyonun kullanılması durumunda elde edilmiştir (p<0.05). Erken ve orta laktasyon dönem rasyonlarına nitrat ilavesi SOM, İVOMS, ME ve NE_L değerlerini düşürücü yönde etki yapmıştır (p<0.001).

Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu İVOMS, SOM, NE_L ve ME değerleri bakımından önemli bulunmuştur (p<0.05). Her iki laktasyon döneminde de kontrol gruplarında (üre ilavesinden dolayı) İVOMS değerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, önceki çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Adejoro et al., 2019; Khattab et al., 2013).

Çalışmamızda, erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarına nitrat ilavesi (kontrol gruplarına kıyasla) ME değerini düşürmüştür ($p < 0.001$). Mevcut sonuç Reynolds et al. (2014) buldukları ile uyumludur. Ancak, önceki çalışmalarda, rasyona nitrat eklendiğinde ME'nin arttığı bildirilmiştir (Lee et al., 2015a; van Zijderveld et al., 2011). Her iki (erken ve orta) laktasyon döneminde, kontrol gruplar (üre ilavesinden dolayı) İVOMS ve SOM artmıştır. Adejoro ve Hassan (2017) üre ilavesinin sindirilebilirlikle ilgili parametreleri (İVOMS ve SOM) nitrat ilavesine göre daha fazla artırdığını bildirmiştir. Bu bulgu mevcut çalışmadaki bulgularla uyum göstermektedir.

Çalışmamızda NE_L değeri yem katkı maddesi ilavesinden etkilenmiştir ($p = 0.001$). Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonun NE_L değerine etkisi bulunmuştur ($p < 0.05$). Çalışmamızda en yüksek NE_L değeri üre ilaveli (kontrol grup) (5.67 MJ/kg KM), en düşük NE_L değeri nitrat katkılı (4.93 MJ/kg KM) erken laktasyon rasyonların için belirlenmiştir. Bu çalışmada bulunan NE_L değerleri Klop et al. (2016) çalışmalarında bulunan değerlerle uyum göstermektedir.

3.5.4. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri

Kırk sekiz saat süreyle tamponlanmış rumen sıvısı içinde inkübe edilen iki laktasyon (erken ve orta) döneminde süt inekleri için hazırlanan üre (kontrol gruplarında) ve nitrat ilaveli rasyonların rumen fermantasyon özellikleri, MPS, KZYA, pH ve protozoa sayısı üzerindeki etkileri Tablo 3.7'de sunulmuştur. Mevcut çalışmada, muameleler için belirlenen pH değeri 5.94 - 6.03 arasında değişmektedir (Tablo 3.7). pH, laktasyon dönemi ($p = 0.171$) ve kullanılan yem katkı maddeleri ($p = 0.108$) tarafından etkilenmemiştir. Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonun pH değerlerine etkisi bulunmamıştır ($p = 0.212$). Çalışmamızda bulunan pH değerleri diğer bazı çalışmalarda bulunan pH değerleri (5.7 - 6.5) ile uyum içindedir (Olijhoek et al., 2016; Reynolds et al., 2014; Wanapat et al., 2009).

Üre ilavesinin artışına bağlı olarak NH_3 konsantrasyonu ve TUYA'nın artışına bağlı olarak da rumen pH'nın doğrusal artış göstermesi beklenen bir durumdur. Ancak, mevcut çalışmada muamelelerin pH değerleri arasında farklılık bulunmadığı gibi, tüm muamelelerin pH değerleri normal pH değerlerinin altındadır (6.1 - 6.8; Van Soest, 1982). Ruminal pH, rumendeki NH_3 seviyesi ile TUYA arasındaki dengenin bir

sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Xu et al., 2019). Rumen sıvısı donörü olarak kullanılan hayvanların beslenmesinde kullanılan rasyonların besin madde içeriği de, çalışmalar arasında büyük farklılıklara neden olabilmektedir (Rymer et al., 2005). Mevcut çalışmada kullanılan rumen sıvısı besi sığırından alındığı için amilolitik bakterilerin aktivitesi için uygun olmuş olabilir (Murphy et al., 1982). Diğer taraftan, karma yemlerce zengin karmaların kullanılması pH'ın düşmesine neden olmaktadır (Harun ve Sali, 2019; Zadeh and Kor, 2013). Bu bilgiler, mevcut çalışmada, erken laktasyon döneminde belirlenen düşük pH düzeylerini açıklayabilir.

Mevcut çalışmada laktasyon dönemi ($p < 0.001$) ve yem katkı maddesi ($p < 0.001$) $\text{NH}_3\text{-N}$ üretimini etkilemiştir. Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonunun $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlerine etkisi önemli bulunmuştur ($p=0.004$). Tüm muamelelerde $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu 7.02 ila 9.08 mg/dl arasında değişmektedir. $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu erken laktasyonda daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada, nitrat (kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında) ilaveli olan rasyonlarda, $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (Guyader et al., 2015; Lee et al., 2015a; Lee et al., 2017; Li et al., 2012; Olijhoek et al., 2016; van Zijderveld et al., 2011). Ancak, Guyader et al. (2016) nitratın fermantasyon profilini değiştirdiğini ve $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu azalttığını bildirmiştir. Aynı araştırmacılar hem nitratın hem de ürenin ruminal mikroorganizmalar tarafından amonyağa dönüştürüldüğünü bildirmişlerdir. Bazı araştırmalarda 3 ila 5 mg/dl arasındaki NH_3 konsantrasyonlarının ruminal mikroorganizma gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir (Patra and Yu, 2015; Satter and Slyter, 1974).

Çalışmamızda erken ve orta laktasyon döneminde kontrol grup olan rasyonda kaydedilen $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun azalması (üre ilavesine bağlı olarak), rasyon proteinine tanen bağlanması nedeniyle protein sindirilebilirliğinin azaltılmasıyla açıklanabilir. Bu bulgu, birçok çalışma ile uyumlu bulunmuştur (Adejoro and Hassen, 2018; Carulla et al., 2005; Waghorn, 2008). Metanojenez ile karşılaştırıldığında, nitrat azalması daha enerjik ve elverişlidir. Nitratın amonyağa dönüşümü çok fazla hidrojen kullanır. Nitratın amonyağa dönüşümünde metanogenesis (CH_4 üretimi) olayına göre daha fazla hidrojen kullanıldığından rumende gerçekleşen nitrat indirgenmesi (nitratın amonyağa dönüşümü) enerji kullanım etkinliği açısından metanogenesis ile karşılaştırıldığında daha elverişlidir (Ungerfeld and Kohn, 2006). Nitratın amonyağa

indirgenmesi durumunda yüksek düzeyde hidrojen kullanılması durumunda ortamda CH₄ üretimi için hidrojen atomu kalmamakta ve dolayısıyla metan üretimi azalmaktadır (Lee et al., 2017; van Zijderveld et al., 2011). Bu durum, çalışmamızda, üre (kontrol gruplarda) ilaveli karmalarda amonyak üretiminin düşük, MPS üretiminin yüksek olması ile ilişkilendirilebilir.

Mevcut çalışmada, 48 saatlik inkübasyon sonrasında laktasyon döneminin AA (p<0.001), PA (p=0.024), BA (p<0.001), TUYA (p<0.001) ve AA: PP oranını (p=0.002) etkilediği belirlenmiştir. Ancak yem katkı maddesi ilavesinin AA: PP oranı etkilemediği bulunmuştur (p=0.856). Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu AA (p=0.010), PA (p=0.030), BA (p=0.008), TUYA (p=0.009) ve AA: PP oranı (p=0.027) için önemli bulunmuştur. Çalışmamızda, erken laktasyon döneminde kullanılan rasyon için AA konsantrasyonu orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonuna göre düşük saptanmıştır (p<0.001). Orta laktasyon dönemi rasyonunda kaba yem içeriğinin yüksek olması bu durumu açıklamaktadır. Macome et al. (2017), AA konsantrasyonundaki artışın rasyonun lif içeriğinde (bu durumda NDF ve ADF) bir artışla bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Rasyonun lifli madde içeriğinin artışına bağlı olarak AA ve CH₄ üretiminde kullanılan ruminal H konsantrasyonu artış gösterir.

Nitrat ilavesi her 2 laktasyon dönemi için AA konsantrasyonunu düşürmüştür (p<0.001). Bu bulgu bazı çalışmalarla (Adejoro et al., 2018; Guo et al., 2009; Lee et al., 2017; Le Thi Ngoc Huyen et al., 2010; Nolan et al., 2010) uyum göstermektedir. Mevcut çalışmada hem erken laktasyon döneminde hem de orta laktasyon döneminde kontrol grup olan rasyonların (üre ilavesinden dolayı) AA konsantrasyonunu arttırdığı saptanmış olup bu bulgu üre ilaveli rasyonların nitrat ilaveli rasyonlara kıyasla AA konsantrasyonunu arttırdığını bildiren Adejoro and Hassen (2017)'in bulgusuyla uyum göstermektedir. Mevcut çalışmada, erken laktasyon dönemi rasyonları PA konsantrasyonunu artırıcı yönde etki yapmıştır (p=0.024). Bu durum erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarının kompozisyonları farklılığından ileri gelmektedir. Orta laktasyon dönemi rasyonlarında karma yem oranının düşük olması PA konsantrasyonunda oranında düşmeye yol açmaktadır. Erken laktasyonda nitrat ilaveli olan rasyonun PA konsantrasyonunu azaltırken orta laktasyonda nitrat ilavesinin PA konsantrasyonunu artırdığı bulunmuştur (Tablo 3.7.).

Bu bulgular Adejoro et al. (2017) ve Nolan et al. (2010)'ın bulguları ile uyum içerisinde. Mevcut çalışmada nitrat ilavesine bağlı PA konsantrasyonunun düşüşü rumende PA ve NH₃-N sentezi arasındaki rekabetle açıklanabilir. Ancak çalışmamızda kontrol grup olan rasyonun (üre ilavesine bağlı) PA konsantrasyonunun artışı Adejoro and Hassen (2017)'in çalışmaları ile uyum göstermektedir. Erken ve orta laktasyonda nitrat ilavesi BA konsantrasyonunu düşürmüştür (p<0.001). Bu bulgu Adejoro and Hassen (2017)'in çalışmasında elde edilen bulgularla uyum içerisinde. Aynı araştırmacılar *in vitro* fermantasyonda tanen ve ürenin birleşik etkisinin BA konsantrasyonunu arttırırken tanen ve nitratın birleşik etkisinin ise BA konsantrasyonunu azalttığını bulmuşlardır. Diğer çalışmalarda nitrat ilavesinin BA konsantrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Guo et al., 2009; Mamvura et al., 2014; Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010).

Mevcut çalışmada kesif yemce zengin erken laktasyon rasyonun kaba yemce zengin orta dönem laktasyon rasyona kıyasla daha yüksek düzeyde BA ürettiği belirlenmiştir. Bu durum erken laktasyon rasyonun kullanılması durumunda NH₃-N konsantrasyonunda ortaya çıkan artışla açıklanabilir. NH₃-N konsantrasyonundaki artışın bakteriyel gelişimi inhibe ettiğini ve rumende BA üretimine yönelik bir fermantasyonu teşvik ettiği söylenebilir (Spanghero et al., 2017). Çalışmamızda TUYA içeriğinin nitrat ilavesi ile azalma gösterdiği belirlenmiştir (p<0.001). Bu bulgu nitrat ilavesine bağlı olarak TUYA içeriğinde düşme olduğunu bildiren Adejoro and Hassen (2018)'in bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Aynı şekilde diğer bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Guo et al., 2009; Lin et al., 2011; Mamvura et al., 2014; Nolan et al., 2010; Patra and Yu, 2015). Liu et al. (2017) ise nitrat ilavesinin TUYA üretimini etkilemediğini bildirmiştir. Çalışmamızda, erken laktasyon döneminde nitrat ilavesinin AA: PA oranını artırdığı, ancak aynı etkinin orta laktasyon döneminde ortaya çıkmadığı belirlenmiştir. Nitrat ilavesine bağlı olarak PA konsantrasyonunun düştüğünü bildiren bazı çalışma bulguları (Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2011) bu sonucu destekler niteliktedir. Mevcut çalışmada, PA konsantrasyonundaki artışın AA: PP oranının azalmasına yol açtığı bulunmuş olup bu bulgu bazı çalışmalar ile uyum içerisinde (Beauchemin et al., 2007).

Önceki çalışmada, üre ilaveli rasyonla beslenen hayvanların rumen AA içeriklerinde düşme, PA içeriğinde ise artış olduğu belirlenmiştir bulunmuştur (Carulla

et al., 2005). Mevcut çalışmada, AA: PP oranındaki düşüşü lifli maddelerin sindirilme derecelerindeki düşme ile ilişkilendirmiştir. Soltan et al. (2017), *Leucaena leucocephala* kullanımının PA konsantrasyonunu azalttığını ve AA: PP'yi artırdığını bildirmiştir.

Mevcut çalışmada KZYA içeriği orta laktasyon dönemi rasyon için (0.94 mmol/l) erken laktasyon rasyon için bulunan değere (0.85 mmol/l) göre yüksek bulunmuştur ($p=0.024$) ve Nitrat ilavesi KZYA konsantrasyonunu düşürmüştür ($p<0.001$). Bu bulgu kaba yem ağırlıklı rasyonların ruminal KZYA içeriğini kesif yem ağırlıklı rasyonlara kıyasla yükselttiğini bildiren Negesse et al. (2018)'nin bulguları ile uyum göstermekte iken nitrat ilavesinin KZYA konsantrasyonunu etkilemediğini bildiren El-Zaiat et al. (2014)'in çalışması ile çelişmektedir.

Mevcut çalışmada üre ilavesine bağlı BA konsantrasyonu ve KZYA içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Ancak nitrat ilavesi BA konsantrasyonunu azaltırken KZYA içeriğini düşürmüştür. Bu bulgu bazı çalışmalar (Etschmann et al., 2009; Penner et al., 2011) ile uyumludur. Ayrıca, Broderick et al. (2007), rumende KZYA üretimindeki artışın rasyondaki yüksek konsantre yemin oranı ve karbonhidrat fermantasyonu ile ilişkilendirmiştir. Bununla birlikte, Sehested et al. (2000), bütirat emilimindeki artışın rumende KZYA konsantrasyonunda bir artışa yol açtığını bildirmiştir.

Mevcut çalışmada, PS nitrat ilavesine bağlı olarak azalma göstermiştir ($p<0.001$). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum içerisindedir (Asanuma et al., 2015; Lin et al., 2011; 2013; Sun et al., 2017; van Zijderveld et al., 2010; Zhou et al., 2012). Bazı çalışmalarda, protozoa popülasyonunun nitrat ilavesi ve rasyondaki yem kaynaklarının yapısında bulunan sekonder metabolitlerin varlığından etkilendiği ileri sürülmektedir. Bazı araştırmacılar protozoa popülasyonunun bu çalışmada da kullanılan *Leucaena leucocephala* gibi bitkisel yem kaynaklarının yapısında yer alan sekonder metabolitlerin (tanen gibi) varlığından etkilendiğini bildirmiştir (Cieslak et al., 2013, 2014; Rodriguez et al., 2014; Soltan et al., 2013; Tan et al., 2011). Erken laktasyonda PS orta laktasyon dönemine göre yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bu sonuç bazı çalışmalar (Franzolin and Dehority, 1996) ile uyumlu bulunurken Pirondini et al. (2015) çalışmaları ile uyumsuzdur.

Tablo 3.7. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri MPS, KZYA, pH ve PS üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	NH ₃ -N (mg/dl)	UYA(mmol/l)				AA: PA	KZYA (mmol/l)	MPS (mg/ml)	PS (x10 ⁴ /ml)	pH
			AA	PA	BA	TUYA					
Erken (4LL6KY)	Kontrol	8.03 ^c	45.88 ^c	15.70 ^a	12.88 ^a	78.87 ^a	2.97 ^d	1.09 ^a	2.34 ^a	34.40 ^a	5.98
	NaNO ₃	9.08 ^a	42.62 ^d	13.00 ^b	11.14 ^b	71.12 ^d	3.29 ^c	0.80 ^c	1.93 ^c	31.70 ^b	5.94
Orta (6LL4KY)	Kontrol	7.02 ^d	47.04 ^a	12.27 ^d	11.35 ^b	75.22 ^b	3.85 ^a	0.89 ^b	2.09 ^b	28.30 ^c	6.03
	NaNO ₃	8.79 ^b	46.14 ^b	12.91 ^{cd}	10.84 ^c	73.17 ^c	3.48 ^{ab}	0.81 ^c	1.95 ^c	27.50 ^d	5.97
Laktasyon dönemi (LD)											
Erken		8.31	44.25	14.35	12.01	74.99	3.13	0.85	2.02	33.02	5.96
Orta		7.44	46.59	12.59	11.09	74.19	3.66	0.94	2.13	27.90	6.00
Yem katkı maddesi (YKM)											
Kontrol		7.53	46.46	13.98	12.11	77.04	3.40	0.99	2.21	31.32	6.01
NaNO ₃		8.94	44.38	12.96	10.99	72.14	3.38	0.80	1.94	29.60	5.96
O.S.H.		0.242	0.464	0.456	0.221	0.845	0.101	0.034	0.048	74.461	0.010
Ana etkileri											
LD		<0.001	<0.001	0.024	<0.001	<0.001	0.002	0.024	0.048	<0.001	0.171
YKM		<0.001	<0.001	0.018	<0.001	<0.001	0.856	<0.001	<0.001	<0.001	0.108
LD × YKM		0.004	0.010	0.030	0.008	0.009	0.027	0.016	0.026	0.010	0.212

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası, AA: Asetik asit, PA: Propiyonik asit, BA: Bütirik asit, KZYA: Kısa zincirli yağ asit, MPS: Mikrobiyel protein sentezi, PS: Protozoa sayısı

Ancak Patra and Yu (2013) protozoa popülasyonunun nitrat ilavesinden etkilenmediğini bildirmiştir. Nitrat ve ikincil metabolitlerin bir kombinasyonu protozoal popülasyonu azalttığı bildirilmiştir. Mevcut çalışmada sekonder metabolitler (saponinler, tanen) açısından zengin bir baklagil olan *Leucaena leucocephala* kullanmıştır. Çalışmamızda, protozoa popülasyonunun azalması tanen ve nitratın birleşik etkisi ile açıklanabilir.

Mevcut çalışmada, nitrat ilavesinin MPS üzerindeki etkisi protozoa sayısı üzerindeki etkisine benzer bulunmuştur ($p<0.001$). Başka bir ifade ile nitrat ilavesi her 2 laktasyon döneminde PS ve MPS'ni düşürmüştür ($p<0.001$). Çalışmamızda, orta laktasyon rasyonun için belirlenen MPS değeri (2.13 mg/ml) erken laktasyon rasyonun için bulunan değere (2.02 mg/ml) göre yüksek bulunmuştur ($p=0.048$). Mevcut çalışmada nitrat ilavesinin MPS üzerindeki azaltıcı etkisi diğer bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (Wang et al., 2018; Witzig et al., 2018).

Ancak, Nguyen et al. (2016) nitrat ilavesinin MPS'i artırdığını bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalarda ise MPS üre ilavesine bağlı olarak artış göstermiştir (Alende et al., 2019; Merry et al., 2006; Milton et al., 1997; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Aynı şekilde, Johnson and Johnson (1995), rasyona üre ilavesinin MPS'ni ve hayvan için metabolize edilebilir protein tedarikini teşvik ettiğini bildirmiştir. Alende et al. (2019), MPS'nin kısmen azot kaynağına bağlı olduğunu bildirmiştir.

MPS bakımından Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu önemli bulunmuştur ($p=0.026$). Mevcut çalışmada erken ve orta laktasyon dönemlerinde kontrol gruplarında MPS ve KZYA değerleri yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, kontrol gruplarında kullanılan üre varlığı ile ilişkilendirebilir. Nitekim, bazı araştırmacılar üre ilavesinin MPS ve KZYA üretimlerini artırdığını bildirmiştir (Anggraeni et al., 2017; Parker et al., 1995).

3.5.5. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri

Çalışmamızda, erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat ilavesinin *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri ile ilgili veriler Tablo 3.8'de gösterilmektedir. Nitrat ilavesi, İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerini düşürücü

yönde etki yapmıştır ($p < 0.001$). İVGS, İVNDFS ve İVADFS laktasyon döneminden etkilenmiştir ($p < 0.001$). Mevcut çalışmada, erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonlar yüksek İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonların kolay çözünebilir karbonhidratlarca zengin olmasına bağlanabilir.

Bu sonuç bazı çalışmalar ile uyum içerisindedir (Carro and Miller, 1999; Chiquette et al., 1995; Paula et al., 2019). Ayrıca, Paula et al. (2019), konsantre yemlerin rumen fermentasyonunu iyileştirirken İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerinde de artışa yol açtığını bildirmiştir. Mevcut çalışmada, nitrat ilavesi, İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerini düşürücü yönde etki yapmıştır ($p < 0.001$).

Cherdthong vd. (2011), rasyonlara üre ilavesi yapılması durumunda İVGS'nin artış gösterdiğini bildirmiştir. Aynı şekilde, Adejoro et al. (2019) (*in vivo*) ve Khattab et al. (2013) (*in vitro*) üre ilavesine bağlı olarak edildiğinde NDF ve ADF sindirilebilirliğinde bir artış ortaya çıktığını bildirmiştir.

Nitrat ilavesine bağlı olarak İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerinde ortaya çıkan düşmenin nitratın ruminal anaerobik bakterilerin, özellikle de selülitik bakteri türlerinin (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*) üzerindeki negatif etkisinden (Zhou et al., 2011) kaynaklandığı söylenebilir. İVGS, İVNDFS ve İVADFS bakımından laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksiyonu önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Nitrat, nitrit veya her ikisinin birlikte rumen mikroorganizmaları, özellikle de fibrolitik (selülitik) bakterilerin üzerinde toksik bir etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Guyader vd., 2015; Latham et al., 2016; Lund et al., 2014). Mevcut çalışmada, İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerinde nitrat kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan düşme bahsedilen bu toksik etkiye atfedilebilir. Bazı çalışmalarda nitrat ilavesinin İVNDFS üzerinde etkisi bulunmadığı belirlenmiştir (Olijhoek et al., 2016; Sun et al., 2017; van Zijderveld et al., 2011).

Table 3.8. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlarda nitrat kullanımının *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	İVNDFS	İVADFS	İVGS
Erken (4LL6KY)	Kontrol	74.40 ^a	62.61 ^a	74.41 ^a
	NaNO ₃	73.19 ^b	56.33 ^c	66.12 ^b
Orta (6LL4KY)	Kontrol	74.12 ^a	62.36 ^a	74.32 ^a
	NaNO ₃	68.84 ^c	52.10 ^b	61.45 ^c
Laktasyon dönemi (LD)				
Erken		73.80	59.47	70.27
Orta		71.48	57.23	67.89
Yem katkı maddesi (YKM)				
Kontrol		74.26	62.48	74.37
NaNO ₃		71.01	54.22	63.79
OSH		0.644	1.181	1.458
Ana etkiler				
LD		0.004	0.010	0.003
YKM		<0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM		0.008	0.019	0.002

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Mevcut çalışmada, nitrat ilavesine bağlı olarak İVNDFS, İVADFS ve İVGS değerlerinde ortaya çıkan azalma nitrat ilavesi ile kaydedilen *in vitro* besinlerin sindirilebilirliği (NDF ve ADF) ve İVGS'in azalmasına etki eden tanen ve nitratın ilişkili etkisi ile açıklanabilir. Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum içerisindedir (Adejoro et al., 2019; Kamra et al., 2012; Molina-Botero et al., 2013). Beauchemin et al. (2007) ve Makkar (2003) kondanse tanenlerin rumende protein, lif sindirilebilirliği ve mikrobiyal protein sentezini düşürebildiğini bildirmiştir. Nitrat ilaveli rasyonların İVNDFS ve İVADFS değerleri benzer bulunmuş, ancak bu durum KMS'ne yansımamıştır.

3.5.6. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri

Çalışmamızda kullanılan rasyona ait KMT, ve KMS ile ilgili veriler Tablo 3.9'da verilmiştir. Genel anlamda değerlendirildiğinde KMT ve KMS ile ilgili sonuçların laktasyon dönemi ve nitrat ilavesinden etkilendiği görülmektedir

($p < 0.001$). Aynı şekilde, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu da önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Nitrat ilavesi KMT ve KMS’i düşürmüştür ($p < 0.001$).

KMS ve KMT bakımından laktasyon dönemleri arasında gözlenen farklılıklar erken ve orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonların kompozisyonlarındaki farklılıkla açıklanabilir. Erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonun genel anlamda sindirilebilirliği yüksek kesif yemlerce zengin olması bahsedilen farklılığın sebebini açıklayacak niteliktedir. Çalışmamızda ele alınan KMS ve KMT üzerindeki nitrat ilavesinin etkisiyle ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3.9. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	KMT	KMS
Erken (4LL6KY)	Kontrol	3.55 ^a	72.77 ^a
	NaNO ₃	3.42 ^b	72.35 ^b
Orta (6LL4KY)	Kontrol	3.26 ^c	70.98 ^c
	NaNO ₃	3.18 ^d	70.48 ^d
Erken		3.41	71.88
Orta		3.30	71.44
Kontrol		3.41	71.88
NaNO ₃		3.30	71.44
O.S.H		0.644	1.181
LD		<0.001	<0.001
YKM		<0.001	<0.001
LD × YKM		0.001	<0.001

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Kertz (2010) ve Klop et al. (2016) nitrat ilavesinin KMS ve KMT’ni düşürdüğünü bildirmişler ve bu düşüşü rasyonda yer alan lifli maddelerin sindirim derecelerindeki düşüşle ilişkilendirmişlerdir. Nitekim Newbold et al. (2014), nitratın rumende indirgenme ürünü olan nitritin NDF sindirilebilirliğini düşürdüğünü ve buna bağlı olarak da KMT’nin düşme gösterdiğini bildirmiştir. Aynı şekilde, Leng (2008) adı araştırmacı da KMT’deki düşüşü rumendeki yüksek nitrit konsantrasyonları ile ilişkilendirmiştir.

Aksine, Li et al. (2012), koyunlarda %1.5 üre (kontrol) ve %3 kalsiyum nitrat (% 1.9 nitrat) içeren rasyonları karşılaştırdıkları çalışmalarında nitrat ilavesinin KMS’

ni etkilemediğini, KMT değerini ise artırdığını belirlemişlerdir. Diğer bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Lee and Beauchemin, 2014; Lund et al., 2014; Newbold et al., 2014; Nolan et al., 2010; Silivong et al., 2011). Bazı *in vivo* çalışmalarda ise nitrat ilavesinin KMT değerini etkilemediği, KMS değerini ise artırma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Guyader et al., 2015; Lee et al., 2015a; Newbold et al., 2014; Troy et al., 2015; van Zijderveld et al., 2011).

Bunun yanında, nitrat ilavesine bağlı olarak KMT değerinde düşme olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Hulshof et al., 2012; de Raphélis-Soissan et al., 2014; Lee et al., 2015a, b; Klop et al., 2016; Rebelo et al., 2019). Ayrıca, Rebelo et al. (2019), nitrat ilavesine bağlı olarak KMT değerinde ortaya çıkan düşmeyi organoleptik nedenlerle (lezzetlilik düzeyindeki düşme) ilişkilendirmiştir. Bir başka çalışmada ise (Nguyen et al., 2016), kuzu rasyonlarına ilave edilen nitratın KMT değerinde artışa, KMS değerinde ise azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, KMT'deki artışın NH₃-N ve ruminal fermantasyonda artışa yol açtığı bildirilmiştir.

3.6. Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları erken ve orta laktasyon dönemleri için hazırlanan ve tek kaba yem kaynağı olarak yüksek oranda HP içeren *Leucaena leucocephala*'nın kullanıldığı rasyonda besin maddeleri içeriğinin ve *in vitro* rumen parametrelerinin (GÜ, CH₄ üretimi, UYA vb.) nitrat ilavesi ile değiştiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, elde edilen sonuçlar söz konusu rasyona nitrat ilavesinin UYA, amonyak nitrojeni gibi ruminal fermantasyon parametreleri ile mikrobiyal popülasyonu olumsuz anlamda etkilemediğini enterik CH₄ emisyonunu azalttığını ortaya koymuştur.

4. *KHAYA SENEGALENSIS* TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT İLAVESİNİN METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

4.1. Giriş

Hayvancılık, tropikal ülkelerde insanların yeterli ve dengeli beslenmesi için gerekli olan hayvansal gıdaların temini yanında hayvan yetiştiricileri ve bitkisel üretimle uğraşan yetiştiriciler arasında sosyal ilişkileri güçlendirmek açısından önem taşımaktadır. Hayvan yetiştiricileri bitkisel üretimden elde edilen ürünleri kullanırken, aynı zamanda bitkisel üretimde olmazsa olmazlardan olan hayvan gübresini çiftçilerin kullanımına sunmaktadır. Afrika'da ve Dünya'da, hayvancılık sektöründe başarıyı sınırlandıran faktörlerden birisi belki de en önemlisi hayvanların yeterli ve dengeli bir şekilde beslenme imkânından mahrum olmalarıdır. Özellikle Afrika ve benzeri coğrafyalarda bu problem daha yoğun bir şekilde yaşanmakta olup yetiştiriciler hayvanları için gerekli olan yem kaynaklarına ulaşabilmek için uzun mesafeler kat etmek zorunda kalabilmektedirler.

Afrika'nın kırsal bölgelerinde hayvancılık faaliyetlerinde gerekli olan yemler büyük ölçüde doğal meralar, hasat artıkları ve hatta ağaç yaprakları ve çalılardan sağlanmaktadır. Ne yazık ki, özellikle kurak mevsimlerde doğal meralardan elde edilen otlar, bitkisel üretim sonucunda kalan artıklar ve ağaç-çalı yaprakları hayvanların besin maddeleri (proteinler, enerji, mineraller ve vitaminler) ihtiyacını karşılama noktasında yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, ruminant hayvanların rasyonlarında kullanılan bu tür kalitesiz yem kaynakları sindirim sisteminin en büyük kısmını oluşturan rumende gerçekleşen fermantatif faaliyetleri, çevresel kirliliğe yol açma potansiyeli olan CH₄ ve NH₃ üretimine yönlendirerek çevresel kirliliğe de yol açmaktadır. CH₄, CO₂'den 23 kez daha yüksek küresel ısınma potansiyeline sahip bir sera gazıdır (Moss et al., 2000).

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinden kaynaklanan toplam sera gazları üretiminin yaklaşık %39.1'lik kısmını oluşturan CH₄ (Gerber et al., 2013) aynı zamanda ruminant hayvanlarda yem kaynaklı enerjinin %2-12 arasında değişen oranlarda olmak üzere kaybına yol açmaktadır (Johnson ve Johnson, 1995). Afrika'nın birçok ülkesinde ruminant hayvanların beslenmesinde kullanılan kaba yem kaynaklarından birisi de *KS* ağacının yapraklarıdır. Gunun et al.. (2016) ve Min et al..

(2014), bu ağaç yapraklarının içerdikleri KT varlığına bağlı olarak rumendeki protozoa ve metanojenik bakteri popülasyonunda ve dolayısıyla CH₄ üretiminde önemli düzeyde düşmeye yol açtığını bildirmiştir. Ne yazık ki, KS yapraklarının CH₄ üretimi ve diğer rumen parametreleri üzerindeki etkisi ile ilgili yeterli düzeyde araştırma bulunmamaktadır. Rasyona nitrat ilavesinin metanogenezini azaltmaktadır (Iwamoto et al., 2001). KS yaprakları ve nitrat kullanımının metan üretimi ve rumen parametreleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi önemli olacaktır. Bu çalışmanın amacı, erken ve orta laktasyon dönemlerinde bulunan sağmal ineklerin rasyonlarında KS ağacı yaprakları ve nitrat kullanımının rumen UYA, protozoa popülasyonu, NH₃ konsantrasyonu ve CH₄ üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesidir.

4.2. Materyal

4.2.1. Yem materyali

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Hayvan Besleme Laboratuvarında yürütülen çalışmada, erken ve orta laktasyon döneminde bulunan süt sığırları için hazırlanan iki farklı rasyon kullanılmıştır. Rasyonda yer alan karma yem özel bir yem fabrikasından satın alınmıştır. Kullanılan karma yemin besin madde içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Erken laktasyon dönemi rasyonu %40 *Khaya senegalensis* + %60 Karma yem, orta laktasyon dönemi rasyonu ise %60 *Khaya senegalensis* + %40 Karma yem formülasyonuna göre hazırlanmıştır. Rasyonlarda N dengesinin sağlanması amacı ile nitrat içermeyen rasyonlara üre ilavesi yapılmıştır.

Gaz üretimi ölçümü için 250 mg rasyon numunesi hazırlanıp şırıngalara konulmuştur. Rumen parametreleri (pH, CH₄, NH₃ ve UYA) 24 saat inkübasyon süresi sonundan enjektörlerdeki sıvıda belirlenmiştir. Rasyonda kullanılan KS yaprakları, Batı Afrika'da bir ülke olan Benin'den getirilmiştir. Katkı maddesi olarak kullanılan nitrat tuzu (NaNO₃) piyasadan temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan rumen sıvısı Samsun'un Atakum ilçesinde faaliyet gösteren özel bir mezbahadan temin edilmiştir.

4.2.2. Rumen sıvısı temini

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısı, Samsun ili Atakum ilçesinde bulunan özel bir mezbahanedeki kesilen, rumen gelişimini tamamlamış 2 yaş ve 300 kg canlı ağırlığında olan Yerli Kara ırkı inekten alınan rumen sıvısı ve içeriği kullanılmıştır. Rumen içeriği süzgeçler yardımıyla süzülerek 38-40°C'deki termosada doldurulmuş ve

seri bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Rumen sıvısı alınan hayvanlar besi süresince sığır besi yemi ve fiğ kuru otundan oluşan rasyonla beslenmişlerdir.

Mezbahaneden alınan rumen sıvısında pH (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre), NH₃-N, UYA analizleri ve protozoa sayımı yapılmıştır. Rumen sıvısı toplam UYA içeriği Wiedmeier et al. (1987)'nin bildirdiği gibi gaz kromatografisi (Agilent Tech. 6890N GC, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df. Max. Sıcaklık: 260°C. Cat. 11023) ile Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü'nde iki tekerrürlü olarak belirlenmiştir.

Yaklaşık 5 ml rumen sıvısı içerisine dört damla sülfürik asit ilave edilerek soğuk zincir korunarak -20°C'de bekletilmiş ve 10000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş, her bir numuneden 2 ml örnek alınarak GC vialine aktarılmış ve okumalar yapılmıştır. Protozoa sayımı için 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (% 37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır.

Mevcut çalışmada kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvılarına benzerliğini ortaya koymak amacıyla rumen sıvısının pH, protozoa popülasyonu, amonyak azotu ve uçucu yağ asitleri (UYA) içerikleri yukarıdaki gibi belirlenmiştir. Böylece, denemede kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvısının özelliğine sahip olup-olmadığı kontrol edilmiştir.

Rumen sıvısının standart rumen sıvısı özellikleri taşıdığı yapılan pH (5.13-5.15), protozoa popülasyonu (11.41×10^4 /ml rumen sıvısı), uçucu yağ asitleri (TUYA: 106.60 ± 1.09 mmol/l; AA: 60.67 ± 0.56 mmol/l; PA: 22.22 ± 0.42 mmol/l; BA: 16.02 ± 0.09 mmol/l; izobütirik asit: 2.67 ± 0.02 mmol/l; izovalerik asit: 2.45 ± 0.01 mmol/l; valerik asit: 2.57 ± 0.02 mmol/l) ve amonyak azotu (5.37 ± 0.07 mg/dl) içerikleri analizleri sonrasında belirlenmiştir (Blümmel et al., 1997; Wiedmeier et al., 1987).

4.3. Yöntemler

4.3.1. Muameleler

Deneme 2 x 2 düzeninde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Nitrat ilaveli ve ilavesiz (Kontrol) erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarını oluşturan kaba/ kesif yem ham maddeleri ve oranları (%)

Rasyon	Ham maddeler	Erken laktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
		Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
Kaba yem	KS	40	40	60	60
Kesif yem	karma yem	60	60	40	40

Mevcut çalışmada, erken (%40 *Khaya senegalensis* / %60 Karma yem) ve orta (%60 *Khaya senegalensis* / %40 Karma yem) laktasyon dönemleri için iki farklı rasyon hazırlanmıştır. Rasyonlar hazırlandıktan sonra iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta nitrat (NaNO₃) kullanılmazken (üre kullanılmıştır), ikinci grupta başına %5 NaNO₃/kg KM (46.74 g NaNO₃/kg KM) kullanılmıştır. Rasyonların hazırlanması Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir. Muamele grupları ve kullanılan rasyonların kimyasal bileşimi Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Yem katkı maddelerin (Nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması



Şekil 4.2. Rasyonların muhafazası veya depolanması

Tablo 4.2. Muamele grupları ve rasyon içeriği (g/kg KM)

İçindekiler	Muameleler (g.kg ⁻¹ KM)			
	Erken aktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
	Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
<i>Khaya senegalensis</i>	400	400	600	600
Buğday kepeği	140.14	140.14	128	128
A.T.K. (%28)	-	-	62.08	62.08
D.D.G.S (Mısır)	78.6	78.6	48	48
A.T.K. (%36)	185.29	185.29	43.06	43.06
Mısır ekstrası	60	60	30.45	30.45
Kırık buğday (s-b)	42	42	28	28
A.T.K. elekalıtı	18	24	16	16
Melas	23.4	23.4	15.6	15.6
Mısır	13.2	13.2	-	-
Susam elekalıtı	9	9	8	8
Susam kepeği (tuzsu)	9	9	8	8
Potasyum	1.06	1.06	0.41	0.41
Metiyonin	0.43	0.43	1.03	1.03
Lizin	0.74	0.74	0.37	0.37
Sodyum nitrat	-	45.67	-	46.74
Üre	16.35	0	16.73	-
Kalsiyum	1.04	1.04	1.01	1.01
Fosfor	0.80	0.80	0.83	0.83
Şeker	5.6	5.6	5.02	5.02
Nişasta	17	17	16.03	16.03
Korunmuş nişasta	7.09	7.09	8.05	8.05
UFL	83.54	83.54	81.02	81.02
UFV	79	79	76.12	76.12
PDIN (g/kg KM)	147.35	147.35	132.72	132.72
PDIE (g/kg KM)	120.96	120.96	101.25	101.25
ME (kcal. kg ⁻¹ KM)	2550	2550	2500	2500

Vitamin büyükbaş A⁺ (0.6; 0.4 g/kg KM), mermer tozu (12; 8 g/kg KM), tuz (3; 2 g/kg KM), Niacin 200 (0.6; 0.4 g/kg KM), Novatan (0.6; 0 g/kg KM), Magnezyum oksit (0.6; 0.4 g/kg KM), Maya (0.6; 0.4 g/kg KM).

4.3.2. Rasyonların besin maddeleri içeriklerinin belirlenmesi

Khaya senegalensis yaprakları 55°C'de 48 saat boyunca etüvde kurutulduktan sonra 1 mm incelikte öğütülmüştür. Kimyasal kompozisyonu belirlenen *Khaya senegalensis* yaprakları karma yem ile karıştırılarak rasyon elde edilmiştir. Daha önce açıklandığı gibi dört farklı rasyon elde edilmiştir. Rasyonların KM (AOAC

Uluslararası 2000; yöntem 985.26), HP (AOAC Uluslararası 2000; yöntem 990.03) ve HK (AOAC Uluslararası 2000; yöntem 942.05) analizleri yapılmıştır. ADF (AOAC, 2000; yöntem 7.074), NDF (AOAC, 2000; yöntem 2002.04), HS (AOAC,2000; yöntem 992.09) analizleri ise Van Soest et al. (1991) tarafından bildirildiği gibi ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

HY içeriği (AOAC, 2000; yöntem 2003.05) ANKOM XT15 (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Kutlu, 2008). OM, selüloz (SEL= NDF-(HSEL+ADL)), hemiselüloz (HSEL= NDF-ADF) ve lif olmayan karbonhidrat (LOK= 100-(HP+HK+ADF+HY)), NÖM (NÖM= OM-(HY+HP+HS)) içerikleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir).

4.3.3. Yemlerin *in vitro* gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi

Yemlerin *in vitro* gerçek sindirilebilirliği (İVGS) rumen gelişimini tamamlamış ve yukarıda tanımlanmış olan rumen içeriği (3.2.2. Rumen sıvısı temini) kullanılarak Ankom Daisy II inkübatör D220 ile belirlenmiştir. Rumen sıvısı mezbahanedede hayvanlar kesilir kesilmez alınmış, taşınabilir karbondioksit tüpü ile beslenen 2 litrelik 39°C'de ısıtılmış bir erlen içine iki kat tülbentten, peynir süzgeci ile süzölmüş ve içerisine 2 avuç rumen katı içeriği ilave edilmiştir. Rumen sıvısı sıcaklığı muhafaza edilerek laboratuvara (içerisinde 39°C su bulunan iki adet termos içinde) taşınmıştır. Daisy inkübatörde 50 mm × 55 mm ebatlarında, polyester/polietilen karışımından yapılmış ve 25 µm den büyük partiküllerin geçemeyeceği porlardan oluşmuş azot içermeyen özel torbalar (Ankom F₅₇ torba) kullanılmıştır.

Her bir torbaya 1 mm' lik elekten geçirilmiş yem örneği tartılmış ve bütün rasyonlar 3 paralelli olarak test edilmiştir. Çalışmada kullanılan inkübatör 4 (3 kavanozda tampon çözeltisi, 1 kavanozda saf su bulunmaktadır) kavanozdan oluşmaktadır. Her 3 kavanoza 2 lt'lik inkübasyon sıvısı (1600 ml tampon solusyonu + 400 ml rumen sıvısı) CO₂ tüpü eşliğinde ilave edilmiştir (Şekil 3.5'te açıklanmıştır). Torbalar inkübatöre CO₂ tüpü eşliğinde atılmış ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolunca kavanozlardan çıkartılıp su ile temizlendikten sonra 5 dakika boyunca asetonda bekletilen torbalar havada kurutulduktan sonra 105°C'deki etüvde 3 saat tutulmuştur. Etüvden çıkartılan torbalar tartıldıktan sonra besin maddeleri analizleri AOAC (2000) de belirtilen yöntemlere göre yapılmış, kuru madde

bazında İVGS'leri süzgeç torba tekniği (Van Soest et al., 1991) kullanılarak Ankom Daisy inkübatör'de (Ankom, 2002) belirlenmiştir.

Kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

A çözeltisi: 2 litrelik balon içerisinde 20 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g NaCl , 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1 g üre saf su ile çözündürülmüştür.

B çözeltisi: 1 litrelik balon içerisinde 15 g Na_2CO_3 ve 1 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ saf su ile çözündürülmüştür.

Tampon çözeltilerin hazırlanması (Her bir silindir için): A ve B çözeltileri 39°C 'ye kadar ısıtılmış; ayrı kaplarda bulunan B çözeltisinden 266 ml, 1330 ml A çözeltisi üzerine ilave edilmiştir.

A ve B çözeltilerin hazırlanması aşamasında çözelti pH'larının 39°C 'de 6.8 civarında olmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan yaklaşık 1600 ml çözelti (A + B çözeltileri) bir silindire ayrı ayrı koyulmuştur. Silindirler cihaza yerleştirilerek, ısıtma ile agitasyon düğmeleri aktif hale getirilmiş ve 20-30 dakika süresince tüm silindirlerin sıcaklığının eşit olması beklenmiştir. Bu bekleme süresinde rumen sıvısının toplanması ve rumen inokulumun hazırlanması sağlanmıştır.

Torbaların ve numunelerin hazırlanması: Çalışmada kullanılan F_{57} filtre torbalarının daraları alındıktan (W_1) sonra 0.5 g numune (W_2) torbaya konulmuş ve torbaların ağzı sıcak mühürleme yardımıyla kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan torbalar kavanozlara eşit oranda olacak şekilde yerleştirilmiştir Her bir kavanoza bir adet boş F_{57} torbası (C_1 'in belirlenmesi amacı ile) yerleştirildi. Daisy II inkübatöründe 48 saat bekletilen F_{57} torbaları kavanozlardan çıkarılıp yıkandıktan sonra 3-5 dakika aseton içinde bekletilmiştir ve daha sonra tamamen havada kuru hale getirilmiştir.

İnokulum ve İnkübasyonun Hazırlanması: Hazırlanan rumen inokulumundan 400 ml alınarak inkübatör kavanozlarına konulmuştur. . Kavanozların her birine 30 saniye CO_2 gazı ilave edilip balon oluşumuna müsaade edilmeden kapağı kapatılmıştır. Cihaz iç sıcaklığı 48 saatlik inkübasyon süresince $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuş ve elektrik kesilmesine karşı cihaza güç kaynağı bağlanmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında çıkartılan F_{57} torbalarında NDF, ADF analizleri yapılmıştır. NDF analizinden sonra çıkan değer W_3 olarak kaydedilmiştir.

In vitro gerçek besin madde sindirilebilirliği (İVGS) aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$\%iVGS = 100 - \left[\frac{(W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100}{W_2} \right]$$

W₁: F₅₇ torbalarının darası

W₂: Kuru örnekteki NDF miktarı

W₃: İnkübasyon sonunda torbada kalan atıktaki NDF miktarı

C₁: Kör ağırlığı (inkübasyondan çıkartılıp etüvde kurutulduktan sonraki boş torba ağırlığı/orijinal torba ağırlığı)

4.3.4. *In vitro* gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması

Toplam gaz üretiminin ölçülmesinde *in vitro* gaz üretim tekniği (Hohenheim) aşağıdaki detaylandırıldığı şekilde uygulanmıştır (Menke and Steingass, 1988). Yem örneği 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş, yaklaşık 250 mg havada kuru yem maddesi (200 mg KM) tartılarak enjektörün dibine yerleştirilmiş ve enjektörün pistonları gaz kaçışını engellemek amacıyla ilk 2-3 cm'lik kısmı hariç vazelinle yağlanmıştır. Örnek miktarının sınırlı tutulması toplam gaz üretiminin 90 ml'yi aşmayacak şekilde ayarlanmak istenmesiyle ilgili olup gaz üretiminin 90 ml'yi aştığı durumlarda ise biriken gaz (sıvı kısım hariç) dışarı atılmıştır ve bu değer hesaplamalarda dikkate alınmıştır (Şekil 3.6.'da gösterilmiştir).

Çalışmamızda kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Mikro mineral çözeltisi: 13.2 g CaCl₂.2H₂O, 10.0 g MnCl₂.4H₂O, 1.0 g CoCl₂.6H₂O ve 8.0 g FeCl₃.6H₂O 100 ml saf suya tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisi: 4.0 g NH₄HCO₃ ve 35.0 g NaHCO₃ 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 8.1'e ayarlanmıştır.

Makro mineral çözeltisi: 5.7 g Na₂HPO₄ susuz, 6.2 g KH₂PO₄ susuz ve 0.6 g MgSO₄.7H₂O 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 6.8'e ayarlanmıştır.

Resazurin çözeltisi: 100 mg resazurin saf suda çözündürülerek, 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

İndirgeme çözeltisi: 1 Normal 4 ml NaOH, 625 mg Na₂S.9H₂O ve 95 ml saf su katılarak, her zaman taze olarak hazırlanmıştır.

Rumen sıvısı alınmadan hemen önce hazırlanan vasat (400 ml saf suya 0.1 ml mikromineral çözeltisi, 200 ml rumen tampon çözeltisi, 200 ml makromineral çözeltisi, 1.0 ml resazurin çözeltisi ve 40 ml indirgeme çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır) CO₂ gazı altında 39°C' deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak tutulmuş, rumen sıvısı eklenmeden önce sıcaklığın 39°C olup, olmadığı

kontrol edilerek, ortamın renginin maviden pembeye ve şeffafa dönüp dönmediği gözlenmiştir (Renk değişimi ortamın indirgenmiş olduğunu göstermektedir).

Yemlemeden hemen önce alınan rumen sıvısı CO₂ ile beslenen 39°C’ de ısıtılmış 2 litrelik bir erlen içine iki kat tülbenkten süzülmüştür. Manyetik bir karıştırıcı üzerine oturtularak bir su banyosunda (39°C) tutulan bir şişede bir kısım rumen sıvısı iki kısım vasat ile karıştırılarak, sıvı içine bir tüp ile sürekli olarak karbondioksit gazı verilmiştir. Rumen sıvısı+vasat karışımından 30 ml bir otomatik pipet (dispenser) yardımıyla her biri daha evvel 39°C’de etüvde tutulmuş olan enjektörlere çekilmiştir. Enjektör içindeki gaz kabarcıkları ortamdaki uzaklaştırılarak, silikon boru üzerindeki plastik kısıkaçlar kapatılmış ve daha sonra enjektör içine alınan karışım miktarı (yaklaşık 30 ml) okunarak kaydedilmiştir.

Bütün enjektörlerin doldurulma işlemi yarım saati geçmeyecek şekilde tamamlanmış ve 39°C’ye ayarlı özel su banyosundaki enjektör desteklerine yerleştirilmiştir. İnkübasyonlar süresince okumalar 3, 6, 9, 12, 24, ve 48. saatlerde sıcaklık değişikliklerinin önüne geçebilmek amacı ile mümkün olduğu kadar hızlı yapılmıştır. Her okumadan sonra enjektörler enjektörün yan yüzeylerine yapışmış yem örneğinin tekrar rumen sıvısı içine alınması amacıyla hafifçe dört kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Gaz üretim (GÜ) miktarları aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{GÜ (ml/200mg KM, 24 saat)} = \frac{\frac{F_k + F_c}{2} (V_{24} - V_0 - GÜ_0) \times 200 \times \left(\frac{F_k + F_c}{2}\right)}{\text{ÖA}}$$

V₀: İnkübasyon başlangıcında pistonun pozisyonu

V₂₄: 24 saatlik inkübasyondan sonra pistonun pozisyonu

GÜ₀: Örnek içermeyen rumen sıvısının 24 saatlik inkübasyonda ürettiği ortalama gaz miktarı.

ÖA: Enjektöre konulan örneğin ağırlığı (mg KM)

Gaz üretim parametreleri, NEWAY adlı PC paket program yardımıyla Ørskov and McDonald (1979)’ın bildirdiği aşağıdaki modele göre hesaplanmıştır.

$$Y = a + b(1 - e^{-ct})$$

- a: Hemen çözünebilir fraksiyondan oluşan gaz miktarı (ml)
b: Zamana bağlı oluşan gaz miktarı (ml)
c: Gaz üretim hızı
a+b: Potansiyel gaz üretimi (ml)
t: İnkübasyon süresi (saat)
y: t zamandaki gaz üretimi

Gaz üretimi sonucu elde edilen 24 saatlik gaz ölçüm değerleri ve örneklerin besin madde içerikleri kullanılarak örneğin metabolize edebilir enerji (ME) miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke et al., 1979).

$$\text{ME(MJ/kg KM)} = 1.06 + 0.1578\text{GÜ} + 0.084\text{HP} + 0.22\text{HY} + 0.081\text{HK}$$

GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/200 mg KM)

%İVOMS, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke and Steingass, 1988).

$$\%İVOMS = 0.45\text{HP} + 0.651\text{HK} + 14.88 + 0.889\text{GÜ}$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%)

Net Enerji Laktasyon (NE_L) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Schöner, 1981).

$$\text{NE}_L \text{ (MJ/kg KM)} = 0.075\text{GÜ} + 0.087\text{HP} + 0.161\text{HY} + 0.056\text{NÖM} - 2.422$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%), HY: Ham yağ (%), NÖM: Azotsuz öz madde.

SOM aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke and Steingass, 1988).

$$\text{SOM(g/kg KM)} = 0.9991\text{GÜ} + 0.595\text{HP} + 0.181\text{HK} + 9$$

MPS aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (AFRC, 1993).

$$\text{MPS(mg/ml)} = \text{SOM} \times 0.032$$

KZYA aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Makkar, 2005).

$$\text{KZYA(mmol/l)} = 0.022\text{GÜ} - 0.00425$$

4.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesi

Denemede kullanılacak rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesinde infrared metan analizörü (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany model) kullanılmıştır (Goel

et al., 2008). CH₄ miktarının belirlenmesi, *in vitro* gaz üretiminde 24 saatlik inkübasyon sonrasında yapılmış olup, 24 saat sonra enjektörlerde biriken gaz özel bir boru vasıtasıyla (plastik enjektörler kullanılarak) metan analizörüne alınmış ve CH₄ üretimi (ml) toplam gazın yüzdesi olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7.'de gösterilmiştir).

$$\text{CH}_4 \text{ üretimi (ml)} = \text{Toplam gaz üretimi (ml)} \times \% \text{CH}_4$$

4.3.6. Rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılacak rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi amacı ile 48 saat *in vitro* gaz üretiminden sonra enjektörlerden alınan 5 ml rumen sıvısında ham protein analizinde olduğu gibi bir damıtma işlemi uygulanmıştır Daha sonra gerçekleştirilen titrasyon işleminde harcanan HCl (0.1) hacmi not belirlenerek alta verilen formülle NH₃ miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.8.'de gösterilmiştir).

$$\text{NH}_3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \text{ rumen sıvısı} \right) = 0.1 \times 14 \times 1.22(A - B) \times 20$$

A: Örnek için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

B: Şahit için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

0.1: HCl titrasyon çözeltisinin normalitesi

14: Azotun mol ağırlığı

4.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısında UYA içeriğinin belirlenmesi amacı ile inkübasyon öncesinde 2 adet wheaton şişesine 5 ml rumen sıvısı alınmış ve 4 damla H₂SO₄ ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan rumen sıvıları analizler yapılincaya kadar oda ısısında muhafazaya devam edilmiştir. 48. saatteki alınan rumen sıvısı da aynı işleme tabi tutulmuştur. Denemede kullanılan rumen sıvısının pH'ı laboratuvara getirilir getirilmez dijital pH metre (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre) ile belirlenmiştir. Rumen sıvısı UYA Wiedmeier et al. (1987)'nin bildirdikleri yöntem göre Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı laboratuvarlarında analiz edilmiştir.

Rumen sıvısı uçucu yağ asitleri (asetik, bütirik, propiyonik, valerik, izovalerik ve izobütirik asit) analizi için rumen sıvısı 3000 devir/dakika santrifüj edilmiş ve üstte biriken kısımdan 10 ml alınmış ve üzerine 1.0 ml %25'lik fosforik asit ilave edilmiştir. Daha sonra gaz kromatografî cihazında okunması için 14000 devir/dakika santrifüj

edilmiş ve örnekten 1.5 ml alınarak Agilent 6890N marka Gaz Kromatografi cihazına enjekte edilerek (Agilent Technologies 6890N gaz kromatografisi, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um df. Max. temp: 260°C. Cat. 11023) rumen sıvısı UYA içeriği saptanmıştır.

4.3.8. Protozoa sayımın belirlenmesi

Çalışmamızda, protozoa sayımı için 48 saatlik inkübasyon sonucunda enjektörden alınan 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (% 37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Hazırlanan bu karışım analiz zamanına kadar -20 C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler (Şekil 3.8 ve 3.9) Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır. Hesaplama altta verilen formülle yapılmıştır.

$$\text{cm}^3 \text{ (ml)'deki hücre sayısı} = 1000 \times \frac{\text{Sayılan hücre sayısı}}{\text{Sayılan toplam kare} \times \text{Sulandırma} \times \text{Hacim}}$$

4.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği

Rasyonların sindirilebilirliklerin belirlenmesinde kuru madde tüketimi ve kuru madde hesaplanmıştır.

$$\text{KMT}(\%CA) = \frac{120}{\%NDF}$$

KMT: Kuru madde tüketimi (%CA)

$$\text{KMS} = 88.9 - (0.779 \times \%ADF)$$

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği

4.4. İstatistiksel analiz

Araştırma sonucunda elde edilen veriler (besin maddeleri içeriği, *in vitro* gaz üretimi, *in vitro* sindirilebilirlik, vb.) gerekli varsayımlar (normallik ve varyansların homojenliği gibi) kontrol edildikten sonra 2 x 2 tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme tertibine göre istatistik analize tabi tutulmuştur. Denemenin matematik modeli.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

olup, eşitlikte;

Y_{ijk} : i.inci uygulamaya tabi tutulan j.inci rasyon çeşidindeki k.inci örneğe ait gözlem değerini (gaz üretimi, vb).

μ : populasyon ortalamasını,

α_i : i.inci rasyonun etkisi

β_j : j.inci katkı maddesinin etkisi

$(\alpha\beta)_{ij}$: i.inci rasyon ile j.inci katkı maddesi çeşidinin interaksyonu

e_{ijk} : Tesadüfi hatayı göstermektedir

Uygulamalar veya yem çeşitleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olması durumunda ortalamalarının karşılaştırılması için Duncan Çoklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisanslı SPSS 22.0 istatistiksel paket programından faydalanılmıştır.

4.5. Sonuçlar ve tartışma

4.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği

Tablo 4.3.'te erken ve orta laktasyon dönemleri için hazırlanan rasyonun besin maddeleri içerikleri verilmiştir. Rasyonun kimyasal kompozisyonlarında, izonitrojenik hazırlanmaları gerektiğinden dolayı nitrat ilaveli karmalarda kontrol (ürel) karmalara göre farklılıklar meydana gelmiştir. Karmaların kimyasal kompozisyonu, yem ham maddelerinin literatürde (NRC, 2001; Sun et al., 2017; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016) bildirilen kimyasal kompozisyonları esas alınarak dengelenmiştir.

Burada rapor edildiği gibi, NRC (2001), laktasyondaki süt sığırları için hazırlanan erken laktasyon rasyonların ADF ve NDF olarak tanımlanan lif içeriklerinin orta laktasyondaki karmalara oranla daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Mevcut çalışmadaki ADL ve HSEL sonuçları NRC (2001) önerileri ve Herrick et al. (2012)'in çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur. Her iki döneme ait rasyonların analiz ile bulunan kimyasal kompozisyonları, literatürde bildirilen (Balgees et al., 2015; Callaghan et al., 2014; Ntiranyibagira et al., 2015; Sharifi et al., 2018) sınırlar içerisindedir.

Tablo 4.3. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için hazırlanan rasyonların besin maddeleri içerikleri

Besin maddesi	Erken laktasyon dönemi		Orta laktasyon dönemi	
	Kontrol	NaNO ₃	Kontrol	NaNO ₃
HK	8.90	8.85	8.94	9.60
NDF	36.36	35.80	37.50	36.50
ADF	24.97	23.96	24.77	24.33
HY	2.98	3.36	3.15	3.45
HP	22.85	22.66	20.40	20.05
HS	22.48	21.10	23.36	24.60
ADL	12.69	11.33	11.85	11.15
Hemiselüloz	11.39	11.84	12.73	12.17
Selüloz	12.28	12.63	12.92	13.18
OM	85.74	83.29	85.06	85.63
NÖM	37.43	36.17	38.15	37.88
LOK	40.30	41.33	42.74	42.57
Kondanse tanen (g/kg KM)	6.63	6.63	9.96	9.96

Mevcut çalışmada erken ve orta laktasyonlar için hazırlanan rasyonun kimyasal kompozisyonlarındaki farklılığın kaba yem/kesif yem oranındaki farklılıktan (Brito et al., 2006; Spanghero and Zanfi, 2009) kaynaklandığı söylenebilir. Yaygın adıyla Afrika maunu olarak bilinen *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. bir ağaç türü olup yaprakları hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Meuret et al., 1990; Njidda, 2010; Papachristou and Nastis, 1996). Bu türe ait yaprakların besin maddeleri içeriği, baklagil familyalarına ait yem bitkilerinden ve ağaç türlerinden daha düşüktür.

Buna karşın tanen (Tolera et al., 1997) ve bazı polifenolik (kateşin, rutin ve quercetin rhamnoside) bileşikler (Atawodi et al., 2009; Ibrahim et al., 2014) ile KM'de %30'dan daha fazla olan lif (Bonsi et al., 1991; Kubkomawa et al., 2017) içermesine rağmen, özellikle HP içeriği (%14.11-16) bakımından buğdaygil yem bitkilerinden nispeten daha iyi durumdadır (Njidda, 2010). Dolayısıyla, tropik bölgelerde geviş getiren hayvanların verimliliğini artırmak için düşük kaliteli kaba yemlere ilaveten kullanılabileceği belirtilmiştir (Gemeda and Hassen 2015; Makkar and Becker, 1998; Mokoboki et al., 2019; Rittner and Reed, 1992).

4.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının *in vitro* gaz üretimi (İVGÜ) üzerindeki etkileri

Bazı çalışmalarda, birçok yem ağacının ve çalılarının HP ve sekonder metabolit içeriklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Kaensombath and Frankow-Lindberg, 2012; Rop et al., 2009; Salem et al., 2006; Scandellari et al., 2010). Bununla birlikte, bu yem kaynaklarının yapılarında sindirilebilirlik ve yararlanabilirlik düzeylerini azaltan tanenler ve diğer ikincil metabolitler yüksek miktarlarda bulunabilmektedir (Rubanza et al., 2007; Tolera et al., 1997). Bu nedenle, bu tür yem kaynaklarının kullanılması durumunda tanen ve diğer ikincil metabolitlerin olumsuz etkilerinin giderilmesi amacı ile bazı tedbirler alınmalıdır.

Bu konuda bir yaklaşım olarak ruminal mikrobiyel protein sentezinin artırılması amacı ile bu yem kaynaklarının kullanıldığı rasyonların farklı azot kaynakları ile (üre ve nitrat gibi) kullanılması düşünülmüştür. Bazı çalışmalarda üre gibi yem katkı maddelerinin ilavesinin bu yem kaynaklarında bulunan ikincil metabolitlerin etkisini azalttığı belirlenmiştir (Makkar, 2003; Salem et al., 2013). Bazı araştırmalarda da üre ve nitrat gibi N'ca zengin kaynakların karbonhidrat fermantasyonunu artırabileceği bulunmuştur (Molina-Alcaide and Aguilera, 1996).

Mevcut çalışmada, erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırı karmalarına üre ve nitrat ilavesinin *in vitro* gaz üretimini (İVGÜ) önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Tablo 4.4.). Kırk sekiz saatlik fermantasyonun sonunda, İVGÜ (erken ve orta laktasyonlarda) üre ilaveli rasyon tüketen gruplarda (kontrol) yüksek bulunmuştur. Ancak, en yüksek İVGÜ değerleri üre ilaveli erken laktasyon rasyonları için belirlenmiştir. Mevcut çalışmanın İVGÜ ile ilgili sonuçları, genelde erken laktasyon dönemi karmaların ve nitrat ilaveli erken ve orta dönem rasyonların daha düşük İVGÜ'ne sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, en düşük İVGÜ değerleri orta laktasyon dönemi rasyonları ve nitrat ilaveli orta laktasyon dönemi rasyonları için bulunmuştur.

Tablo 4.4. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının *in vitro* gaz üretimi üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Erken (4KS6KYF)	Kontrol	12.32 ^b	19.45 ^a	25.54 ^a	31.50 ^b	42.15 ^a	54.53 ^a
	NaNO ₃	11.83 ^c	17.64 ^c	23.24 ^c	28.91 ^c	39.35 ^c	43.03 ^c
Orta (6KS4SY)	Kontrol	12.47 ^a	18.19 ^b	24.61 ^b	31.67 ^a	41.98 ^b	45.23 ^b
	NaNO ₃	10.06 ^d	14.23 ^d	21.29 ^d	23.30 ^d	28.17 ^d	41.83 ^d
Laktasyon dönemi (LD)							
Erken		12.08	18.55	24.39	30.21	40.75	48.78
Orta		11.27	16.21	22.95	27.49	35.08	43.53
Yem katkı maddesi (YKM)							
Kontrol		12.40	18.82	25.08	31.59	42.07	49.88
NaNO ₃		10.95	15.94	22.27	26.10	33.76	42.43
O.S.H.		0.321	0.557	0.500	1.022	1.833	1.514
Ana etkiler							
LD		0.003	<0.001	0.001	0.041	0.037	0.012
YKM		0.019	<0.001	0.006	0.031	0.042	0.042
LD × YKM		0.001	0.004	0.016	0.001	0.005	0.001

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Bu çalışmada, laktasyon dönemi × yem katkı maddesi interaksiyonunun farklı inkübasyon sürelerindeki İVGÜ üzerindeki etkisi önemli bulunmuştur (Tablo 4.4.). Her 2 laktasyon döneminde üreli (kontrol) rasyonların kullanılması durumunda İVGÜ'nin nitrat ilaveli rasyona göre yüksek bulunduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Erken laktasyon döneminde, İVGÜ orta laktasyon dönemine göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Daha önce, Getachew et al. (1998) *in vitro* fermantasyonda üretilen gazın yem fermantasyonu ve sindirilebilirliğinin artması ile açıklamıştır. Bazı çalışmalarda, konsantre yemlerin kaba yemlere göre daha yüksek İVGÜ değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2018). Aynı araştırmacılar konsantre yemin sindirilebilirliğinin kaba yem sindirilebilirliğine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Mevcut çalışmada %60 oranında konsantre yem içeren erken dönem rasyonda İVGÜ yüksek bulunmuştur. Erken laktasyon döneminde kullanılan rasyon için belirlenen İVGÜ değerinin yüksek olması bu dönemde kullanılan rasyonda HP içeriğinin yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Benzer bulgular Maccarana et al.

(2013) ve Tagliapietra et al. (2015) tarafından da bildirilmiştir. Rasyonda düşük düzeyde HP bulunması durumunda parçalanabilirliğin düştüğü bilinmektedir. Ancak, HP içeriği yüksek yemlerin parçalanabilirlikleri yüksek olsa bile düşük düzeyde gaz üretebilirler, çünkü protein fermantasyonu sonucunda amonyak üretimi söz konusudur. Protein fermantasyonu sonucunda üretilen amonyak esansiyel yağ asitlerinden kaynaklanan hidrojen iyonlarını nötralize ederek CO₂ açığa çıkarmadan karbonat tampon dengesini etkiler. Bu mekanizma neticesinde de gaz üretimi artmamış olur. Getachew et al. (2004), yemlerin HP içeriği ile 24 ve 48 saatlerdeki İVGÜ arasında negatif bir korelasyon olduğunu bildirmiştir.

Mevcut çalışmada, erken laktasyonda ve orta laktasyonda üre ilaveli rasyonların İVGÜ değerlerinin nitrat ilaveli rasyonlara göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu bulgu üre ilavesine bağlı olarak İVGÜ'nin artış gösterdiğini bildiren Adejoro et al. (2020) ve Mazinani et al. (2018) adlı araştırmacıların bulguları ile uyum içerisindedir. Bu bulgu, aynı zamanda üre ilaveli (kontrol) rasyonların ruminal fermantasyonu artırıcı etkisi ile açıklanabilir (Van Soest, 1994). Çalışmamızda kullanılan kaba yem kaynağının (*Khaya senegalensis* yaprakları) lifli maddeler içeriği içeriği yüksektir. Bazı araştırmacılar lifli maddelerce zengin olan yem kaynaklarının (Çalı ve ağaç yaprakları gibi) İVGÜ üretimini artırdığını bildirmişlerdir (Adejoro et al., 2019; Akanmu ve Hassen, 2018; Basha et al., 2013; Dentinho et al., 2018; Giridhar et al., 2018).

Bazı çalışmalarda, rasyonda ürenin çözünebilirliği ve parçalanabilirliği yüksek proteinlerin yerine kullanılması durumunda lifli maddelerin sindiriminde düşme olduğu (Lee et al., 1987; Robinson et al., 1998), diğer bazı çalışmalarda ise üre kullanımının bu konuda herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Köster et al., 2002). Çalışmamızda, üre (kontrol) kullanımına bağlı olarak İVGÜ'de ortaya çıkan artış rasyonda lifli maddeler içeriği yüksek olan kaba yem kaynağının (*Khaya senegalensis*) kullanılması ile ilişkili olabilir. Mevcut çalışmada, nitrat kullanımına bağlı olarak İVGÜ'de düşme olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu bazı çalışmalar da bulunan bulgularla benzerlik göstermektedir (Adejoro et al., 2020; Patra and Yu, 2014; Shi et al., 2012; Zhou et al., 2012). Ayrıca, nitrat kullanımına bağlı olarak İVGÜ'de ortaya çıkan düşme çalışmamızda kullanılan kaba yem kaynaklarında bulunan ikincil metabolitler ile nitrat arasındaki etkileşime (Kaensombath and Frankow-Lindberg, 2012; Rop et al., 2009; Salem et al., 2006; Scandellari et al., 2010) bağlanabilir.

Bazı araştırmacılara göre düşük İVG'in değerleri rasyonun kondanse tanen, HP ve lif maddelerin içeriklerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Gemedda and Hassen, 2015; Giridhar et al., 2018; Hatew et al., 2016; Huyen et al., 2016; Kamalak et al., 2005; Singh et al., 2015). Diğer bazı çalışmalarda, ağaç ve çalı yapraklarında bulunan bir fenolik bileşiğin (saponinler, tanen) gaz üretimini azalttığı bildirilmiştir (Jayanegara et al., 2011; Theart, 2015). Sharifi et al. (2018) artan kaba yem seviyelerinin ve nitrat kullanımının İVG'i azalttığını bildirmiştir. Mevcut çalışmada, nitrat ilavesi ile (erken laktasyon ve orta laktasyon) saptanan düşük İVG değerleri Lee et al. (2017) alışmalarında bulunan değerler ile uyumludur.

4.5.3. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlarının İVG parametreleri (c ve a+b), CH₄ retimi, *in vitro* organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolize edilebilir enerji (ME), ve net enerji laktasyon (NEL) değerleri.

Çalışmamızda elde edilen İVG parametreleri (c, a+b), CH₄ retimleri, İVOMS, SOM, ME ve NEL içerikleri Tablo 4.5.'te verilmiştir. Laktasyon dönemi (p<0.05) ve yem katkı maddesi (p<0.05) incelenen tüm parametreler için önemli olduğu belirlenmiştir. Gaz retimi hızını ifade eden "c" parametresi bakımından en yüksek değer erken laktasyon döneminde üre ilaveli (kontrol) rasyon (0.12 ml/saat), en düşük değer ise orta laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyon (0.06 ml/saat) için belirlenmiştir.

Yüksek gaz üretim oranları hayvanlarda şişkinlik (şişme) sorunlarına neden olabilir. Mevcut çalışmada laktasyon dönemi (p<0.001) ve yem katkı maddesi (p<0.001) c değerini etkilemiştir. Öte yandan, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksiyonunun c değerini etkilediği görülmektedir (p=0.020). Bu çalışmada bulunan c değerleri bazı çalışmalarla (Adejoro et al., 2019; Sharifi et al., 2018) uyumlu bulunmuştur.

Toplam gaz üretim miktarı "a+b" parametresi bakımından en yüksek değer erken laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyon için (53.77 ml) bulunmuştur (p=0.034). En düşük a+b değeri ise erken laktasyon döneminde üre ilaveli (kontrol) rasyon (45.24 ml, p=0.030) ve orta laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyon (45.35 ml) için belirlenmiştir (p=0.030). Bazı çalışmalarda, nitrat ilavesine bağlı olarak a+b parametresinde artış olduğu (Alemu et al., 2019; Sharifi et al., 2018) diğer bazı

çalışmalarda ise üre ilaveli rasyonlarında “a+b” parametresinin düştüğü bulunmuştur (Adejoro and Hassen, 2019). Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonun “a+b” değerine etkisi önemli bulunmuştur (p=0.007).

Tablo 4.5. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının İVGÜ parametreleri (c ve a+b) , metan üretimi, *in vitro* organik madde sindirilebilirliği (İVOMS), sindirilebilir organik madde (SOM), metabolize edilebilir (ME) ve net enerji laktasyon (NE_L) değerleri.

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	c	a+b	CH ₄	ME	NE _L	SOM	İVOMS
Erken (4KS6KY)	Kontrol	0.12 ^a	45.24 ^c	7.99 ^a	9.54 ^a	5.25 ^a	66.12 ^a	68.26 ^a
	NaNO ₃	0.07 ^b	53.77 ^a	6.90 ^c	9.52 ^a	5.22 ^a	65.58 ^b	67.81 ^b
Orta (6KS4KY)	Kontrol	0.07 ^b	46.57 ^b	7.85 ^b	8.72 ^b	4.92 ^b	63.49 ^c	65.88 ^c
	NaNO ₃	0.06 ^c	45.35 ^c	5.76 ^d	6.99 ^c	4.27 ^c	50.27 ^d	53.82 ^d
Erken		0.09	49.50	7.45	9.53	5.24	65.85	68.04
Orta		0.06	45.96	6.81	7.86	4.60	56.88	59.85
Kontrol		0.09	45.90	7.92	9.13	5.07	64.81	67.07
NaNO ₃		0.06	49.56	6.33	8.25	4.75	57.92	60.81
O.S.H		0.007	1.126	0.353	0.316	0.129	1.991	1.803
LD		<0.001	0.034	0.014	0.044	0.008	0.022	0.019
YKM		<0.001	0.030	0.020	0.039	0.007	0.014	0.013
LD × YKM		0.020	0.007	0.007	0.001	0.004	0.003	0.002

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

c (ml/saat), a+b (ml), CH₄ (ml), ME (MJ/kg KM), NE_L (MJ/kg KM), SOM (g/Kg KM), İVOMS (%)

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Mevcut çalışmada, CH₄ üretimi bakımından en yüksek değerleri üre ilaveli (kontrol) rasyonlar gösterirken en düşük değerler nitrat ilaveli rasyon için bulunmuştur (p=0.020). Erken laktasyon döneminde (7.45 ml) CH₄ üretimi orta laktasyon dönemine (6.81 ml) göre yüksek bulunmuştur (p=0.014). Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu yüksek önemli bulunmuştur (p=0.007). Çalışmamızda, erken ve orta laktasyon dönemlerinde nitrat ilavesi CH₄ üretimini düşürmüştür. Bazı araştırmalarda süt sığırları rasyonlarına nitrat ilave edilmesi durumunda CH₄ üretiminin düştüğü (% 16-32 arasında) belirlenmiştir (Hulshof et al., 2012; Lund et al., 2014; Newbold et al., 2014; van Zijderveld et al., 2011; Velazco et al., 2014). Nitrat ve üre, rasyonun azot kaynağıdır.

Nitrat ve üre ilavesinin ruminal CH₄ üretim üzerindeki etkisi farklı şekil ve düzeylerde olmaktadır. Pal et al. (2014), kaba yem oranı yüksek olan rasyonlara nitrat ilave edildiğinde CH₄ üretimini düşürdüğünü (konsantre yem zengin olan rasyonlara kıyasla) bildirmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar bu bulgu ile uyumludur. Çalışmamızda, orta laktasyon dönemi rasyonların için saptanan CH₄ değeri erken laktasyon dönemi için bulunan değere göre düşük bulunmuştur. Kaba yem oranı daha yüksek olan orta laktasyon dönemi rasyonları için CH₄ üretiminin beklenenin aksine düşük olması, çalışmada kaba yem kaynağı olarak kullanılan *Khaya senegalensis* bitkisindeki yüksek tanen içeriği ile açıklanabilir (Hariadi and Santoso, 2010). Alvarez-Hess et al. (2019) sığırlarda rasyon tipi (yüksek kaba yem veya yüksek konsantre yem oranlı) ve CH₄ indirgeyici yem katkı maddeleri (nitrat gibi) arasında benzer etkileşimlerin olduğunu bildirmiştir. Bazı araştırmacılar, nitrat ilavesinin *in vitro* ve *in vivo* CH₄ üretimini azalttığını bildirmiştir (Alvarez-Hess et al., 2019; de Raphélis-Soissan et al., 2014; Pal et al., 2014; Patra and Yu, 2015).

Rumende oluşan nitratın amonyağa indirgenmesi olayında karbondioksitin metana indirgenmesi olayına göre daha fazla H kullanılmaktadır. Bu nedenle nitrat ilavesinin CH₄ üretimini azaltma potansiyeline sahip olduğu söylenebilir (Callaghan et al., 2014; Hristov et al., 2013; Leng 2008; van Zijderveld et al., 2010). Ayrıca, bazı çalışmalarda nitratın (üre ile karşılaştırıldığında) CH₄ üretiminin azaltılmasında düşük kaba yem/konsantre yem oranına sahip olan rasyonlarda yüksek kaba yem / konsantre yem oranı olan rasyonlara kıyasla daha etkili olduğu bildirilmiştir. Rasyonlarda kullanılan kaba yem türü ve özellikle kaba yemin besin maddeleri kompozisyonu CH₄ üretimini etkilemektedir. Geviş getiren hayvanların rasyonlarında tanen gibi ikincil metabolitlerce zengin olan bitki ya da çalı ve ağaç yapraklarının (*Khaya senegalensis* gibi) kullanılması durumunda CH₄ üretiminin azaldığı bilinmektedir (Sebata et al., 2011).

Mevcut çalışmada laktasyon döneminin ve nitrat ilavesinin ME, NE_L, SOM ve İVOMS değerlerini etkilediği belirlenmiştir (p<0.05). Erken laktasyon döneminde ME, NE_L, SOM ve İVOMS değerleri orta laktasyon dönemine göre yüksek bulunmuştur (p<0.05). En yüksek ME (9.54 MJ/kg KM), NE_L(5.25 MJ/kg KM), SOM (66.12 g/kg KM), İVOMS (%68.26) değerleri üre (kontrol) ilavesi ile erken laktasyon döneminde bulunup en düşük ME (6.99 MJ/kg KM), NE_L (4.27 MJ/kg KM), SOM (50.27 g/kg KM), İVOMS (%53.82) değerleri ise nitrat ilavesi ile orta laktasyonda

kaydedilmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, erken laktasyon rasyonların için belirlenen ME, NE_L, SOM ve İVOMS değerlerinin orta laktasyon dönemi rasyonlarına göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu durum erken laktasyon döneminde kullanılan rasyon sindirilebilir besin maddelerince zengin olması ile açıklanabilir (Hristov vd., 2013; van Zijderveld vd., 2010). Mevcut çalışmada orta laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyonların düşük İVOMS, SOM, ME ve NE_L değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum, nitritin mikroorganizmalar üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklanabilir. Rumende nitratın nitrite indirgenme reaksiyonunun, nitritin amonyağa indirgenmesi reaksiyonuna göre hızlı olması durumunda rumen ortamında nitrit birikimi söz konusu olmaktadır (Parkinson et al., 2010). Bazı çalışmalarda nitritin mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen, mevcut çalışmada orta dönemde rumende gerçekleşen nitrit birikiminin (üst kısımda detaylandırılan mekanizma aracılığıyla) nitritin amonyağa dönüştürülmesinden sorumlu olan mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisi erken döneme kıyasla daha fazla kendini ortaya koymuştur.

Bu durum ise erken laktasyon döneminde nitritin amonyağa dönüştürülmesinde etkili olan mikroorganizmaların enerji ihtiyaçlarının daha etkin bir şekilde karşılanmış olması ile açıklanabilir (Callaghan et al., 2014; Velazco et al., 2014). Üre ilaveli (kontrol) rasyonlar orta laktasyonda ME, NE_L, SOM ve İVOMS değerlerini yükseltmiştir. Bu sonucun daha önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir (Adejoro et al., 2019; Khattab et al., 2013; Oji et al., 2007; Velazco et al., 2014). Ancak Liang et al. (2020) üre ilavesinin SOM'ı düşürdüğünü bulmuştur. Mevcut çalışmada nitrat kullanımının ME değerini erken laktasyon döneminde artırırken, orta laktasyon döneminde düşürdüğü belirlenmiştir.

Bu sonuç, erken laktasyon dönemi rasyonlarındaki yüksek HP ve lif ve düşük tanen içerikleri ile açıklanabilir (Gemedda and Hassen, 2015; Giridhar et al., 2018; Hatew et al., 2016; Huyen et al., 2016; Singh et al., 2016). Çalışmamızda, nitrat ilavesi ile bulunan NE_L değerleri Klop et al. (2016) tarafından bulunan değerlerle benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda, orta laktasyon dönemi rasyonların (%60 *Khaya senegalensis*) için bulunan in İVOMS değerlerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda yüksek tanen konsantrasyonuna sahip olan çalı ve ağaç yapraklarının kullanımının İVOMS değerlerini düşürdüğü bildirilmiştir (Njidda, 2010; Silanikove et

al., 1997; Waghorn and Shelton, 1997). Mevcut çalışmada, İVOMS değerinde orta laktasyon döneminde gerçekleşen düşme bu dönemde kullanılan rasyonda kaba yem/kesif oranının yüksek olması ve kaba yem kaynağı olarak kullanılan *Khaya senegalensis* bitkisinde yüksek düzeyde bulunan tanen varlığı ile ilişkilendirilebilir (Bhatta et al., 2009; Sebata et al., 2011; Theart, 2015). Bilindiği gibi ikincil metabolitler (tanen gibi) karbonhidratlar ve özellikle de proteinlerle etkileşime girerek bu besin maddelerinin sindirilebilirlik derecelerini düşürürler. Ayrıca, tanenlerin bu besin maddelerinin sindiriminde rol oynayan mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (Bhatta et al., 2009).

4.5.4. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri.

Mevcut çalışmada kırk sekiz saat süreyle tamponlanmış rumen sıvısında inkübe edilen erken ve orta laktasyon dönemlerinde süt inekleri için hazırlanan üre (kontrol) ve nitrat ilaveli rasyonların rumen fermantasyon özellikleri, MPS, KZYA, pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri ile ilgili veriler Tablo 4.6.'da sunulmuştur. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrasında enjektörlerde kalan sıvılarda pH değerleri 5.87 – 5.99 arasında değişiklik göstermiştir.

Mevcut çalışmada bulunan pH değerleri bazı çalışmalar (Krause ve Oetzel, 2006) ile uyumludur. Laktasyon dönemi pH değerini etkilemiştir ($p=0.020$). Erken laktasyon dönemi için pH değeri ($pH=5.88$) orta laktasyon dönemine ($pH=5.95$) kıyasla yüksek bulunmuştur ($p=0.020$). Bu sonuç bazı çalışmalarla uyum içindedir (Calsamiglia et al., 2007).

Nitrat ilavesi pH değerini artırıcı yönde etki yapmıştır ($p=0.059$). Bu sonuç bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir (de Raphélis-Soissan et al., 2014; Alemu et al., 2019; Liang et al., 2020). Diğer bazı çalışmalarda ise nitrat ilavesinin pH değerini etkilemediği bildirilmiştir (El-Zaiat et al., 2014; Li et al., 2012; Nolan et al., 2010).

Mevcut çalışmada, nitrat ilavesi ile pH değerinde ortaya çıkan artış nitrat parçalanmasından açığa çıkan amonyak birikimi ile (Cottle, 1991) açıklanabilir. Ayrıca, diğer bazı araştırmacılar nitrat ilavesinin İVGÜ'ni ve CH₄ üretimini inhibe ederek pH değerini yükselttiğini bildirmiştir (Guyader et al., 2016). Aynı

araştırmacılar, nitrat ilavesinin fermentasyon profilini asetat üretimine doğru değiştirebileceğini ve TUYA ve NH₃-N'u miktarını azaltabileceğini bildirmiştir. Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu pH değerlerini etkilememiştir (p=0.190).

Çalışmamızda nitrat kullanımına bağlı olarak pH değerindeki artış NH₃-N ve TUYA değerleri ile açıklanabilir. Nitekim NH₃-N üretimi nitrat kullanımına bağlı olarak artış gösterirken, TUYA değeri düşmüştür. Bilindiği üzere NH₃-N konsantrasyonunda artış (Guyader et al., 2016; Nolan et al., 2010) ve TUYA konsantrasyonunda düşme (Asanuma et al., 2015; Li et al., 2012; Sar et al., 2005) pH'yı artırıcı yönde etki göstermektedir.

Xu et al. (2019), ruminal pH'nın ruminal NH₃-N seviyesi ile TUYA konsantrasyonu arasındaki dengenin sonucu olarak oluştuğunu bildirmiştir. Bu tür çalışmalarda rumen sıvısı donörü olarak kullanılan hayvanların beslenmesinde kullanılan karmaların kimyasal bileşimi de, çalışmalarda elde edilen sonuçları etkilemektedir (Rymer et al., 2005).

Mevcut çalışmada kullanılan rumen sıvısı, besi sığırından temin edildiğinden amilolitik bakterilerin aktivitesi için uygun özellik taşımaktadır (Murphy et al., 1982). Diğer taraftan, bazı çalışmalarda konsantre yemlerce zengin rasyonların kullanılması durumunda rumen pH'sının düştüğü bildirilmektedir (Harun ve Sali, 2019; Zadeh and Kor, 2013). Bu bilgiler, mevcut çalışmada tüm gruplarda belirlenen düşük pH değerlerini açıklamaktadır.

Çalışmada laktasyon dönemi (p=0.041) NH₃-N değerlerini etkilediği görülmektedir (erken ve orta laktasyon dönemleri için sırasıyla 7.46 mg/dl ve 6.99 mg/dl). Bu çalışmada, erken laktasyon döneminde tespit edilen (orta laktasyona kıyasla) yüksek NH₃-N konsantrasyonu bu dönemde kullanılan rasyonun HP içerikleri ve HP sindirilebilirlikleri yüksek olan yemlerden hazırlanmış olması ile açıklanabilir (Zhou et al., 2018). Orta laktasyon döneminde NH₃-N konsantrasyonunun düşük çıkmasının bir başka sebebi de bu dönemde tanence zengin *Khaya senegalensis* ağaç yapraklarının daha yüksek oranda (%60) kullanılmasıdır (Zhou et al., 2018).

Mevcut çalışmada, nitrat ilavesi NH₃-N konsantrasyonunu artırıcı yönde etki yapmış olup bu bulgu daha önceki çalışmalarla uyum içerisinde (Guyader et al., 2015; Lee et al., 2015b; Lee et al., 2017; Li et al., 2012; Olijhoek et al., 2016; van

Zijderveld et al., 2011). Bazı araştışıcılar nitratın fermantasyon profilini değiştirdiğini ve NH₃-N konsantrasyonunu azalttığını bildirmiştir (Guyader et al., 2016). Aynı araştışmacılar nitrat ve ürenin ruminal mikroorganizmalar tarafından amonyağa dönüştürüldüğünü bildirmektedir. Öte yandan, bazı araştışıcılar tanenlerin rasyondaki proteinleri bağlayarak ve rumen mikrobiyotasını düzenleyerek ruminal protein sindirimini etkilediğini bildirmiştir (Adejoro and Hassen, 2018; Adejoro et al., 2019; Díaz Carrasco et al., 2017; Getachew et al., 2008; Min et al., 2014; Zhou et al., 2018).

Tanence zengin korunga kuru otunun (*Onobrychis sativa*) rasyonda yer alması durumunda ruminal amonyak konsantrasyonunda gerçekleşen düşme tanenlerin proteinlerin parçalanma oranını düşürücü etkisine bağlanmaktadır. Tanenlerin proteinlerin parçalanma oranını düşürücü etkileri fenolik grupların (tanenler) hidroksi radikalları ile proteinlerin karbonil grupları arasındaki ilgiden kaynaklanmaktadır (Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006). Bu durum, bağırsaklara doğru olan parçalanmamış (korunmuş) protein akımını artırdığı için hayvan açısından faydalı olmaktadır. Metanogenesis (metan oluşumu) olayı ile karşılaştırıldığında, nitrat indirgenmesinin (nitrit ve amonyağa) enerjinin kullanımı açısından daha etkin ve verimli olduğu bilinmektedir (Ungerfeld and Kohn, 2006).

Nitratın amonyağa dönüşümü reaksiyonunda yüksek miktarda H kullanımı söz konusu olduğundan rumen ortamında CH₄ üretimi için yeterli miktarda H iyonları kalmamakta ve sonuğa CH₄ üretimi azalmaktadır. Nitekim çalışmamızda da NH₃-N konsantrasyonunu (Tablo 4.6.) artırıcı yönde etki yapan rasyonlar (nitrat ilaveli) CH₄ üretimini (Tablo 4.5.) düşürmüşlerdir. NH₃-N değerleri bakımından laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu önemli bulunmuştur (p=0.004).

Mevcut çalışmada, 48 saatlik inkübasyonda laktasyon dönemi AA (p=0.047), PA (p=0.009), BA (p=0.046), TUYA (p=0.035) ve AA:PP oranını (p<0.001) etkilemiştir. Aynı şekilde, nitrat ilavesi de AA, PA, BA, TUYA değerlerini etkilemiştir (p<0.05). Laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonunun AA (p=0.010), PA (p=0.030), BA (p=0.008) ve TUYA (p=0.009) değerlerine etkisi bulunmuştur. Ancak, nitrat ilavesinin AA:PA oranını etkilemediği (p=0.514) ve AA:PA oranı bakımından laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonunun önemli olmadığı belirlenmiştir (p=0.267).

Tablo 4.6. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemindeki süt sığırları için hazırlanan rasyonların rumen parametreleri üzerindeki etkisi

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	NH ₃ -N (mg/dl)	UYA (mmol/l)				AA:PA	KZYA (mmol/l)	MPS (mg/ml)	PS (x10 ⁴ /ml)	pH
			AA	PA	BA	TUYA					
Erken (4KS6KY)	Kontrol	6.45 ^d	52.55 ^a	18.42 ^a	15.59 ^a	91.48 ^a	2.85	0.92 ^a	2.12 ^a	48.88 ^a	5.87
	NaNO ₃	8.46 ^a	47.14 ^d	16.10 ^c	13.49 ^d	81.17 ^d	2.93	0.86 ^b	2.09 ^b	46.44 ^b	5.90
Orta (4KS6KY)	Kontrol	6.83 ^c	52.26 ^b	16.64 ^b	14.59 ^b	87.89 ^b	3.14	0.92 ^a	2.03 ^c	40.19 ^c	5.91
	NaNO ₃	7.17 ^b	49.30 ^c	15.81 ^d	13.94 ^c	83.83 ^c	3.12	0.62 ^c	1.61 ^d	39.81 ^d	5.99
Laktasyon dönemi (LD)											
Erken		7.46	49.85	17.26	14.54	86.32	2.89	0.89	2.11	47.66	5.88
Orta		6.99	50.78	16.22	14.26	85.86	3.13	0.77	1.82	40.00	5.95
Yem katkı maddesi (YKM)											
Kontrol		6.64	52.41	17.53	15.09	89.68	2.99	0.92	2.08	44.54	5.89
NaNO ₃		7.81	48.22	15.96	13.71	82.50	3.03	0.74	1.85	43.13	5.95
O.S.H.		0.244	0.694	0.332	0.270	1.209	0.411	0.040	0.064	14.843	0.016
Ana etkiler											
LD		0.041	0.047	0.009	0.046	0.035	<0.001	0.034	0.022	<0.001	0.020
YKM		0.001	<0.001	0.001	0.002	<0.001	0.514	0.041	0.014	<0.001	0.059
LD × YKM		0.004	0.015	0.041	0.041	0.001	0.267	0.005	0.003	<0.001	0.190

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası, AA: Asetik asit, PA: Propiyonik asit, BA: Bütirik asit, KZYA: Kısa zincirli yağ asit, MPS: Mikrobiyel protein sentezi, PS: Protozoa sayısı.

Mevcut çalışmada nitrat ilavesinin her 2 laktasyon döneminde de AA konsantrasyonunu düşürdüğü görülmektedir ($p<0.001$). Bu bulgu rasyona nitrat ilave edilmesi durumunda rumende AA konsantrasyonunun düştüğünü bildiren çalışmalarla uyum göstermektedir (Adejoro and Hassen, 2018; Guo et al., 2009; Le Thi Ngoc Huyen et al., 2010; Lee et al., 2017; Nolan et al., 2010).

Macome et al. (2017), rumende AA konsantrasyonundaki artışın rasyonun lifli madde içeriğindeki ile (NDF ve ADF) artışla bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Rasyonun lif içeriğindeki artışa bağlı olarak rumende H konsantrasyonunda artış gerçekleşir ve sonuçta bu H iyonları da AA ve CH₄ üretiminde kullanılır (Kljak et al., 2017; Liu et al., 2019). Guyader et al. (2016), nitratın asetat üretimi için fermantasyon profilini değiştirme kapasitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Lifli maddelerce zengin yem kaynakları bakımından zengin olan rasyonların rumende PA konsantrasyonunu düşürdüğü bilinmektedir (Capelari et al., 2018). Çalışmamızda da lifli maddelerce zengin olan orta laktasyon dönemi rasyonun kullanılması durumunda PA konsantrasyonu düşmüştür ($p=0.009$).

Mevcut çalışmada nitrat ilavesine bağlı PA konsantrasyonundaki düşüşün bazı çalışmalar (Adejoro and Hassen, 2017; Alemu et al., 2019; Mamvura et al., 2014; Nolan et al., 2010; Wang et al., 2018) ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, van Zijderveld et al. (2011) nitrat ile PA'nın sentez mekanizması arasında rekabet olduğunu bildirmiştir. Bir başka deyişle nitratın amonyağa indirgenmesinde rumende mevcut serbest H iyonlarının kullanılması durumunda PA üretimi (sentezi) için gerekli olan H iyonu konsantrasyonu azalmakta ve sonuçta rumende PA konsantrasyonu düşmektedir.

Erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarına nitrat ilavesinin rumende BA konsantrasyonunu düşürdüğü görülmektedir ($p=0.046$) (Tablo 4.6.). Önceki çalışmalarda üre ilavesi PA konsantrasyonunu artırdığı bulunmuştur (Shi et al., 2012). En yüksek BA konsantrasyonu erken laktasyonda üre ilaveli (kontrol) rasyonun kullanılması durumunda ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda nitrat kullanımına bağlı olarak BA konsantrasyonunda gerçekleşen düşme daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Adejoro and Hassen, 2017; Guo et al., 2009; Mamvura et al., 2014; Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010).

Mevcut çalışmada, her 2 laktasyon döneminde de nitrat ilaveli rasyonun kullanılması durumunda TUYA konsantrasyonunun düştüğü görülmektedir ($p<0.001$). Bu sonuç daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Adejoro and Hassen, 2018; Guo et al., 2009; Liang et al., 2020; Lin et al., 2011; Mamvura et al., 2014; Patra and Yu, 2015; Shi et al., 2012; Wang et al., 2018). Bunun aksine, Adejoro and Hassen. (2018) ve Liu et al. (2017) nitrat ilavesinin rumende TUYA üretimini etkilemediğini bildirmiştir.

Bilindiği gibi UYA'leri rumendeki karbonhidratların mikrobiyal fermantasyon sonucunda üretilir. Çalışmamızda üre ilaveli (kontrol) rasyonlar için belirlenen yüksek TUYA konsantrasyon değerleri kontrol grubunda kullanılan üre varlığı ile ilişkilendirilebilir. Alende et al. (2019), üre ilavesine (kontrol) bağlı TUYA artışı karbonhidrat fermantasyonundaki artışla açıklanabilir. Alende et al. (2019) üre suda çözünebilir karbonhidratların oranını arttırdığını bulmuştur.

Aynı araştırmacılar TUYA konsantrasyonunun artışı suda çözünebilir karbonhidratların oranının artması ilişkisi olduğunu bulmuştur. Mevcut çalışmada, AA:PA oranı bakımından laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu önemli bulunmamıştır ($p=0.267$). Aynı şekilde, nitrat ilavesi de bu oranı etkilememiştir ($p=0.514$). Ancak, AA:PA oranı laktasyon döneminden önemli düzeyde etkilenmiştir ($p<0.001$).

Orta laktasyon döneminde AA:PA oranında gerçekleşen artış bu dönemde kullanılan rasyonun kompozisyonu ile ilişkilendirilebilir. Orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonun kaba yem/konsantre yem oranının yüksek olması AA:PA oranını artırıcı yönde etki yapmıştır. Bilindiği gibi rasyonda kaba yem oranının artışına bağlı olarak AA oranında artış, PA oranında ise düşme gerçekleşmekte ve sonuçta AA:PA oranı artmaktadır (Capelari et al., 2018; Lee et al., 2015b; Maccarana et al., 2016; Soltan et al., 2017).

Giridhar et al. (2018), rasyonlarda çalı ve ağaç yaprakları kullanımının PA konsantrasyonunu azalttığını, AA:PP oranını artırdığını bildirmiştir. Nitekim çalışmamızda da orta laktasyon dönemi rasyonda bu gruba giren *Khaya senegalensis* yaprakları yüksek oranında kullanılmıştır. Mevcut çalışmada laktasyon dönemi KZYA içeriğini etkilemiştir ($p=0.034$). Belirlenen KZYA değerleri, Njidda (2010) tarafından bildirilen değerlerden yüksektir (*Khaya senegalensis* kullanıldığında; KZYA=0.01

mmol/l). İki çalışma arasındaki kullanılan rasyonların içeriği (Kaba yem/konsantre yem oranı) ve farklı katkı maddelerinin kullanılmış olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda nitrat ilavesi erken laktasyon döneminde KZYA içeriğini artırırken, orta laktasyon döneminde düşürmüştür. Nitrat ilavesinin rumende KZYA içeriği üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların bir kısmında artırıcı yönde etkiler (Tomkins et al., 2018) diğerlerinde (Wang et al., 2018) ise düşürücü yönde etkilerin olduğu belirlenmiştir. El-Zaiat et al. (2014) ise nitrat ilavesinin rumen KZYA içeriğini etkilemediğini bildirmiştir.

Bazı çalışmalarda rumende BA konsantrasyonu ile KZYA arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Etschmann et al., 2009; Penner et al., 2011). Sehested et al. (2000), BA emilimindeki artışın rumende KZYA konsantrasyonunda bir artışa yol açtığını bildirmiştir. Bu literatür bulguları ile çalışmamızda elde edilen bulguların uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Tablo 4.6.). Bu çalışmada, PS ile ilgili verilerin bazı çalışmalarla uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Sun et al., 2017; van Zijderveld et al., 2010; Zhou et al., 2012). Her 2 laktasyon döneminde de nitrat ilavesi PS'nı düşürmüştür ($p<0.001$). Diğer yandan, PS erken laktasyon döneminde orta laktasyon dönemine göre yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Mevcut çalışmada, nitrat ilaveli gruplarda PS'da gerçekleşen düşme tanen ve nitratın birleşik etkisi ile açıklanabilir. Benzer bir çalışmada, nitrat ve tanenin (ikincil maddeler) birleşik etkilerinin PS'nı azalttığı bildirilmiştir (Tomkins et al., 2018; Zhou et al., 2018). Çalışmamızda kullanılan *Khaya senegalensis* ağaç yaprakları tanenler başta olmak üzere ikincil maddeler bakımından zengindir. Bazı araştırmalarda nitrat ilavesinin rumende PS ve H iyonu konsantrasyonunda düşmeye yol açtığı belirlenmiştir (Asanuma et al., 2015; Lin et al., 2011; 2013).

Aynı şekilde, Sun vd. (2017), nitratın indirgenmesi sonucunda oluşan nitritin rumen fermantasyonunu TUYA, PA ve PS'da düşmeye yol açacak şekilde etkilediğini bildirmiştir. Çalışmamızda, PS ile CH₄ üretimi arasında bir ilişki bulunmaktadır. Çalışmamızda gerçekleşen, nitrat ilavesi PS ve CH₄ üretimini düşürücü yönde etki yaptığı Tablo 4.6 ve 4.5'te belirtilmiştir. Bu bulgu PS ile CH₄ üretimi arasında olduğunu bildiren çalışmalarla uyum göstermektedir (Cottle et al., 2011; Moate et al., 2019; Stumm et al., 1982; Ushida and Jouany 1996). Mevcut çalışmada, CH₄ üretiminden sorumlu olan metanojenik (metan oluşturan) bakterilerin yaklaşık %10-

20'lik kısmının rumen ortamında protozoa popülasyonu ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, PS'nin nitrat ilavesinden etkilenmediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Asanuma et al., 2015; Lin et al., 2011; 2013; Patra and Yu, 2013; Sun et al., 2017).

Çalışmamızda, nitrat ilavesi her 2 laktasyon döneminde de ruminal MPS değerini düşürmüştür ($p=0.014$). Nitrat ilavesi ile rumen MPS içeriğinde gözlenen düşme bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (Wang et al., 2018; Witzig et al., 2018). Erken laktasyon dönemi rasyonların için bulunan MPS değeri (2.11 mg/ml) orta laktasyon rasyonların için bulunan değere (1.82 mg/ml) göre yüksektir ($p=0.022$). Alende et al. (2019) HP içeriği yüksek rasyonların rumende MPS içeriğini artırdığını bildirmiş olup bu bulgu çalışmamızda elde edilen bulguyla benzerlik göstermektedir.

Aynı şekilde, bazı çalışmalarda da polipeptitler, oligopeptitler veya amino asitler gibi protein türevlerinin kullanılması durumunda rumende MPS değerinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Alende et al., 2019; Hook et al., 2011). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda nitrat ilavesinin ruminal MPS içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Nguyen et al., 2016). Mevcut çalışmada, nitrat ilavesinin PS ve MPS içeriği üzerindeki etkisi benzerlik göstermektedir. Bir başka deyişle, nitrat ilavesine bağlı olarak her 2 laktasyon döneminde de bu 2 parametre bir düşme gerçekleşmiştir.

4.5.5. Erken ve orta dönemlerinde rasyonların *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlikleri üzerindeki etkileri.

Mevcut çalışmada, *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF sindirilebilirliği (İVNDFS) ve *in vitro* ADF sindirilebilirliği (İVADFS) ile ilgili veriler Tablo 4.7'de verilmiştir. Laktasyon döneminin İVGS ($p=0.001$), İVNDFS ($p=0.025$) ve İVADFS ($p=0.031$) değerlerini etkilediği görülmektedir. Bu çalışmada erken laktasyonda İVNDFS, İVADFS ve İVGS değerlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu HP içeriği yüksek olan rasyonların yüksek İVNDFS, İVADFS ve İVGS değerlerini yükselttiğini bildiren Alende et al. (2019)'ın bulguları ile uyusmaktadır. Ayrıca, Sakthivel et al. (2012), konsantre yem içeriği yüksek olan rasyonun İVGS değerini artırdığını bildirmektedir ki bu bulgu da çalışmamızla uyum içerisindedir.

Çalışmamızda, nitrat ilavesi her 2 laktasyon döneminde de sindirilebilirlikle ilgili tüm parametreleri (İVGS, İVNDFS ve İVADFS) düşürmüştür ($p<0.001$). Bazı

çalışmalar (Adejoro et al., 2019; Khattab et al., 2013; Klevesahl et al., 2003; Marini ve Van Amburgh, 2003; Nair et al., 2018) ile uyum görülmektedir. Olijhoek et al. (2016) nitrat ilavesinin İVNDFS değerini etkilemediğini bildirmiştir. Çalışmamızda nitrat ilavesine bağlı olarak sindirilebilirlik parametrelerinde gözlenen düşme tanen ve nitratın ortaklaşa etkisi ile açıklanabilir (Adejoro et al., 2019; Kamra et al., 2012; Molina-Botero et al., 2019). Aynı şekilde, Beauchemin et al. (2007) ve Makkar (2003) kondanse tanenlerin rumende protein, lif sindirilebilirliği ve mikrobiyal protein sentezini düşürdüğünü bildirmiştir.

Tablo 4.7. Nitrat katkılı erken ve orta laktasyon dönemleri için hazırlanan rasyonların *in vitro* sindirilebilirlikleri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	İVNDFS	İVADFS	İVGS
Erken (4KS6KY)	Kontrol	66.32 ^b	57.43 ^b	71.43 ^a
	NaNO ₃	64.36 ^c	55.85 ^d	64.52 ^c
Orta (6KS4SY)	Kontrol	67.96 ^a	56.28 ^a	69.28 ^b
	NaNO ₃	61.65 ^d	55.12 ^c	63.65 ^d
Laktasyon dönemi (LD)				
Erken		65.34	56.64	67.98
Orta		64.81	55.70	66.47
Yem katkı maddesi (YKM)				
Kontrol		67.14	56.86	70.35
NaNO ₃		63.01	55.49	64.09
O.S.H		1.203	0.479	1.177
Ana etkiler				
LD		0.025	0.031	0.003
YKM		<0.001	0.021	<0.001
LD × YKM		<0.001	0.003	0.006

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

4.5.6. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri.

Mevcut çalışmada kullanılan rasyonlara ait kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) ile ilgili veriler Tablo 4.8.'de verilmiştir. Çalışmada ele alınan KMT ve KMS parametreleri her 2 laktasyon döneminde de nitrat ilavesine bağlı olarak artış göstermiştir. Mevcut çalışmada, orta laktasyon döneminde (Erken

laktasyon dönemine kıyasla) KMS ve KMT'in düşüşü kullanılan rasyonlarda yüksek tanen içeriği ile ilişkilendirebilir (Brown et al., 2018). Nitrat ilavesine bağlı olarak ele alınan parametrelerde ortaya çıkan etkiler ile ilgili farklı literatür bildirişleri bulunmaktadır.

Çalışmamızda nitrat ilavesine bağlı olarak KMT ve KMS değerlerinde ortaya çıkan artış defaunasyon işleminin (protozoa popülasyonunun rumenden uzaklaştırılması) KMT ve KMS'ni protozoal fibrolitik aktivitedeki düşmeye bağlı olarak düşürücü yönde etki yaptığını bildiren Newbold et al. (2015)'nin bulguları ile çelişmektedir.

Tablo 4.8. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri.

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	KMT	KMS
Erken (4KS6KY)	Kontrol	3.30 ^b	69.45 ^d
	NaNO ₃	3.35 ^a	70.24 ^a
Orta (6KS4SY)	Kontrol	3.20 ^d	69.60 ^c
	NaNO ₃	3.24 ^c	69.95 ^b
Laktasyon dönemi (LD)			
Erken		3.33	69.85
Orta		3.22	69.78
Yem katkı maddesi (YKM)			
Kontrol		3.25	69.53
NaNO ₃		3.30	70.10
O.S.H.		0.033	0.410
Ana etkiler			
LD		0.037	0.006
YKM		<0.001	<0.001
LD × YKM		0.001	0.001

a. b. c. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Orta standart hatası

Gerçekten de, mevcut çalışmada nitrat ilavesine bağlı olarak PS'da ortaya çıkan düşme beklenenin aksine KMT ve KMS değerlerinde artışa yol açmıştır. Nitrat ilavesine bağlı olarak KMT ve KMS değerlerinde gözlenen değişimle ilgili olarak farklı bildirişler bulunmaktadır.

Bazı çalışmalarda bu parametrelerde nitrat ilavesine bağı olarak düşme (de Raphélis-Soissan et al., 2014; Hulshof et al., 2012; Klop et al., 2016; Leng, 2008; Newbold et al., 2015) ve artış (Guyader et al., 2015; Lee et al., 2015a; Liang et al., 2020; Newbold et al., 2014; Shi et al., 2012; Troy et al., 2015) olduğu bildirilirken, diğer bazı çalışmalarda (Olijhoek et al., 2016; van Zijderveld et al., 2011; Wang et al., 2018) nitrat ilavesinin bu parametrelerin üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Tomkins et al. (2018), nitrat ilaveli rasyonların KMT'nin üre ilaveli rasyona göre rakamsal düzeyde yüksek olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda nitrat ilavesine bağı olarak KMT'de orta çıkan artış nitrat ilavesinin KMT'ni artırdığını bildiren Nguyen et al. (2016)'in çalışmasında elde edilen bulgularla uyum göstermektedir. Söz konusu araştırmacı KMT'deki artışı PS'da nitrat ilavesiyle ortaya çıkan düşme ile ilişkilendirmiş olup aynı durum mevcut çalışmada da ortaya çıkmıştır.

Nitrat ilavesinin KMT üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar arasında gözlenen farklılık söz konusu çalışmalarda kullanılan yemleme stratejilerindeki farklılık (nitratın tek dozda veya rasyonun bir bileşeni olarak verilmesi, çalışmalarda serbest (ad libitum) ve sınırlı yemleme metotlarının uygulanması ile açıklanabilir (Olijhoek vd., 2016).

4.6. Sonuç

Mevcut çalışmanın sonuçları erken ve orta laktasyon dönemleri için hazırlanan ve tek kaba yem kaynağı olarak yüksek oranda lif içeren *Khaya senegalensis*'in kullanıldığı rasyonda besin maddeleri içeriğinin ve *in vitro* rumen parametrelerinin (GÜ, MÜ, UYA vb.) nitrat ilavesi ile değiştiğini ortaya koymuştur. Genel anlamda, nitrat ilavesinin KMT, KMS ve MPS parametrelerinde artışa yol açtığı, enterik CH₄ emisyonunda ise düşmeye yol açtığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, genel anlamda değerlendirildiğinde her 2 laktasyon döneminde de nitratın potansiyel bir anti-metanojenik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

5. *MEDİCAGO SATİVA* TEMELLİ RASYONLARA NİTRAT VE BİTKİSEL YAĞ İLAVESİNİN, METAN ÜRETİMİ VE BAZI RUMEN PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

5.1. Giriş

Metan, küresel ısınmaya büyük katkıda bulunmaktadır (İPCC, 2014). Metan üretiminde ana aktörler ruminantlardır. CH₄ rumende mikrobiyal fermantasyon ürünüdür. Rumende üretilen CH₄ miktarı, hayvansal üretim sektöründeki çevresel etkileri ve enerji maliyetlerini tahmin etmek için bir göstergedir (Auffret vd., 2018). Bahsedilen bu mikroorganizma popülasyonunun azaltılması amacı ile ruminant rasyonlarına nitrat (Doreau et al., 2017; Hristov et al., 2013) ve bitkisel yağ (Bougouin et al., 2018) ilavesi yoluna gidilmektedir.

Rumene gelen rasyon kaynaklı nitrat ortamdaki serbest H atomlarını NH₃ üretiminde kullanmak üzere alıkoyar ve sonuç olarak ortamda H atomu konsantrasyonu düştüğünden CH₄ üretiminde düşme gerçekleşir (van Zijderveld et al., 2011). Diğer bazı çalışmalarda, nitrat kullanımına bağlı olarak toplam gaz ve enterik metan üretiminin azaldığı (Guyader et al., 2016; Ungerfeld and Kohn, 2006), mikrobiyel gelişimin arttığı (Patra and Yu, 2015) ve ruminal NH₃ konsantrasyonunun artış gösterdiği (Sharifi et al., 2018) belirlenmiştir. Ruminal CH₄ üretiminin azaltılmasına yönelik diğer bir uygulama da rasyona ÇDYA ve TDYA bakımından zengin bitkisel yağların ilavesidir (Beauchemin et al., 2007; Boadi et al., 2004; McGinn et al., 2004).

Martin et al. (2010), rasyona yağ ilavesinin H üretimini teşvik eden protozoa popülasyonunda azalmaya yol açarak (Guyader et al., 2015) CH₄ üretimini engellediğini bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalar, nitrat ve yağların birlikte kullanılmasının CH₄ üretiminde eklemeli etki ortaya koyduğunu göstermiştir (Guyader et al., 2015; 2016). Bu çalışmanın amacı, nitrat ve bitkisel yağ (SY ve FY) ilavesinin *Medicago sativa* temelli rasyonlarla beslenen hayvanların rumenlerindeki CH₄ üretimi ve bazı rumen parametreleri (pH, amonyak, protozoa sayımı ve UYA'lar) üzerindeki etkisini belirlemektir.

5.2. Materyal

5.2.1. Yem materyali

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Hayvan Besleme Laboratuvarında yürütölen çalışmada, birinci ve ikinci laktasyon döneminde bulunan süt sığırları için hazırlanan iki farklı rasyon kullanılmıştır. Rasyonda yer alan karma yem özel bir yem fabrikasından satın alınmıştır. Kullanılan karma yemin besin madde içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Erken laktasyon dönemi rasyonu %40 *Medicago sativa* + %60 Karma yem, orta laktasyon dönemi rasyonu ise %60 *Medicago sativa* + %40 Karma yem formölasyonuna göre hazırlanmıştır.

Rasyonlarda N dengesinin sağlanması amacı ile nitrat içermeyen rasyonlara üre ilavesi yapılmıştır. rasyonlara iki bitkisel yağ kaynağı (Soya yağı (SY) ve Fındık yağı (FY)) ilave edilmiştir. Gaz üretimi ölçümü için 250 mg rasyon numunesi hazırlanıp şiringalara konulmuştur. Rumen parametreleri (pH, CH₄, NH₃ ve UYA) 24 saat inkübasyon süresi sonundan enjektörlerdeki sıvıda belirlenmiştir.

Rasyonda kullanılan MS yaprakları, Ondokuz Mayıs Üniversitesinin Araştırma ve Uygulama ifliğinden getirilmiştir. Bir katkı maddesi olarak kullanılan nitrat tuzu (sodyum nitrat) ve bitkisel yağları (SY ve FY) piyasada temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan rumen sıvısı Samsun'un Atakum ilçesinde faaliyet gösteren özel bir kesimhaneden alınmıştır.

5.2.2. Rumen sıvısı temini

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısı, Samsun ili Atakum ilçesinde bulunan özel bir mezbahannede kesilen, rumen gelişimini tamamlamış 2 yaş ve 300 kg canlı ağırlığında olan Yerli Kara ırkı inekten alınan rumen sıvısı ve içeriği kullanılmıştır. Rumen içeriği süzgeçler yardımıyla süzölerek 38-40°C'deki termosada doldurulmuş ve seri bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Rumen sıvısı alınan hayvanlar besi süresince sığır besi yemi ve fiğ kuru otundan oluşan rasyonla beslenmişlerdir.

Mezbahanneden alınan rumen sıvısında pH (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre), NH₃-N, UYA analizleri ve protozoa sayımı yapılmıştır. Rumen sıvısı toplam UYA içeriği Wiedmeier vd. (1987)'nin bildirdiği gibi gaz kromatografisi (Agilent Tech. 6890N GC, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df. Max. Sıcaklık: 260°C. Cat. 11023) ile Uludaė Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü'nde iki tekerrürlü olarak belirlenmiştir.

Yaklaşık 5 ml rumen sıvısı içerisine dört damla sülfürik asit ilave edilerek soğuk zincir korunarak -20°C’de bekletilmiş ve 10000 rpm’de +4°C’de santrifüj edilmiş, her bir numuneden 2 ml örnek alınarak GC vialine aktarılmış ve okumalar yapılmıştır. Protozoa sayımı için 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (% 37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır.

Mevcut çalışmada kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvılarına benzerliğini ortaya koymak amacıyla rumen sıvısının pH, protozoa popülasyonu, amonyak azotu ve uçucu yağ asitleri (UYA) içerikleri yukarıdaki gibi belirlenmiştir. Böylece, denemede kullanılan rumen sıvısının standart rumen sıvısının özelliğine sahip olup-olmadığı kontrol edilmiştir.

Rumen sıvısının standart rumen sıvısı özellikleri taşıdığı yapılan pH (5.13-5.15), protozoa popülasyonu (11.41×10^4 /ml rumen sıvısı), uçucu yağ asitleri (TUYA: 106.60 ± 1.09 mmol/l; AA: 60.67 ± 0.56 mmol/l; PA: 22.22 ± 0.42 mmol/l; BA: 16.02 ± 0.09 mmol/l; izobütirik asit: 2.67 ± 0.02 mmol/l; izovalerik asit: 2.45 ± 0.01 mmol/l; valerik asit: 2.57 ± 0.02 mmol/l) ve amonyak azotu (5.37 ± 0.07 mg/dl) içerikleri analizleri sonrasında belirlenmiştir (Blümmel et al., 1997; Wiedmeier et al., 1987).

5.3. Yöntemler

5.3.1. Muameleler

Deneme 2 x 2 x 3 düzeninde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür (Tablo 5.1.).

Tablo 5.1. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarını oluşturan kaba/ kesif yem ham maddeleri ve oranları (%)

Rasyon	Ham maddeler	Erken laktasyon dönemi						Orta laktasyon dönemi					
		Kontrol			NaNO ₃			Kontrol			NaNO ₃		
		0	FY	SY	0	FY	SY	0	FY	SY	0	FY	SY
Kaba yem	MS	40	40	40	40	40	40	60	60	60	60	60	60
Kesif yem	Karma yem	60	60	60	60	60	60	40	40	40	40	40	40

Mevcut çalışmada, erken (%40 *Medicago sativa* / %60 Karma yem) ve orta (%60 *Medicago sativa* / %40 Karma yem) laktasyon dönemleri için iki farklı rasyon hazırlanmıştır. Rasyonlar hazırlandıktan sonra iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta nitrat (NaNO₃) kullanılmazken (üre kullanılmıştır), ikinci grupta başına %5 NaNO₃/kg KM (45.94 g NaNO₃/kg KM) kullanılmıştır. Rasyonlara iki bitkisel yağ kaynağı SY %4 (yani 36.58 g SY/kg KM) ve FY %4 (yani 36.58 g SY/kg KM)) ilave edilmiştir. Rasyonların hazırlanması Şekil 5.1., 5.2., 5.3 ve 5.4.'te gösterilmiştir. Muamele gruplarının bileşimi ve rasyonların kimyasal kompozisyonu Tablo 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. Yağların (SY, FY) etanol ile karıştırılması ve yağ (SY, FY) + etanol karışımının rasyona eklenmesi



Şekil 5.2. Rasyonların depolanması ve etüvde (60°C) rasyonların 3 gün boyunca kurutulması



Şekil 5.3. Yem katkı maddelerinin (nitrat veya üre) tartılması ve rasyonlara karıştırılması



Şekil 5.4. Rasyonların muhafazası

Tablo 5.2. Muamele grupları ve rasyon içerikleri (g/kg KM)

İçindekiler	Muameleler (g.kg ⁻¹ KM)											
	Erken laktasyon dönemi						Orta laktasyon dönemi					
	Kontrol		NaNO ₃		Kontrol		NaNO ₃		Kontrol		NaNO ₃	
Yağsız	FY	SY	Yağsız	FY	SY	Yağsız	FY	SY	Yağsız	FY	SY	
<i>Medicago sativa</i>	400	400	400	400	400	400	600	600	600	600	600	
Buğday kepeği	140.14	140.14	140.14	140.14	140.14	140.14	128	128	128	128	128	
A.T.K. (%28)	-	-	-	-	-	-	62.08	62.08	62.08	62.08	62.08	
D.D.G.S (Mısır)	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	48	48	48	48	48	
A.T.K. (%36)	185.29	185.29	185.29	185.29	185.29	185.29	43.06	43.06	43.06	43.06	43.06	
Mısır ekstrası	60	60	60	60	60	60	30.45	30.45	30.45	30.45	30.45	
Kırık buğday (s-b)	42	42	42	42	42	42	28	28	28	28	28	
A.T.K. elekaltı	18	24	18	24	18	24	16	16	16	16	16	
Melas	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4	15.6	15.6	15.6	15.6	15.6	
Mısır	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	-	-	-	-	-	
Susam elekaltı	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	
Susam kepeği (tuzsuz)	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	
Potasyum	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	
Metiyonin	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	
Lizin	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	
Fındık yağı	-	36.58	-	-	36.58	-	-	36.58	-	-	36.58	
Soya yağı	-	-	36.58	-	-	36.58	-	-	36.58	-	36.58	
Sodyum nitrat	-	-	-	45.94	45.94	45.94	-	-	-	45.65	45.65	
Üre	16.45	16.45	16.45	-	-	-	16.34	16.34	16.34	-	-	
Kalsiyum	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	
Fosfor	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	
Şeker	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.02	5.02	5.02	5.02	5.02	
Nişasta	17	17	17	17	17	17	16.03	16.03	16.03	16.03	16.03	
Korunmuş nişasta	7.09	7.09	7.09	7.09	7.09	7.09	8.05	8.05	8.05	8.05	8.05	
UFL	83.54	83.54	83.54	83.54	83.54	83.54	81.02	81.02	81.02	81.02	81.02	
UFV	79	79	79	79	79	79	76.12	76.12	76.12	76.12	76.12	
PDİN (g/kg KM)	147.35	147.35	147.35	147.35	147.35	147.35	132.7	132.7	132.7	132.7	132.7	
PDIE (g/kg KM)	120.96	120.96	120.96	120.96	120.96	120.96	101.2	101.2	101.2	101.2	101.2	
ME (kcal. kg ⁻¹ KM)	2550	2550	2550	2550	2550	2550	2500	2500	2500	2500	2500	

Vitamin büyükbaş A⁺ (0.6; 0.4 g/kg KM), mermer tozu (12; 8 g/kg KM), tuz (3; 2 g/kg KM), Niacin 200 (0.6; 0.4 g/kg KM), Novatan (0.6; 0 g/kg KM), Magnezyum oksit (0.6; 0.4 g/kg KM), Maya (0.6; 0.4 g/kg KM).

5.3.2. Rasyonların besin madde içeriklerinin belirlenmesi

Medicago sativa yaprakları 55°C'de 48 saat boyunca etüvde kurutulduktan sonra 1 mm incelikte öğütülmüştür. Kimyasal kompozisyonu belirlenen *Medicago sativa* yaprakları karma yem ile karıştırılarak rasyon elde edilmiştir. Daha önce açıklandığı gibi on iki farklı rasyon elde edilmiştir. Rasyonların KM (AOAC Uluslararası 2000; yöntem 985.26), HP (AOAC Uluslararası 2000; yöntem 990.03) ve HK (AOAC Uluslararası 2000; yöntem 942.05) analizleri yapılmıştır. ADF (AOAC, 2000; yöntem 7.074), NDF (AOAC, 2000; yöntem 2002.04), HS (AOAC,2000; yöntem 992.09) analizleri ise Van Soest vd. (1991) tarafından bildirildiği gibi ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

HY içeriği (AOAC, 2000; yöntem 2003.05) ANKOM XT15 (ANKOM Technology Corp. Fairport, NY, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Kutlu, 2008). OM, selüloz (SEL= NDF-(HSEL+ADL)), hemiselüloz (HSEL= NDF-ADF) ve lif olmayan karbonhidrat (LOK= 100-(HP+HK+ADF+HY)), NÖM (NÖM= OM-(HY+HP+HS)) içerikleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir).

5.3.3. Yemlerin *in vitro* gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesi

Yemlerin *in vitro* gerçek sindirilebilirliği (İVGS) rumen gelişimini tamamlamış ve yukarıda tanımlanmış olan rumen içeriği (3.2.2. Rumen sıvısı temini) kullanılarak Ankom DaisyII inkübatör D220 ile belirlenmiştir. Rumen sıvısı mezbahane hayvanlar kesilir kesilmez alınmış, taşınabilir karbondioksit tüpü ile beslenen 2 litrelik 39°C'de ısıtılmış bir erlen içine iki kat tülbentten, peynir süzgeci ile süzölmüş ve içerisine 2 avuç rumen katı içeriği ilave edilmiştir. Rumen sıvısı sıcaklığı muhafaza edilerek laboratuvara (içerisinde 39°C su bulunan iki adet termos içinde) taşınmıştır. Daisy inkübatörde 50 mm × 55 mm ebatlarında, polyester/polietilen karışımından yapılmış ve 25 µm den büyük partiküllerin geçemeyeceği porlardan oluşmuş azot içermeyen özel torbalar (Ankom F₅₇ torba) kullanılmıştır.

Her bir torbaya 1 mm' lik elekten geçirilmiş yem örneği tartılmış ve bütün rasyonlar 3 paralelli olarak test edilmiştir. Çalışmada kullanılan inkübatör 4 (3 kavanozda tampon çözeltisi, 1 kavanozda saf su bulunmaktadır) kavanozdan oluşmaktadır. Her 3 kavanoza 2 lt'lik inkübasyon sıvısı (1600 ml tampon solusyonu + 400ml rumen sıvısı) CO₂ tüpü eşliğinde ilave edilmiştir (Şekil 3.5'te açıklanmıştır).

Torbalar inkübatöre CO₂ tüpü eşliğinde atılmış ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolunca kavanozlardan çıkartılıp su ile temizlendikten sonra 5 dakika boyunca asetonda bekletilen torbalar havada kurutulduktan sonra 105°C'deki etüvde 3 saat tutulmuştur. Etüvden çıkartılan torbalar tartıldıktan sonra besin maddeleri analizleri AOAC (2000) de belirtilen yöntemlere göre yapılmış, kuru madde bazında İVGS'leri süzgeç torba tekniği (Van Soest et al., 1991) kullanılarak Ankom Daisy inkübatör'de belirlenmiştir.

Kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

A çözeltisi: 2 litrelik balon içerisinde 20g KH₂PO₄, 1g MgSO₄.7H₂O, 1g NaCl, 0.2g CaCl₂.2H₂O ve 1g üre saf su ile çözündürülmüştür.

B çözeltisi: 1 litrelik balon içerisinde 15g Na₂CO₃ ve 1g Na₂S.9H₂O saf su ile çözündürülmüştür.

Tampon çözeltilerin hazırlanması (Her bir silindir için): A ve B çözeltileri 39°C' ye kadar ısıtılmış; ayrı kaplarda bulunan B çözeltisinden 266 ml, 1330 ml A çözeltisi üzerine ilave edilmiştir.

A ve B çözeltilerin hazırlanması aşamasında çözelti pH'larının 39 °C'de 6.8 civarında olmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan yaklaşık 1600 ml çözelti (A + B çözeltileri) bir silindire ayrı ayrı koyulmuştur. Silindirler cihaza yerleştirilerek, ısıtma ile agitasyon düğmeleri aktif hale getirilmiş ve 20-30 dakika süresince tüm silindirlerin sıcaklığının eşit olması beklenmiştir. Bu bekleme süresinde rumen sıvısının toplanması ve rumen inokulumun hazırlanması sağlanmıştır.

Torbaların ve numunelerin hazırlanması: Çalışmada kullanılan F₅₇ filtre torbalarının daraları alındıktan (W₁) sonra 0.5 g numune (W₂) torbaya konulmuş ve torbaların ağzı sıcak mühürleme yardımıyla kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan torbalar kavanozlara eşit oranda olacak şekilde yerleştirilmiştir Her bir kavanoza bir adet boş F57 torbası (C₁'in belirlenmesi amacı ile) yerleştirildi. Daisy II inkübatöründe 48 saat bekletilen F57 torbaları kavanozlardan çıkarılıp yıkandıktan sonra 3-5 dakika aseton içinde bekletilmiştir ve daha sonra tamamen havada kuru hale getirilmiştir.

İnokulum ve inkübasyonun hazırlanması: Hazırlanan rumen inokulumundan 400 ml alınarak inkübatör kavanozlarına konulmuştur. Kavanozların her birine 30 saniye CO₂ gazı ilave edilip balon oluşumuna müsaade edilmeden kapağı kapatılmıştır. Cihaz iç sıcaklığı 48 saatlik inkübasyon süresince 39±0.5°C'de sabit tutulmuş ve elektrik kesilmesine karşı cihaza güç kaynağı bağlanmıştır. İnkübasyon

süresi tamamlandığında çıkartılan F₅₇ torbalarında NDF, ADF analizleri yapılmıştır. NDF analizinden sonra çıkan değer W₃ olarak kaydedilmiştir.

In vitro gerçek besin madde sindirilebilirliği (İVGS) aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$\%İVGS = 100 - \left[\frac{(W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100}{W_2} \right]$$

W₁: F57 torbalarının darası

W₂: Kuru örnekteki NDF miktarı

W₃: İnkübasyon sonunda torbada kalan atıktaki NDF miktarı

C₁: Kör ağırlığı (inkübasyondan çıkartılıp etüvde kurutulduktan sonraki boş torba ağırlığı/orijinal torba ağırlığı)

5.3.4. *In vitro* gaz üretim tekniğinin (Hohenheim) uygulanması

Toplam gaz üretiminin ölçülmesinde *in vitro* gaz üretim tekniği (Hohenheim) aşağıdaki detaylandırıldığı şekilde uygulanmıştır (Menke and Steingass, 1988). Yem örneği 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş, yaklaşık 250 mg havada kuru yem maddesi (200 mg KM) tartılarak enjektörün dibine yerleştirilmiş ve enjektörün pistonları gaz kaçışını engellemek amacıyla ilk 2-3 cm'lik kısmı hariç vazelinle yağlanmıştır. Örnek miktarının sınırlı tutulması toplam gaz üretiminin 90 ml'yi aşmayacak şekilde ayarlanmak istenmesiyle ilgili olup gaz üretiminin 90 ml'yi aştığı durumlarda ise biriken gaz (sıvı kısım hariç) dışarı atılmıştır ve bu değer hesaplamalarda dikkate alınmıştır (Şekil 3.6.'da gösterilmiştir).

Çalışmamızda kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Mikro mineral çözeltisi: 13.2g CaCl₂.2H₂O, 10.0 g MnCl₂.4H₂O, 1.0 g CoCl₂.6H₂O ve 8.0 g FeCl₃.6H₂O 100 ml saf suya tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisi: 4.0 g NH₄HCO₃ ve 35.0 g NaHCO₃ 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 8.1'e ayarlanmıştır.

Makro mineral çözeltisi: 5.7g Na₂HPO₄ susuz, 6.2 g KH₂PO₄ susuz ve 0.6 g MgSO₄.7H₂O 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanmış ve pH 6.8'e ayarlanmıştır.

Resazurin çözeltisi: 100 mg resazurin saf suda çözündürülerek, 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

İndirgeme çözeltisi: 1 Normal 4 ml NaOH, 625 mg Na₂S.9H₂O ve 95 ml saf su katılarak, her zaman taze olarak hazırlanmıştır.

Rumen sıvısı alınmadan hemen önce hazırlanan vasat (400 ml saf suya 0.1 ml mikromineral çözeltisi, 200 ml rumen tampon çözeltisi, 200 ml makromineral çözeltisi, 1.0 ml resazurin çözeltisi ve 40 ml indirgeme çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır) CO₂ gazı altında 39°C’ deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak tutulmuş, rumen sıvısı eklenmeden önce sıcaklığın 39°C olup, olmadığı kontrol edilerek, ortamın renginin maviden pembeye ve şeffafa dönüp dönmediği gözlenmiştir (Renk değişimi ortamın indirgenmiş olduğunu göstermektedir).

Yemlemeden hemen önce alınan rumen sıvısı CO₂ ile beslenen 39°C’ de ısıtılmış 2 litrelik bir erlen içine iki kat tülbentten süzölmüştür. Manyetik bir karıştırıcı üzerine oturtularak bir su banyosunda (39°C) tutulan bir şişede bir kısım rumen sıvısı iki kısım vasat ile karıştırılarak, sıvı içine bir tüp ile sürekli olarak karbondioksit gazı verilmiştir. Rumen sıvısı + vasat karışımından 30 ml bir otomatik pipet (dispenser) yardımıyla her biri daha evvel 39°C’ de etüvde tutulmuş olan enjektörlere çekilmiştir. Enjektör içindeki gaz kabarcıkları ortamdaki uzaklaştırılarak, silikon boru üzerindeki plastik kıskaçlar kapatılmış ve daha sonra enjektör içine alınan karışım miktarı (yaklaşık 30 ml) okunarak kaydedilmiştir.

Bütün enjektörlerin doldurulma işlemi yarım saati geçmeyecek şekilde tamamlanmış ve 39°C’ye ayarlı özel su banyosundaki enjektör desteklerine yerleştirilmiştir. İnkübasyonlar süresince okumalar 3, 6, 9, 12, 24, ve 48. saatlerde sıcaklık değişikliklerinin önüne geçebilmek amacı ile mümkün olduğu kadar hızlı yapılmıştır. Her okumadan sonra enjektörler enjektörün yan yüzeylerine yapışmış yem örneğinin tekrar rumen sıvısı içine alınması amacıyla hafifçe dört kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Gaz üretim (GÜ) miktarları aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{GÜ (ml/200mg KM, 24 saat)} = \frac{\frac{F_k + F_c}{2} (V_{24} - V_0 - GÜ_0) \times 200}{\text{ÖA}}$$

- V₀: İnkübasyon başlangıcında pistonun pozisyonu
V₂₄: 24 saatlik inkübasyondan sonra pistonun pozisyonu
GÜ₀: Örnek içermeyen rumen sıvısının 24 saatlik inkübasyonda ürettiği ortalama gaz miktarı.
ÖA: Enjektöre konulan örneğin ağırlığı (mg KM)

Gaz üretim parametreleri, NEWAY adlı PC paket program yardımıyla Ørskov and McDonald (1979)'ın bildirdiği aşağıdaki modele göre hesaplanmıştır.

$$Y = a + b(1 - e^{-ct})$$

- a: Hemen çözünebilir fraksiyondan oluşan gaz miktarı (ml)
b: Zamana bağlı oluşan gaz miktarı (ml)
c: Gaz üretim hızı
a+b: Potansiyel gaz üretimi (ml)
t: İnkübasyon süresi (saat)
y: t zamandaki gaz üretimi

Gaz üretimi sonucu elde edilen 24 saatlik gaz ölçüm değerleri ve örneklerin besin madde içerikleri kullanılarak örneğin metabolize edebilir enerji (ME) miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke et al., 1979).

$$ME(MJ/kg KM) = 1.06 + 0.1578GÜ + 0.084HP + 0.22HY + 0.081HK$$

GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM)

%İVOMS, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Menke and Steingass, 1988).

$$\%İVOMS = 0.45HP + 0.651HK + 14.88 + 0.889GÜ$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%)

Net Enerji Laktasyon (NE_L) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır(Schöner, 1981).

$$NE_L (MJ/kg KM) = 0.075GÜ + 0.087HP + 0.161HY + 0.056NÖM - 2.422$$

Burada GÜ: 24. Saatteki gaz üretim miktarı (ml/ 200 mg KM), HP: Ham protein (%), HK: Ham kül (%), HY: Ham yağ (%), NÖM: Azotsuz öz madde.

SOM aşağıdaki formülle hesaplanmıştır(Menke and Steingass, 1988)

$$SOM(g/kg KM) = 0.9991GÜ + 0.595HP + 0.181HK + 9$$

MPS aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (AFRC, 1993).

$$\text{MPS}(\text{mg/ml}) = \text{SOM} \times 0.032$$

KZYA aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Makkar, 2005).

$$\text{KZYA}(\text{mmol/l}) = 0.022\text{GÜ} - 0.00425$$

5.3.5. Denemede kullanılan rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesi

Denemede kullanılacak rasyonlarda CH₄ üretiminin belirlenmesinde infrared metan analizörü (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany model) kullanılmıştır (Goel et al., 2008). CH₄ miktarının belirlenmesi, *in vitro* gaz üretiminde 24 saatlik inkübasyon sonrasında yapılmış olup, 24 saat sonra enjektörlerde biriken gaz özel bir boru vasıtasıyla (plastik enjektörler kullanılarak) metan analizörüne alınmış ve CH₄ üretimi (ml) toplam gazın yüzdesi olarak belirlenmiştir (şekil 3.7.'de gösterilmiştir).

$$\text{CH}_4 \text{ üretimi (ml)} = \text{Toplam gaz üretimi (ml)} \times \% \text{CH}_4$$

5.3.6. Rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılacak rumen sıvısında NH₃ miktarının belirlenmesi amacı ile 48 saat *in vitro* gaz üretiminden sonra enjektörlerden alınan 5 ml rumen sıvısında ham protein analizinde olduğu gibi bir damıtma işlemi uygulanmıştır Daha sonra gerçekteştirilen titrasyon işleminde harcanan HCl (0.1) hacmi not belirlenerek alta verilen formülle NH₃ miktarı belirlenmiştir (şekil 3.8.'de gösterilmiştir).

$$\text{NH}_3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \text{ rumen sıvısı} \right) = 0.1 \times 14 \times 1.22(A - B) \times 20$$

A: Örnek için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

B: şahit için titrasyonda harcanan HCl titrasyon çözeltisi hacmi, ml

0.1: HCl titrasyon çözeltisinin normalitesi

14: Azotun mol ağırlığı

5.3.7. Rumen sıvısında pH ve rumen uçucu yağ asitleri (UYA) analizi

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısında UYA içeriğinin belirlenmesi amacı ile inkübasyon öncesinde 2 adet wheaton şişesine 5 ml rumen sıvısı alınmış ve 4 damla H₂SO₄ ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan rumen sıvıları analizler yapılıncaya kadar oda ısısında muhafazaya devam edilmiştir. 48. saatteki alınan rumen sıvısı da aynı işleme tabi tutulmuştur. Denemede kullanılan rumen sıvısının pH'ı laboratuvara getirilir getirilmez dijital pH metre (HANNA INSTRUMENTS 1332 model pH metre)

ile belirlenmiştir. Rumen sıvısı UYA Wiedmeier et al. (1987)'nin bildirdikleri yöntemine göre Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı laboratuvarlarında analiz edilmiştir.

Rumen sıvısı uçucu yağ asitleri (asetik, bütirik, propiyonik, valerik, izovalerik ve izobütirik asit) analizi için rumen sıvısı 3000 devir/dakika santrifüj edilmiş ve üstte biriken kısımdan 10 ml alınmış ve üzerine 1.0 ml %25'lik fosforik asit ilave edilmiştir. Daha sonra gaz kromatografi cihazında okunması için 14000 devir/dakika santrifüj edilmiş ve örnekten 1.5 ml alınarak Agilent 6890N marka Gaz Kromatografi cihazına enjekte edilerek (Agilent Technologies 6890N gaz kromatografisi, Stabilwax-DA, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um df. Max. temp: 260°C. Cat. 11023) rumen sıvısı UYA içeriği saptanmıştır.

5.3.8. Protozoa sayımın belirlenmesi

Çalışmamızda, protozoa sayımı için 48 saatlik inkübasyon sonucunda enjektörden alınan 1 ml rumen sıvısına protozoaların boyanması amacı ile 1 ml MFS (1000 ml için 0.6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml (% 37) formaldehit ve 900 ml saf su) eklenmiştir (Hazırlanan MFS çözeltisi karanlık ortamda muhafaza edilmiştir). Hazırlanan bu karışım analiz zamanına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra, bu karışımdan alınan ve çalkalanan örnekler (Şekil 3.8 ve 3.9) Fuchs-Rosenthal lamına (16x 16 kareli. 0.0625 mm~ alanlı. 0.200 mm derinlikte) konulmuş ve mikroskop altında sayım yapılmıştır. Hesaplama altta verilen formülle yapılmıştır.

$$\text{cm}^3 \text{ (ml)'deki hücre sayısı} = 1000 \times \frac{\text{Sayılan hücre sayısı}}{\text{Sayılan toplam kare} \times \text{Sulandırma} \times \text{Hacim}}$$

5.3.9. Rasyonların kuru madde tüketimi ve kuru madde sindirilebilirliği

Rasyonların sindirilebilirliklerin belirlenmesinde kuru madde tüketimi ve kuru madde hesaplanmıştır.

$$\text{KMT}(\%CA) = \frac{120}{\%NDF}$$

KMT: Kuru madde tüketimi (%CA)

$$\text{KMS} = 88.9 - (0.779 \times \%ADF)$$

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği

5.4. İstatistiksel analiz

Araştırma sonucunda elde edilen veriler (besin maddeleri içeriği, *in vitro* gaz üretimi, *in vitro* sindirilebilirlik, vb.) gerekli varsayımlar (normallik ve varyansların homojenliği gibi) kontrol edildikten sonra 2 x 2 x 3 tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme tertibine göre istatistik analize tabi tutulmuştur. Denemenin matematik modeli,

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \lambda_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\beta\lambda)_{jk} + (\alpha\lambda)_{ik} + (\alpha\beta\lambda)_{ijk} + e_{ijkl}$$

olup, eşitlikte;

Y_{ijkl} : i-inci uygulamaya tabi tutulan j-inci yem çeşidindeki k-inci örneğe ait gözlem değerini (gaz üretimi, vb).

μ : populasyon ortalamasını.

α_i : i-inci rasyonun etkisi.

β_j : j-inci katkı maddesinin etkisi.

λ_k : k-inci yağ katkısının etkisi.

$(\alpha\beta)_{ij}$: i-inci rasyon ile j-inci katkı maddesinin interaksyonunun etkisi.

$(\beta\lambda)_{jk}$: j-inci katkı maddesi ile k-inci yağ çeşidinin interaksyonunun etkisi.

$(\alpha\lambda)_{ik}$: i-inci rasyon ile k-inci yağ çeşidinin interaksyonunun etkisi.

$(\alpha\beta\lambda)_{ijk}$: i-inci rasyon j-inci katkı maddesi ile k-inci yağ çeşidinin interaksyonunun etkisi.

e_{ijkl} : tesadüfi hatayı göstermektedir.

Uygulamalar veya yem çeşitleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olması durumunda ortalamalarının karşılaştırılması için Duncan Çoklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisanslı SPSS 22.0 istatistiksel paket programından faydalanılmıştır.

5.5. Sonuçlar ve Tartışma

5.5.1. Rasyonların besin maddeleri içeriği

Mevcut çalışmada erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonların kimyasal kompozisyonları Tablo 5.3.'de gösterilmiştir. Çalışmamızda, 2 farklı yağ kaynağı (Fındık ve soya) kullanılmıştır. Çalışmamızda izonitrojenik rasyonlar kullanılmıştır (Rasyonların protein içeriklerinin dengelenmesi amacı ile kontrol

grubunda üre kullanılmıştır). Bazı araştırmacılar, yonca bitkisinin kendi yem değerinin yüksek olması yanında, rasyonda yer alan diğer yem kaynaklarındaki besin maddelerinin sindirim ve emilim derecelerini de olumlu yönde etkilemek suretiyle ruminant hayvanların verim düzeylerinde artışa yol açtığını bildirmiştir (Brandt ve Klopfenstein, 1986a; b; Hunt et al., 1985; Leng 1990; Ørskov et al., 1999; Paterson et al., 1982).

Öte yandan bazı çalışmalarda yonca bitkisinde lifli maddeler içeriğinin düşük (% 28-30) olduğu bildirilmiştir (Kantha Raju et al., 2018; Koukoura et al., 2009; Kuchenmeister et al., 2013; Muir et al., 2003). Mevcut çalışmada kullanılan rasyonların her iki laktasyon döneminde de düşük lifli maddeler içeriğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, mevcut çalışmada her 2 laktasyon döneminde kullanılan rasyonların besin maddeleri içeriklerinin bazı çalışmalarla (Alvarez-Hess et al., 2019; Benchaar et al., 2015; Ghamkhar et al., 2018; Mamvura et al., 2014; Sharifi et al., 2018; Villar et al., 2019; Zhao et al., 2015) uyumlu olduğu bulunmuştur.

Tablo 5.3. Nitrat ve yağ (fındık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının besin maddeleri içerikleri

Besin maddesi	Erken laktasyon dönemi						Orta laktasyon dönemi					
	4MS6KY						6MS4KY					
	Kontrol			NaNO ₃			Kontrol			NaNO ₃		
	Yağsız	SY	FY	Yağsız	SY	FY	Yağsız	SY	FY	Yağsız	SY	FY
HK	6.21	6.33	6.62	6.20	6.85	6.90	8.81	9.05	9.65	8.91	9.54	9.75
NDF	33.27	33.80	33.27	33.90	33.99	33.90	34.25	34.74	34.88	34.52	34.88	34.78
ADF	20.18	20.94	20.33	20.35	20.57	20.77	21.00	21.75	21.29	21.70	21.81	21.60
HY	3.70	8.27	8.85	3.60	9.41	9.35	3.47	9.26	9.52	3.68	9.23	9.45
HP	23.55	24.20	24.05	23.50	24.32	24.03	23.75	24.10	24.01	23.67	24.46	24.54
HS	24.85	23.12	23.00	24.60	23.12	23.63	24.32	22.38	22.46	24.10	21.86	21.33
ADL	7.63	7.90	8.10	7.55	7.79	7.74	8.95	8.25	8.50	9.02	8.60	8.75
Hemiselüloz	13.09	12.86	12.94	13.55	13.42	13.13	13.25	12.99	13.59	12.82	13.07	13.18
Selüloz	12.56	13.04	12.23	12.80	12.78	13.03	12.05	13.50	12.79	12.68	13.21	12.85
OM	84.23	84.00	83.77	84.50	83.80	83.56	83.96	83.90	83.36	83.05	82.96	82.68
NÖM	32.13	28.41	27.90	32.80	26.95	26.55	32.42	28.06	27.37	31.60	27.41	27.30
LOK	46.36	40.26	40.70	46.35	38.85	38.95	42.97	35.84	35.53	42.04	34.96	34.66
Kondanse tanen	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
Saponin	4.28	4.28	4.28	4.28	4.28	4.28	6.42	6.42	6.42	6.42	6.42	6.42

HK (%KM), NDF (%KM), ADF (%KM), HY (%KM), HP (%KM), HS (%KM), ADL (%KM), Hemiselüloz (%KM), Selüloz (%KM), OM (%KM), NÖM (%KM), LOK (%KM), Kondanse tanen (g/kg KM), Saponin (g/kg KM)

5.5.2. Erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarına nitrat ve iki farklı yağlar (Fındık ve soya) ilavesinin *in vitro* gaz üretimini (İVGÜ)

Mevcut çalışmada, erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarına nitrat ve iki farklı yağ (fındık ve soya) ilavesinin İVGÜ'nün önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir ($p=0.002$) (Tablo 5.4.). Mevcut çalışmada kırksekiz saatlik fermantasyon sonunda, erken ve orta laktasyonda kontrol gruplarının yüksek İVGÜ'ne sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Bununla birlikte, erken laktasyon dönemi rasyonları daha yüksek İVGÜ değerlerine sahip olmuştur ($p<0.001$). Ayrıca, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi, laktasyon dönemi x yağ, yem katkı maddesi x yağ ve laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ interaksiyonları önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

Her iki laktasyon döneminde en düşük İVGÜ değerleri SY + nitrat ve FY + nitrat ilaveli rasyonlar için belirlenmiştir ($p<0.001$). Mevcut çalışmada ÇDYA içeriği yüksek olan SY ilaveli rasyonların İVGÜ değerinde daha yüksek oranda düşmeye yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Bu sonuç Patra and Yu (2015) ve Wang et al. (2014)'in bulguları ile uyum göstermektedir. Patra and Yu (2015) rasyona sarmısak yağı (oleik asit gibi TDYA bakımından zengin) + nitrat ilave edildiğinde rumen ortamında H konsantrasyonunun düşüşüne bağlı olarak İVGÜ'nün azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı şekilde bazı araştırmalarda keten tohumu yağı (Linoleik asit gibi ÇDYA bakımından zengin) + nitrat ilavesinin İVGÜ değerlerini azalttığı belirlenmiştir (Benchaar et al., 2015; Guyader et al., 2016; Veneman et al., 2015).

Rumende besin maddelerinin fermantasyonu sonucunda açığa çıkan H iyonları rumende birikmekte ve bir şekilde uzaklaştırılmaması durumunda rumende ruminal İVGÜ'de artışa yol açmaktadır (Martin et al., 2010). Mevcut çalışmada, kullanılan yağların biyohidrojenizasyonu ve nitratın etkisi ile İVGÜ'nün azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). Aynı şekilde, bazı araştırmacılar, rasyona yağ (TDYA veya ÇDYA) ilave edilmesi ile İVGÜ'nün azaldığını tespit etmiştir (Alvarez-Hess et al., 2019; Benchaar et al., 2015; Duthie et al., 2017; Roy et al., 2017). Mevcut çalışmada yağ x nitrat interaksiyonunun İVGÜ'yü etkilediği bulunmuştur ($p=0.038$). Ancak bu interaksiyonun etkisi, yağ çeşidine (TDYA veya ÇDYA) bağlı olarak değişmektedir.

Tablo 5.4. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sıgırı rasyonlarının *in vitro* gaz üretimi üzerindeki etkisi

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	Yağ	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat	
Erken (4MS6KY)	Kontrol	Yağsız	22.84 ^a	32.01 ^a	43.84 ^a	47.19 ^a	52.40 ^a	63.54 ^a	
		SY	19.81 ^c	23.29 ^d	30.29 ^c	35.83 ^d	48.90 ^b	51.42 ^d	
		FY	20.84 ^b	25.83 ^{bc}	38.29 ^b	38.35 ^c	51.59 ^a	54.45 ^c	
	NaNO ₃	Yağsız	19.35 ^c	27.60 ^b	37.79 ^b	43.96 ^b	49.54 ^b	59.22 ^b	
		SY	15.65 ^d	16.92 ^g	24.93 ^{de}	31.22 ^e	37.17 ^g	41.74 ^f	
		FY	17.66 ^{cd}	21.12 ^{cd}	29.71 ^c	35.61 ^d	41.21 ^{ef}	47.08 ^e	
	Kontrol	Yağsız	17.34 ^{ef}	25.65 ^c	31.87 ^c	39.27 ^b	53.19 ^a	56.63 ^b	
		SY	13.89 ^e	19.12 ^f	24.11 ^e	27.53 ^f	39.45 ^f	49.41 ^d	
		FY	15.52 ^{fg}	23.40 ^d	26.90 ^d	32.75 ^e	45.89 ^c	54.69 ^c	
	Orta (6MS4KY)	NaNO ₃	Yağsız	15.76 ^{cd}	21.17 ^e	26.87 ^d	36.94 ^c	44.36 ^{cd}	51.32 ^c
			SY	10.80 ^h	14.56 ^h	20.10 ^f	24.37 ^g	34.53 ^h	45.30 ^e
			FY	13.09 ^e	17.66 ^{fg}	23.70 ^e	28.09 ^e	35.00 ^{de}	49.80 ^d
Laktasyon dönemi (LD)									
Erken			19.36	24.46	34.14	38.69	46.80	52.91	
Orta			14.40	20.26	25.59	31.49	43.35	51.19	
Yem katkı maddesi (YKM)									
Kontrol			18.37	24.88	32.55	37.32	48.57	55.02	
NaNO ₃			15.39	19.84	27.19	33.37	41.58	49.07	
Yağ									
Yağsız			17.61	26.61	35.09	43.09	49.87	57.67	
SY			15.04	18.47	24.86	29.99	40.01	46.97	
FY			11.57	22.75	29.65	34.70	45.35	51.50	
O.S.H			0.573	0.713	1.000	0.934	0.882	0.897	
Ana etkiler									
LD			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
YKM			0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Yağ			0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
LD × YKM			0.001	0.031	0.002	0.026	<0.001	0.002	
LD × Yağ			0.043	0.002	<0.001	0.030	<0.001	<0.001	
YKM × Yağ			0.002	0.016	0.004	0.014	0.022	0.038	
LD × YKM × Yağ			0.017	0.004	0.011	0.036	<0.001	0.002	

a. b. c... Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.
O.S.H: Ortalamamın standart hatası

Mevcut çalışmada SY x nitrat interaksyonunun (FY x nitrat interaksyonunun etkisine kıyasla) İVGÜ'yü daha yüksek düzeyde etkilediği saptanmıştır. Bu çalışmada, erken laktasyon rasyonları orta laktasyon rasyonlarına kıyasla yüksek İVGÜ değerine sahip olmuşlardır. Mevcut sonuçlar bazı çalışmaların bulguları (Grainger ve Beauchemin, 2011; McGinn ve Beauchemin, 2015) ile uyum göstermektedir.

Gatachew vd. (2001) rasyona yağ ilavesinin İVGÜ'yü etkilediğini bulmuştur. Mevcut çalışmada nitrat ilaveli rasyonlarda İVGÜ'nün azaldığı tespit edilmiştir. Bulunan sonuçların yapılan farklı çalışmalarla uyumlu olduğu saptanmıştır (Adejoro et al., 2020; Patra and Yu, 2014; Shi et al., 2012; Zhou et al., 2012).

Ayrıca, bu çalışmada yağlar ve nitrat ilavesi ile (erken laktasyon ve orta laktasyon) saptanan en düşük İVGÜ değerleri bazı çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Alvarez-Hess et al., 2019; Benchaar et al., 2015; Duthie et al., 2017; Grainger et al., 2011; Guyader et al., 2016; Lee et al., 2017; Livingstone et al., 2015; Roy et al., 2017; Yang et al., 2016). Diğer araştırmalara göre, düşük İVGÜ değerleri, rasyonun kondanse tanen, HP ve lif maddelerinin içeriklerine bağlı olduğu tespit edilmiştir (Gemed and Hassen, 2015; Giridhar et al., 2018; Hatew et al., 2016; Huyen et al., 2016; Kamalak vd., 2005; Singh et al., 2015).

5.5.3. Nitrat ve yağlar (fındık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonunun İVGÜ parametreleri (c, a+b), CH₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME, NE_L değerleri üzerindeki etkisi

Mevcut çalışmada elde edilen İVGÜ parametreleri (c, a+b), CH₄ üretimleri, İVOMS, SOM, ME ve NE_L içerikleri Tablo 5.5.'te verilmiştir. İVGÜ parametreleri arasında yer alan ve GÜ hızını ifade eden "c" parametresinin laktasyon dönemi, yem katkı maddesi ve yağ ilavesi ile laktasyon dönemi x yağ, Yem katkı maddesi x yağ ve laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ interaksyonları tarafından etkilenmediği (p>0.05), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu tarafından ise etkilendiği bulunmuştur (p<0.05).

Erken ve orta laktasyon dönemleri için belirlenen "c" parametresinin (sırasıyla 0.11 ml/saat ve 0.12 ml/saat) benzer olduğu görülmektedir (p>0.05). Çalışmamızda elde edilen 'c' değerleri, bazı çalışmalarla (Brask et al., 2015; Castillo-lopez et al., 2017; Sharifi et al., 2018; Villar et al., 2019) uyumlu bulunmuştur.

Tablo 5.5. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının İVGÜ parametreleri (c ve a+b), CH₄ üretimi, İVOMS, SOM, ME ve NE_L değerleri üzerindeki etkisi.

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	Yağ	c	a+b	CH ₄	ME	NE _L	SOM	İVOMS
Erken (4MS6KY)	Kontrol	Yağsız	0.08	63.74	13.29 ^a	12.61 ^d	6.09 ^{cd}	77.93 ^a	77.18 ^b
		SY	0.11	54.51	11.05 ^c	13.40 ^b	6.45 ^b	75.24 ^b	74.76 ^c
		FY	0.13	58.90	12.34 ^b	13.86 ^a	6.66 ^a	77.23 ^a	76.69 ^b
	NaNO ₃	Yağsız	0.12	54.70	11.94 ^b	11.08 ^g	5.76 ^{fg}	74.76 ^{bc}	74.34 ^c
		SY	0.14	46.78	7.18 ^g	12.12 ^e	5.65 ^g	64.90 ^g	66.53 ^f
		FY	0.13	50.50	8.62 ^e	12.59 ^d	5.89 ^{ef}	67.85 ^f	69.31 ^e
	Kontrol	Yağsız	0.11	59.38	12.27 ^b	11.78 ^f	4.75 ⁱ	78.54 ^a	78.99 ^a
		SY	0.18	50.94	7.29 ^g	12.70 ^d	5.36 ^h	66.93 ^f	68.93 ^e
		FY	0.10	55.97	9.15 ^e	13.04 ^c	5.94 ^{de}	72.95 ^{cd}	74.43 ^c
Orta (6MS4KY)	NaNO ₃	Yağsız	0.12	54.73	9.82 ^d	11.82 ^{ef}	4.36 ⁱ	71.91 ^{de}	73.41 ^{cd}
		SY	0.09	46.48	7.35 ^f	12.47 ^e	5.74 ^{fg}	62.22 ^h	64.51 ^g
		FY	0.10	51.80	8.68 ^e	13.48 ^b	6.22 ^c	70.10 ^e	71.85 ^d
Laktasyon dönemi (LD)									
Erken			0.11	54.86	12.44	12.61	6.09	72.98	73.14
Orta			0.12	53.22	9.09	12.55	5.73	70.44	72.02
Yem katkı maddesi (YKM)									
Kontrol			0.12	56.04	9.57	12.90	6.04	74.80	75.16
NaNO ₃			0.11	53.88	8.62	12.26	5.77	68.62	69.99
Yağ									
Yağsız			0.11	56.36	11.83	11.82	5.74	75.79	75.98
SY			0.13	52.69	8.22	12.42	5.80	67.32	68.68
FY			0.11	55.83	9.70	13.24	6.18	72.03	73.07
O.S.H			0.005	0.948	0.306	0.113	0.066	0.882	0.733
Ana etkiler									
LD			0.865	0.613	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
YKM			0.833	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Yağ			0.217	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM			0.039	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LD × Yağ			0.277	0.084	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001
YKM × Yağ			0.065	0.035	0.015	0.011	0.035	0.025	0.025
LD × YKM × Yağ			0.081	0.901	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a. b. c... Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

c (ml/saat), a+b (ml), CH₄ (ml), ME (MJ/kg KM), NE_L (MJ/kg KM), SOM (g/Kg KM), İVOMS (%)

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Toplam gaz üretim miktarını ifade eden “a+b” parametresi yem katkı maddesi (p=0.003), yağ ilavesi (p=0.002), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu (p<0.001), yem katkı maddesi x yağ ilavesi interaksyonu (p=0.035) tarafından etkilenmiştir. Ancak, laktasyon dönemi (p=0.613), laktasyon dönemi x yağ interaksyonu (p=0.084), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ interaksyonu (p=0.901) “a+b” parametresini etkilemediği belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada, “a+b” parametresi erken laktasyon dönemi rasyonları rakamsal olarak yüksek bulunmuş olup bu bulgu erken laktasyon dönemi rasyonlarının sindirilebilirlik dereceleri yüksek olan konsantre yemlerce zengin (%60) olması ile ilişkilendirilebilir. Ancak çalışmamızda, her iki laktasyon döneminde kontrol gruplarında bulunan yüksek “a+b” parametresi kontrol gruplarında bulunan üre varlığıyla açıklanabilir. Her iki laktasyon döneminde nitrat + yağ (SYve FY) ilaveli rasyonların “a+b” parametresini düşürdüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte her iki laktasyon döneminde nitrat + SY ilaveli rasyonlarda “a+b” parametresi düşük bulunmuştur. Bu sonuç SY’da bulunan yüksek ÇDYA içeriği ve nitrat etkisi ile açıklanabilir. Rumende yüksek oranda bulunan SY ve nitrat ortamdaki H iyonlarını biyohidrojenizasyon (yağlar) ve indirgenme ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) olaylarında kullanarak İVGÜ’ni düşürücü yönde etki yapmaktadır. (Guyader et al., 2015; Olijhoek et al., 2016).

Mevcut çalışmada, laktasyon dönemi (p<0.001), yem katkı maddesi (p<0.001), yağ ilavesi (p<0.001), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi interaksyonu (p<0.001), yem katkı maddesi x yağ ilavesi interaksyonu (p=0.015), laktasyon dönemi x yağ ilavesi interaksyonu (p<0.001), ve laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ ilavesi interaksyonunun (p<0.001) CH₄ üretimini etkilediği tespit edilmiştir. Erken laktasyon döneminde CH₄ üretimi orta laktasyon dönemine göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonlarda kaba yem kaynağı olarak kullanılan yonca bitkisinde yüksek miktarda bulunan sekonder metabolit (saponin, KT varlığı) varlığı ile ilişkilendirebilir (Kozłowska et al., 2020). Castro-Montoya et al. (2012) saponin içeriği yüksek quillaja bitkisinin kaba yem kaynağı olarak kullanıldığı rasyonların yüksek konsantre yem oranına sahip olan rasyonlara kıyasla CH₄ üretimini azalttığını tespit etmiştir. Aynı şekilde, bazı çalışmalarda saponinin CH₄ üretimini azalttığı belirlenmiştir (Chen et al., 2019; Jayanegara et al., 2014; Morgavi et al., 2012).

Bazı çalışmalarda yonca kuru otunun çok düşük düzeylerde de olsa sahip olduğu KT varlığının (<0.001), CH₄ üretiminde düşüşe yol açtığı saptanırken (Kume, 2002; Tavendale et al., 2005), diğer çalışmalarda CH₄ üretimindeki azalma yonca bitkisinin düşük NDF ve yüksek HP içeriği yanında sekonder metabolit varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Cheok et al., 2014; Rira et al., 2015; Szumacher-Strabel et al., 2019). Diğer bazı çalışmalarda sığırlarda rasyon tipi (kaba yem/ karma yem oranı) ve CH₄ indirgeyici ajanlar (nitrat gibi) arasında benzer etkileşimler bulunmuştur (Alvarez-Hess et al., 2019). Erken laktasyon döneminde (orta laktasyon dönemine kıyasla) bulunan yüksek CH₄ üretimi bazı çalışmalar ile uyum içerisindedir (Hristov et al., 2015; 2017; Moate et al., 2017; 2019). Aynı araştırmalarda yüksek verimli süt ineklerinde CH₄ üretiminin yüksek olduğu bulunmuştur. CH₄ üretiminin rasyondaki nişasta oranı ve sindirimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Alvarez-Hess et al., 2019; Herrera-Saldana et al., 1990; McAllister et al., 1996). Bazı araştırmalarda ise düşük CH₄ üretimini çalışmada kullanılan rasyondaki düşük NDF içeriği ile ilişkilendirilmiştir (Beauchemin and McGinn, 2005; Ellis et al., 2007; Moate et al., 2017). Bu sonuç mevcut çalışma ile uyum görülmüştür.

Mevcut çalışmada her iki laktasyon döneminde, nitrat + yağ ilaveli rasyonların CH₄ üretimini azalttığı bulunmuştur ($p<0.001$). Bazı araştırmacılar, rasyonlarda TDYA veya ÇDYA bakımından zengin yağların ve nitrat kullanımının rumende CH₄ üretiminin düşürülmesinde etkili bir yöntem olduğunu bildirirken (Hristov et al., 2013; Lee and Beauchemin, 2014; Leng and Preston, 2010; Patra, 2014; Yang et al., 2016), diğer yandan, rasyona nitrat ilave edilmesi durumunda CH₄ üretiminin nitrat ve nitrit indirgeyici mikroorganizmalar önemli ölçüde düşürüldüğü saptanmıştır (Guo et al., 2009). Nitrat bir hidrojen alıcısıdır (Yang et al., 2016). Nitratın CH₄ üretimi üzerinde belirgin inhibitör etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (El-Zaiat et al., 2014; Olijhoek et al., 2016; Patra and Yu 2014; Zhou et al., 2012).

Nitratın nitrite ve daha sonra amonyağa indirgenmesi, rumende CO₂ molekülünün CH₄ bileşiğine dönüşmesi için gerekli olan H iyonu konsantrasyonunu düşürmekte ve böylece CH₄ üretimi düşmektedir (Liu et al., 2017; Patra and Yu, 2014; van Zijderveld et al., 2010; Zhao et al., 2018; Zhou et al., 2012). Ayrıca, nitritin metanojenler üzerine toksik etkisi olduğu tespit edilmiş olup (Božic et al., 2009; Zhou et al., 2011) bu sonuç mevcut çalışmaların sonuçları ile doğrulanmaktadır.

Pal et al. (2014), nitratin CH₄ üretimi üzerindeki azaltıcı etkisinin kaba/kesif yem oranı yüksek olan rasyonlarda daha fazla kendisini gösterdiğini bildiren Pal et al. (2014)'nin bulguları çalışmamızla uyum içerisindedir. Çalışmamızda kaba yem/karma yem oranı düşük olan erken dönem laktasyon döneminde CH₄ üretimindeki yüksek oranı (12.44 ml), orta laktasyon dönemine göre (9.09 ml) daha yüksektir (Tablo 5.5.). Bu sonuç orta laktasyon döneminde saponin oranının artması ve onun etkisi ile ilişkilendirilebilir.

Mevcut çalışmada, kullanılan yağlar ÇDYA (SY) ve TDYA'ca (FY) zengindir. Beklenildiği gibi, ÇDYA içeriği yüksek olan SY CH₄ üretimini FY'na göre daha yüksek düzeyde düşürmüştür. Bu bulgu yağların CH₄ üretimini azaltıcı etkilerinin doymamışlık derecelerindeki artışla paralellik gösterdiğini bildiren çalışmalarla uyum göstermektedir (Rodrigues et al., 2017; Vargas et al., 2017). Rumende CH₄ üretiminin azaltılmasında SY'nın düşürücü etkisi FY'na göre yüksek olması SY'da yüksek düzeyde bulunan α -linolenik asit (C_{18:3} cis-9, cis-12, cis-15) ve linoleik asitin (C_{18:2} cis-9, cis-12) varlığına bağlı olarak rumende gerçekleşen biyohidrojenizasyon olayı ile açıklanabilmektedir (Patra, 2013; Doreau et al., 2011). Aynı şekilde, ÇDYA içeriği yüksek olan keten tohumu yağının kullanıldığı çalışmalarda da CH₄ üretiminin düştüğü belirlenmiştir (Benchaar et al., 2015; Chung et al., 2011; Veneman et al., 2015).

Çalışmamızda her iki laktasyon döneminde SY'nın CH₄ üretimi üzerindeki düşürücü etkisinin FY'na göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olsa bile FY ve benzeri TDYA'larca zengin farklı yağların da CH₄ üretimini düşürme potansiyeli olduğu bilinmektedir. Nitekim çalışmamızda FY ilavesinin CH₄ üretimini düşürmüştür. Dong et al. (1997), FY, zeytinyağı ve kanola yağı gibi oleik asit (C_{18:1}) bakımından zengin yağ kaynaklarının CH₄ üretimini düşürdüğünü bildirmektedirler. Aynı şekilde, Beauchemin ve McGinn (2015), kanola yağının (%54 oleik asit, %22 linoleik asit ve %11 linolenik asit) rasyona eklenmesinin CH₄ emisyonunda düşüşe neden olduğunu bildirmiştir. Dohme et al. (2000), KM'nin %5.3'ü oranında rasyona ilave edilen kanola yağının toplam metan üretimini %20 oranında azalttığını gözlemlemiştir. Diğer bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir Freitas et al. (2018), TDYA içeriği bakımından zengin olan pequi yağının, selülitik bakteri popülasyonunu ve CH₄ üretimini (g/gün) %17.5 oranında düşürdüğünü bildirmiştir.

Benzer olarak, Nagaraja et al. (1997) pequi yağının yüksek palmitik ve oleik asitleri içeriği nedeniyle metan üretiminde bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Cieslak et al. (2006) ise koyun rasyonlarına %5 kolza yağı ilave edilmesi durumunda CH₄ üretiminin yaklaşık %14 oranında düştüğünü belirlemiştir. Bazı çalışmalarda, TDYA'ca zengin zeytin yağının rasyona ilave edilmesi durumunda rumende selülotik ve metanojenik bakteri popülasyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (Harvatine et al., 2006; Nur Atikah et al., 2018). Çalışmamızda, PS'nin yağ kullanımına bağlı olarak düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5.6.). Dolayısıyla, yağ kullanımına bağlı olarak CH₄ üretiminde ortaya çıkan düşme PS'daki düşme ile ilişkilendirilebilir. Her 2 laktasyon döneminde de, yağ + nitrat kullanımının CH₄ üretiminde yağ ve nitratın ayrı ayrı kullanımlarına kıyasla daha yüksek oranda düşmeye yol açtığı belirlenmiştir. Bu sonuç daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Duthie et al., 2017; Klop et al., 2016; Patra and Yu, 2015; Villar et al., 2019). Aynı şekilde, Guayader et al. (2015) ve Veneman et al. (2015) rasyona nitrat ve keten tohumu yağı (ÇDYA içeriği yüksek) ilave edildiğinde CH₄ üretiminin düşürdüğünü bildirmiştir.

Mevcut çalışmada laktasyon dönemi, yem katkı maddesi, yağ ilavesi, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi, laktasyon dönemi x yağ ilavesi, yem katkı maddesi x yağ ilavesi, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ etkileşimlerinin İVOMS ve SOM değerlerini etkilediği belirlenmiştir (p<0.001) (Tablo 5.5.).

Bu çalışmada, erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonlar için belirlenen İVOMS ve SOM değerlerinin orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonlara kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur. Laktasyon dönemleri arasında gözlenen bu farklılık kullanılan rasyonlardaki kaba/kesif yem oranındaki farklılıkla açıklanabilir. Gerçekten de erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonda kaba/kesif yem oranı orta laktasyon dönemi rasyona göre düşüktür. Bu bulgu, rasyonda kesif yem oranının artışına bağlı olarak İVOMS ve SOM değerlerin de artış olduğunu bildiren çalışmalarla uyum içerisindedir. (Ba et al., 2008; Dung et al., 2014).

Her iki laktasyon döneminde de nitrat ilavesinin rasyonların İVOMS ve SOM değerlerini düşürdüğü belirlenmiştir (p<0.001). Kontrol gruplarında yüksek İVOMS ve SOM değerlerinin tespiti üre (kontrol) ilavesi ile açıklanabilir. Gerçekten de bazı araştırmalarda üre ilavesinin İVOMS ve SOM değerleri üzerine pozitif etkisi olduğu bildirilmiştir (Adejoro et al., 2019; Burque et al., 2008; Emmanuel et al., 2015; Gunun

et al., 2013; Kertz, 2010; Tan et al., 2011; Wanapat et al., 2016). Nitrat ilaveli rasyonlar için belirlenen düşük İVOMS ve SOM değerleri nitratın rumende indirgenme ürünü olan nitritin mikroorganizmalar üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklanabilir (Hristov et al., 2013; van Zijderveld et al., 2010). Nitratın nitrite indirgenme mekanizmasının hızının nitritin amonyağa indirgenme mekanizmasındaki hıza göre yüksek olması durumunda rumen ortamında biriken nitrit besin maddelerinin sindiriminden sorumlu olan mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sahiptir (Callaghan et al., 2014; Parkinson et al., 2010; Velazo et al., 2014).

Her iki (erken ve orta) laktasyon döneminde de SY ve FY katkılı rasyonların İVOMS ve SOM değerlerini düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0.001$). Yağ kaynakları kendi aralarında karşılaştırıldığında SY'nın söz konusu sindirilebilirlik parametrelerinin tümünü daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiş olup bu bulgu diğer bazı çalışmalarla uyum içerisindedir (Maia et al., 2012; Loor et al., 2002). Sindirilebilirlik parametrelerinde kullanılan yağ kaynağına bağlı olarak gözlenen düşme oranındaki farklılık söz konusu yağ kaynaklarının yağ asiti profiliyle açıklanabilir. Gerçekten de daha önce yapılan çalışmalarda doymamış yağ asiti içeriği bakımından FY'na göre zengin olan SY'nın özellikle lifli maddelerin sindiriminden sorumlu olan bakterilerin gelişim ve çoğalmaları üzerinde daha yüksek negatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Alvarez-Hess et al., 2019; Bayat et al., 2017; Getachew et al., 2001; Kubelkova et al., 2018; Machmüller et al., 2006; Majewska et al., 2017; Villar et al., 2019).

Bu sonuçlar genel anlamda değerlendirildiğinde nitrat ve yağ kaynağının birlikte kullanılmasının İVOMS ve SOM değerlerinde herhangi bir olumsuz etki ortaya koymaksızın, CH₄ üretiminin azaltılmasında kullanılabileceğini göstermiştir. Her 2 laktasyon döneminde de SY + nitrat kullanımının FY+ nitrat kullanımına kıyasla rasyonların (kontrol gruplar) daha düşük İVOMS ve SOM değerlerinde daha yüksek orada düşmeye yol açtığı belirlenmiştir. Bu bulgu, keten tohumu yağı + nitrat kullanılan rasyonlar için daha düşük İVOMS ve SOM değerlerinin elde edildiğini bildiren Guyader et al. (2015) ve Popova et al. (2019)'nın bulguları ile uyum göstermektedir.

Mevcut çalışmada, laktasyon dönemi ($p<0.001$), yem katkı maddesi ($p<0.001$), laktasyon dönemi x yağ ilavesi ($p<0.001$; $p=0.003$), yem katkı maddesi x yağ ilavesi ($p=0.011$; $p=0.035$), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi, yağ ilavesi, laktasyon

dönemi x yem katkı maddesi x yağ interaksiyonlarının ($p < 0.001$) ME ve NE_L değerlerini etkilediği bulunmuştur. Süt sığırı yetiştiriciliğinde kullanılan rasyonlarda enerji birimi olarak ME ve NE_L kullanılmaktadır (Hristov et al., 2013). Süt sığırı yetiştiriciliğinde en kritik dönemlerden birisi enerji ihtiyacının diğer laktasyon dönemlerine göre yüksek olduğu erken laktasyon dönemidir. Bu dönemde süt sığırları özellikle de yüksek verimli süt sığırları sıklıkla negatif enerji dengesi durumuyla karşı karşıya kalmakta, bir başka deyişle enerji ihtiyaçları karşılanamamaktadır. Bu sorununun çözümünde farklı yollara başvurulmaktadır (düşük kaba/kesif yem oranlı rasyonlar kullanmak, enerjice zengin yağların kullanımı vb.). Düşük kaba/kesif yem oranlı rasyonların kullanımının asidosis riskini artırdığı bilinen bir gerçektir. O nedenle rasyonun kaba/kesif yem oranını istenilen düzeyde düşürmek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumda devreye enerjice zengin yağların kullanımı konusu devreye girmektedir.

İşte bu gerçekten hareketle çalışmamızda enerji kaynağı olarak kullanılan SY ve FY aynı zamanda rumende CH_4 üretiminin düşürülmesinde de etkili olmaktadır. Mevcut çalışmada erken laktasyon döneminde nitrat + yağ ilaveli rasyonlar için belirlenen ME ve NE_L değerlerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Yağ kaynakları kendi içinde değerlendirildiğinde FY ilaveli rasyonun SY ilaveli rasyonlara göre daha yüksek ME ve NE_L değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu bulgunun çalışmada elde edilen İVOMS değerleri ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Tablo 5.5.). Enerji değerleri ile ilgili elde edilen değerler daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir. (NRC, 2001; Ueda et al., 2003; Villar et al., 2019).

5.5.4. Nitrat ve yağ (fındık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonlarının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkisi.

Mevcut çalışmada, kırk sekiz saat süreyle tamponlanmış rumen sıvısı içinde inkübe edilen iki (erken ve orta) laktasyon döneminde süt inekleri için hazırlanan nitratlı ve/veya yağlı (FY ve SY) rasyonların rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) üzerindeki etkileri Tablo 5.6.'da sunulmuştur. Çalışmamızda, kırk sekiz

saatlik inkübasyon sonrasında enjektörlerde kalan sıvılarda çalışmada kullanılan rasyonların pH değerleri 5.94 – 6.25 arasında değişmiştir (Tablo 5.6.).

Laktasyon dönemi pH değerlerini etkilemiştir ($p<0.001$). Erken ve orta laktasyon dönemleri arasındaki pH farkı kaba yem/konsantre yemin oranından kaynaklanmaktadır. Bazı araştırmacılar rasyonda konsantre yemin oranının artışına bağlı olarak ruminal pH değerinde azalma olduğunu bildirmiştir (Bayat et al., 2017; Carro ve Miller, 1999).

Rasyondaki konsantre yem oranının artışına bağlı olarak rumen pH'sında gerçekleşen düşme yüksek nişasta içeriği (Goad et al., 1998; Liu et al., 2019; Petri et al., 2013), OM'nin hızlı fermantasyonu (Bayat et al., 2017) ve rasyon enerji düzeyinin artması (Morsy et al., 2016) ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda her iki laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyonların (kontrol gruplarına kıyasla) pH değerlerini düşürdüğü bulunmuştur ($p=0.006$). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (Latham et al., 2016; Li et al., 2012; Marinho, 1997). Aynı şekilde, çalışmamızda erken ve orta laktasyon dönemleri için bulunan rumen pH değerleri Seed ve Mohamed (2017) tarafından bildirilen değerle uyum göstermektedir.

Mevcut çalışmada erken ve orta laktasyon dönemlerinde yağ ilavesi pH değerlerini düşürmüştür ($p<0.001$). Bazı araştırmacılar yağ ilavesinin ruminal pH değerini düşürdüğünü bildirmiştir (McGinn et al., 2004; Messana et al., 2013). Ruminal pH'da yağ ilavesine bağlı olarak gözlenen düşme kullanılan yağların (SY ve FY) doymamışlık derecesi ile ilişkili ilişkilendirilebilir. Nitekim bazı araştırmacılar yağların doymamışlık derecesinin artışına bağlı olarak rumen pH'sını düşürücü etkilerinin arttığını bildirmişlerdir (Alvarez-Hess et al., 2019; Jalc et al., 2007, Majewska et al., 2017; Wu et al., 2016).

Çalışmamızda da SY ilaveli olan rasyonların (FY ilaveli olan rasyonlara kıyasla) rumen pH'sını düşürücü etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Russell and Wilson (1996), ve Mertens (1997) 6.2'nin üstündeki pH değerlerinin rumen fermantasyonunu etkilemediğini bildirmiş olup çalışmamızda tespit edilen pH değerleri (5.94 ile 6.25 arasında değişen) bu değere yakın olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda yem katkı maddesi x yağ interaksiyonunun ruminal pH'i etkilediği bulunmuştur ($p=0.008$). Her 2 laktasyon döneminde en düşük ruminal pH değeri nitrat + SY ilaveli rasyonlar için bulunmuştur.

Tablo 5.6. Nitrat ve yağ (findık yağ ve soya yağ) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırı rasyonlarının rumen fermantasyon özellikleri, mikrobiyal protein sentezi (MPS), kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), pH ve protozoa sayısı (PS) değerleri üzerindeki etkisi

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	Yağ	NH ₃ -N (mg/dl)	UYA (mmol/l)				AA:PA	KZYA (mmol/l)	MPS (mg/ml)	PS (x10 ⁴ ml)	pH
				AA	PA	BA	TUYA					
Erken (4MS6KY)	Kontrol	Yağsız	9.20 ^a	49.57 ^b	17.47 ^d	15.51 ^{bc}	89.11 ^a	2.84 ^b	1.14 ^a	2.49 ^a	36.19 ^a	6.12 ^{bc}
		SY	8.33 ^b	46.04 ^d	19.19 ^b	14.53 ^{def}	85.65 ^{de}	2.40 ^{fg}	1.07 ^b	2.41 ^b	29.25 ^e	5.95 ^{ef}
		FY	8.98 ^a	48.44 ^{bc}	18.58 ^c	14.68 ^{de}	87.63 ^{bc}	2.61 ^c	1.12 ^{ab}	2.47 ^a	32.69 ^c	5.99 ^{def}
	NaNO ₃	Yağsız	8.35 ^b	47.29 ^{cd}	19.21 ^b	16.89 ^a	87.14 ^{bcd}	2.46 ^{def}	1.07 ^b	2.39 ^{bc}	35.06 ^b	6.08 ^c
		SY	6.60 ^f	43.24 ^e	20.84 ^a	15.62 ^{bc}	83.37 ^f	2.07 ⁱ	0.82 ^g	2.08 ^g	27.69 ^g	5.94 ^f
		FY	7.93 ^c	46.55 ^d	19.57 ^b	15.74 ^b	85.70 ^{de}	2.38 ^g	0.89 ^{ef}	2.17 ^f	32.06 ^d	5.98 ^{de}
Orta (6MS4KY)	Kontrol	Yağsız	8.34 ^b	52.49 ^a	16.77 ^e	13.95 ^{fg}	88.51 ^{ab}	3.13 ^a	1.15 ^a	2.51 ^a	28.31 ^f	6.25 ^a
		SY	7.28 ^d	46.86 ^d	18.55 ^c	13.82 ^g	84.39 ^{ef}	2.53 ^{cd}	0.76 ^h	1.99 ^h	26.81 ^h	6.00 ^d
		FY	7.96 ^c	49.36 ^b	17.31 ^{de}	14.07 ^{fg}	86.35 ^{cd}	2.85 ^b	0.94 ^{de}	2.24 ^e	27.19 ^g	6.08 ^c
	NaNO ₃	Yağsız	7.37 ^d	51.19 ^{ab}	16.80 ^e	15.70 ^b	89.93 ^a	3.04 ^{ab}	0.98 ^{cd}	2.30 ^{de}	28.06 ^f	6.16 ^b
		SY	6.37 ^f	43.85 ^e	19.66 ^b	14.41 ^{efg}	81.78 ^g	2.23 ^h	0.86 ^{fg}	2.14 ^f	25.36 ^j	5.99 ^{de}
		FY	6.87 ^e	45.97 ^d	18.47 ^c	15.04 ^{cd}	83.01 ^{fg}	2.49 ^{de}	0.99 ^c	2.33 ^{cd}	26.06 ⁱ	6.08 ^c
Laktasyon dönemi (LD)												
Erken			8.23	46.86	19.14	15.50	86.43	2.46	1.02	2.34	32.16	6.01
Orta			7.37	48.45	17.93	14.50	85.66	2.72	0.94	2.25	26.96	6.09
Yem katkı maddesi (YKM)												
Kontrol			8.35	48.79	17.98	15.28	86.94	2.72	1.03	2.35	30.57	6.07
NaNO ₃			7.25	46.52	19.09	14.71	85.15	2.46	0.94	2.24	29.97	6.04
Yağ												
Yağsız			8.32	50.39	17.56	15.52	88.67	2.88	1.09	2.43	31.91	6.15
SY			7.15	45.00	19.56	14.60	83.79	2.31	0.88	2.15	27.28	5.97
FY			7.94	47.58	18.48	14.88	85.67	2.58	0.98	2.31	29.50	6.04
O.S.H			0.149	0.481	0.207	0.155	0.429	0.54	0.022	0.028	71.559	0.015
Ana etkiler												
LD			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
YKM			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006
Yağ			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.031	0.013
LD × Yağ			0.008	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.033
YKM × Yağ			0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.036	0.041	0.004	0.008
LD × YKM × Yağ			0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.017	0.015

a. b. c... Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası, AA: Asetik asit, PA: Propiyonik asit, BA: Bütirik asit, KZYA: Kısa zincirli yağ asit, MPS: Mikrobiyel protein sentezi, PS: Protozoa sayısı.

Laktasyon dönemi x yağ ($p=0.033$), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi ($p=0.013$) ve laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağlar interaksiyonları ruminal pH'i etkilemiştir ($p=0.015$). Çalışmamızda, erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonlar için belirlenen rumen $\text{NH}_3\text{-N}$ değerleri maksimum mikrobiyal büyüme oranları için yeterli kabul edilen minimum $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun (4.39 - 7.32 mmol/l arasında) üzerinde (Satter and Slyter, 1974) olduğu görülmektedir.

Mevcut çalışmada yüksek konsantre yem oranlı erken laktasyon dönemi rasyonun kaba yem oranı yüksek olan orta dönem laktasyon rasyonlara kıyasla $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun artırdığı bulunmuştur ($p<0.001$). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum içerisinde iken (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009; Carro and Miller, 1999; Kljak et al., 2017; Liu et al., 2019; Moorby et al., 2006), diğer bazı çalışmalarla (Hu et al., 2005; Jadhav et al., 2017; Liu et al., 2018) uyumsuzdur. Erken laktasyon döneminde $\text{NH}_3\text{-N}$ değerinin yüksek olması bu dönemde rumende proteolitik bakteri konsantrasyonunun yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Çünkü proteolitik bakteriler protein yıkımını hızlandırmak suretiyle rumen $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu artırmaktadır.

Çalışmamızda, erken laktasyon döneminde ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunda gözlenen artış MPS'de ortaya çıkan artış ile ilişkilendirilebilir (Tablo 5.6.). Bu bulgu bazı çalışmalar ile uyum göstermektedir (Hu et al., 2007; Oldick ve Firkins, 2000). Ayrıca, orta laktasyon döneminde $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun azalması bu dönemde kaba yem kaynağı olarak $\text{NH}_3\text{-N}$ üretimini düşürücü etkiye sahip olan saponin (Belanche et al., 2016; Cieslak et al., 2014b; Jadhav et al., 2018; Lu and Jorgensen, 1987; Patra and Saxena, 2009) zengin yonca bitkisinin yer aldığı rasyonların kullanılması ile ilişkilendirilebilir. Diğer yandan, Lu ve Jorgensen (1987) saponinin aynı zamanda PS'da ve buna bağlı olarak da $\text{NH}_3\text{-N}$ üretiminde düşmeye yol açtığını bildirmiştir. Aynı şekilde, Hristov et al., (2005) $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonundaki düşmeyi ruminal protozoa popülasyonunun düşmesi ile ilişkilendirmiştir.

Diğer bazı araştırmacılar ise saponinin $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu düşürücü etkisini İVGS'ni düşürücü etkisiyle açıklamışlardır (Hu et al., 2005; Jadhav et al., 2017; Liu et al., 2018). Çalışmamızda orta laktasyonda İVGS'de gözlenen düşme bu araştırmacıların bulguları ile uyum göstermektedir. Erken laktasyon döneminde $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun yüksek olması bu dönemde rumende bulunan $\text{NH}_3\text{-N}$

üretiminden sorumlu olan bakterilerin enerji ihtiyaçlarının karşılanmış olması ile açıklanabilir. Mevcut çalışmada erken ve orta laktasyon dönemlerinde nitrat ilaveli olan rasyonlar için düşük NH₃-N konsantrasyon değerleri belirlenmiştir (p <0.001).

Bu bulgu nitratın fermantasyon profilini değiştirdiğini ve NH₃-N konsantrasyonunu düşürdüğünü bildiren bazı çalışmalarla uyum göstermektedir (Guyader et al., 2016). Guyader et al. (2016), nitrat ve ürenin rumende mikroorganizmalar tarafından amonyak üretiminde kullanıldığını, ancak nitratın bileşiğine dönüşmeden önce rumen bakterileri üzerinde toksik etkiye sahip olan nitrite dönüştüğünü ve bu nedenle nitrat ilavesinin üre ilavesine kıyasla rumen NH₃-N konsantrasyonunu daha yüksek oranda düşürdüğünü bildirmiştir.

Diğer bazı çalışmalarda da bu bulguyu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (Adejoro et al., 2019). Rasyona yağ ilavesinin NH₃-N konsantrasyonu üzerindeki etkisinin ele alındığı bazı çalışmalarda rasyona yağ ilavesinin NH₃-N konsantrasyonunu etkilemediği (Jalc et al., 2005), artırdığı (Jalc et al., 2002) ya da düşürdüğü (Doreau et al., 1991; Szumacher-Strabel et al., 2009) bildirilmiştir. Bu çalışmada erken ve orta laktasyon dönemlerinde SY ilaveli olan rasyonlarda (FY ilaveli olan rasyonlara kıyasla) NH₃-N üretiminin daha düşük olduğu belirlenmiştir (p<0.001).

Kubelkova et al. (2018), TDYA içeriği yüksek olan ayçiçeği varyetesi ile ÇDYA içeriğince zengin keten tohumu yağının rumen fermantasyonu üzerindeki etkisini ele aldıkları *in vitro* çalışmalarında keten tohumu yağının rumen pH'sı ve NH₃-N konsantrasyonunun daha yüksek oranda düşürdüğünü belirlemiş olup bu bulgu çalışmamızla uyum göstermektedir. Aynı şekilde, Bayat et al. (2017) keten tohumu yağının TDYA'ca zengin kolza yağına kıyasla NH₃-N konsantrasyonunu daha yüksek oranda düşürdüğünü belirlemişlerdir. Diğer yandan, bazı araştırmacılar TDYA içeriği yüksek *Moringa oleifera* yağının (stearik asit (%2.09), linoleik asit (%1.27), linolenik asit (%1.75) ve oleik asit (%74.99)) kullanıldığı rasyonların rumende korunmuş (bypass) protein oranını artırırken NH₃-N konsantrasyonunu düşürdüğünü bildirmişlerdir (Gassenschmidt et al., 1995; Belew et al., 2014).

Gomez-Cortes et al. (2008) rasyona ilave edilen SY'nin (%6 KM) ilave NH₃-N konsantrasyonunu düşürdüğünü bildirmiştir. Aynı şekilde, Szumacher-Strabel et al. (2009) ruminantlardan elde edilen rumen sıvısına linoleik asit içeriği yüksek yağların

ilave edilmesi durumunda $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonununun düşürdüğünü belirlemişlerdir. Çalışmamızda, laktasyon dönemi x yem katkı maddesi ($p=0.040$), laktasyon dönemi x yağ ilavesi ($p=0.008$), yem katkı maddesi x yağ ilavesi ($p=0.004$), laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ ilavesi ($p=0.001$) interaksiyonları $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu etkilemiştir.

Mevcut çalışmada, kontrol grubunda $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu nitrat ilaveli gruba göre yüksek bulunmuş olup bu durum kontrol grubunda yer alan üre varlığı ile açıklanabilir. Bu bulgu bazı araştırmalarla (Adejoro and Hassen, 2017; Kertz, 2010; Uza et al., 2005; Verma et al., 2006) uyum göstermektedir. Nitrat ilavesine bağlı olarak rumen $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunda ortaya çıkan düşme daha fazla $\text{NH}_3\text{-N}$ bileşiğinin rumenden kaybolduğunu veya rasyonda daha düşük oranda $\text{NH}_3\text{-N}$ üretiminin gerçekleştirdiği şeklinde açıklanabilir.

Nitekim, bazı çalışmalarda (Adejoro and Hassen, 2017; Kertz, 2010; Uza et al., 2005; Verma et al., 2006) bu yaklaşımı doğrulayacak bulgular elde edilmiştir. Nitratın rumende $\text{NH}_3\text{-N}$ ' a dönüşüm hızının üreye göre daha yavaş olduğu bilinmekte olup (Kertz, 2010) bu bilgi, çalışmamızdaki bulguyu doğrular niteliktedir. Mevcut çalışmada erken laktasyon döneminde kullanılan konsantre / kaba yem oranı yüksek olan rasyonlar orta laktasyon döneminde kullanılan rasyonlara göre protozoa sayısını artırmıştır ($p<0.001$). Konsantre/kaba yem oranının rumende PS'nı artırdığını ((Franzolin and Dehority, 1996; Lengowski et al., 2016) veya düşürdüğünü (Goad et al., 1998; Gozho et al., 2005; Hook et al., 2011; Khafipour et al., 2009) bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Çalışmamızda laktasyon dönemleri arasında $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu ve PS arasında paralellik bulunmakta olup bu bulgu PS'daki düşmenin $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu düşürdüğünü bildiren çalışmalarla (Hu et al., 2005; Kayouli et al., 1986; Liu et al., 2018; Veira et al., 1983) uyum göstermektedir. Mevcut çalışmada her iki laktasyon döneminde de nitrat ilaveli rasyonlar kontrol gruplarına kıyasla PS'nı düşürmüştür ($p<0.001$).

Çalışmamızda, PS ile ilgili bulgular nitritin rumen protozoa popülasyonu ve metanojenik bakteri sayısını ve buna bağlı olarak da CH_4 üretimini engellediğini bildiren çalışmalarla uyum içerisindedir (Iwamoto et al., 2002). Asanuma et al. (2015), potasyum nitrat ilaveli rasyon tüketen keçilerde protozoa popülasyonunun (% 86)

düşüğünü bildirirken, diğer bazı çalışmalarda (Guyader et al., 2015; Patra and Yu, 2013; Sar et al., 2005; van Zijderveld et al., 2010) PS'nin nitrat ilavesinden etkilenmediği bildirilmiştir. Rasyonlarda nitrat ve saponinlerin birlikte kullanımının ruminal protozoal popülasyonu düşürdüğünü bildiren çalışmalar (Lin et al., 2013; Patra and Yu, 2013) çalışmamızda elde edilen bulgularla uyumaktadır.

Nitratın indirgenme ürünü olan nitrit rumen fermantasyonunu etkileyerek TUYA, propiyonik asit içeriğini ve PS'nı düşürücü yönde etki yapmaktadır (Sun et al., 2017). Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan yağ ilaveli rasyonlar protozoa popülasyonunu etkilemiştir ($p<0.001$). Çalışmamızda SY ilaveli olan rasyonların PS'nı FY ilaveli rasyonlara kıyasla daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0.001$). Bazı çalışmalarda Hindistan cevizi yağı (%5 KM; Dohme et al., 1999), keten tohumu yağı (%4 KM; Ivan vd., 2001), kanola yağı (50 g/kg KM; Villar et al., 2019) ve ayçiçeği tohumu yağı (%6 KM; Hristov et al., 2009) ruminal protozoal popülasyonu düşürdüğü bildirilmiştir. Cieslak et al. (2015), balık yağı ilaveli olan rasyonların kolza tohumu yağı ilaveli rasyonlara kıyasla protozoa popülasyonunu daha yüksek oranda düşürdüğünü belirlemiştir.

Mevcut çalışmada nitrat + yağ ilaveli rasyonların katkısız (yağsız) rasyonlara göre protozoa popülasyonunu daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiştir ($p=0.004$). Her iki laktasyon döneminde de nitrat + SY ilaveli olan rasyonların nitrat + FY ilaveli rasyonlara kıyasla protozoa popülasyonunu daha yüksek oranda düşürdüğü görülmektedir ($p<0.001$).

Mevcut çalışmada, AA, PA, BA, TUYA konsantrasyonları ve AA: PP oranının laktasyon döneminden etkilendiği belirlenmiştir ($p<0.001$). Konsantre yem içeriği yüksek olan erken dönem laktasyon rasyonlarının AA ve TUYA konsantrasyonları ve AA: PP oranını düşürdüğü, PA ve BA konsantrasyonlarını ise yükselttiği belirlenmiştir ($p<0.001$). Kaba yem içeriği yüksek olan rasyonlar (orta laktasyon dönemi) ise AA konsantrasyonunu artırırken, PA, BA ve TUYA konsantrasyonları ve AA: PP oranını düşürmüştür.

Erken laktasyon döneminde PA konsantrasyonundaki artması bu dönemde kullanılan rasyonlarda yüksek olan kolay çözünebilir karbohidratların içeriğine bağlı olarak artan laktik asit içeriğinin rumen pH'sını düşürmesi ile açıklanabilir. Aynı şekilde, AA konsantrasyonundaki düşme de erken laktasyon dönemi rasyonlarında

kaba yem oranının düşüklüğü ile ilişkilendirilebilir. Bu bulgular bazı çalışmalarla desteklenmektedir (Dijkstra et al., 2012; Kim et al., 2018; Kljak et al., 2017; Moate et al., 2017; Tamminga et al., 2007).

Çalışmamızda erken laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyonlar kontrol gruplarına kıyasla AA ve TUYA konsantrasyonları ve AA:PP oranını düşürürken PA ve BA konsantrasyonlarını yükseltmiştir ($p<0.001$). Aynı şekilde, orta laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyonlar (kontrol gruplarına kıyasla) AA konsantrasyonunu ve AA:PP oranını düşürmüş, PA, BA ve TUYA konsantrasyonlarını ise artırmıştır. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde nitrat + yağ ilaveli rasyonların AA, TUYA konsantrasyonları ve AA:PP oranını düşürdüğü ve PA ve BA konsantrasyonlarını artırdığı görülmektedir ($p<0.001$).

Ayrıca, her iki laktasyon döneminde nitrat + SY ilaveli rasyonların (nitrat + FY ilaveli rasyonlara kıyasla) AA ve TUYA konsantrasyonları ve AA:PP oranını düşürdüğü, PA ve BA konsantrasyonlarını ise artırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular genel anlamda değerlendirildiğinde ÇDYA bakımından zengin yağların TDYA içeriği yüksek yağlara kıyasla TUYA, PA, BA konsantrasyonlarını ve AA:PP oranını azalttığını bildiren çalışmalarla uyum göstermektedir (Alvarez-Hess et al., 2019; Patra and Yu, 2015; Villar et al., 2019; Wu et al., 2016). Mevcut çalışmada sırasıyla orta laktasyon döneminde ve erken laktasyon döneminde bulunan yüksek ve düşük AA:PP oranları Chen et al. (2015)'in bulguları ile uyumludur.

Giger-Reverdin ve Sauvant (2014), süt keçilerinde ruminal PA, BA, TUYA konsantrasyonlarının artmasını rasyonda kolayca fermente olabilen karbonhidrat içeriğinin artışıyla ilişkilendirmiştir. Mevcut çalışmada laktasyon dönemi x yağ ilavesi, laktasyon dönemi x yağ yem katkı maddesi ve laktasyon dönemi x yem katkı maddesi x yağ ilavesi AA, PA, BA, TUYA konsantrasyonları ve AA: PP oranını etkilemiştir ($p<0.001$).

Çalışmamızda erken ve orta laktasyon dönemlerinde nitrat ilaveli rasyonlar (kontrol gruplarına kıyasla) KZYA ve MPS değerlerini düşürmüştür ($p<0.001$). Ayrıca, erken laktasyon döneminde KZYA ve MPS değerlerinin orta laktasyon dönemine göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Bu bulgu erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonların enerji içeriklerinin yüksek ve bu dönemde rumen

NH₃-N konsantrasyonunun yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Rumende MPS üretebilmek için NH₃-N, amino asitler, peptitler ve enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır

Erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonlar MPS için gerekli olan NH₃-N, amino asitler, peptidler ve enerjiyi yeterli düzeyde sağladığından bu dönemde MPS yüksek düzeyde olmaktadır. Lu et al. (2019), konsantre yem oranı yüksek olan rasyonların kaba yemce zengin rasyonlara kıyasla MPS üretimini artırdığını bildirmiştir. Diğer yandan, Donaldson et al. (2016) ve Lu et al. (2015) rumende KZYA içeriğindeki artışı rasyondaki yüksek kolay çözünebilir karbonhidrat içeriğinin yüksek olması ile ilişkilendirmiştir.

Çalışmamızda erken laktasyon dönemi için bulunan yüksek MPS ve KZYA değerleri ve orta laktasyon dönemi için bulunan düşük MPS ve KZYA değerleri Donaldson et al. (2016) ve Lu et al. (2015; 2019) tarafından bildirilen değerlerle uyum içerisindedir. Mevcut çalışmada, erken laktasyon döneminde orta laktasyon dönemine kıyasla yüksek olarak tespit edilen KZYA ve MPS değerleri her 2 dönemde kullanılan rasyonlardaki LOK içeriğinin farklılığı ile ilişkilendirilebilir.

Çünkü, bazı çalışmalarda ortaya konulduğu gibi rasyonda LOK oranının artışına paralel olarak MPS ve KZYA üretiminde artış gerçekleşmektedir (Aschenbach et al., 2011; Davies et al., 2013; Granja-Salcedo et al., 2016; Shen et al., 2017). Erken ve orta laktasyon dönemlerinde nitrat ilavesinin MPS ve KYZA değerlerini düşürdüğü belirlenmiştir (p<0.001). Ancak her 2 iki laktasyon dönemin kontrol gruplarında MPS ve KYZA değerlerini artışı tespit edilmiştir. Bu bulgu aynı zamanda kontrol gruplarında kullanılan üre varlığı ile de ilişkilendirilebilir. Gerçekten de bazı araştırmalarda üre ilavesinin MPS ve KYZA üretimini artırdığı ortaya koyulmuştur (Anggraeni et al., 2017; Parker et al., 1995).

Her 2 laktasyon döneminde yağ ilavesinin MPS ve KZYA değerlerini etkilediği görülmektedir (p<0.001). Her iki laktasyon döneminde SY ilave rasyonlar (FY ilaveli olan rasyonlara) kıyasla MPS ve KZYA değerlerini düşürmüştür. Bununla birlikte, her iki laktasyon döneminde nitrat + yağ ilaveli rasyonlar kontrol gruplarına kıyasla MPS ve KZYA değerlerini düşürmüştür. Mevcut çalışmada, erken ve orta laktasyon dönemlerinde rasyonlara nitrat ilavesi KZYA ve MPS değerlerinde düşmeye yol açmıştır.

Bu bulgu kontrol gruplarında kullanılan üre varlığı ile açıklanabilir. Nitekim rumende KZYA ve MPS değerlerinin parçalanabilir protein içeriğinin artışıyla paralel olarak artış gösterdiğini bildiren çalışmalar (NRC, 2001) bu bulguyu destekler niteliktedir. Ayrıca, her iki laktasyon döneminde SY + nitrat ilaveli rasyonların (FY + nitrat ilaveli rasyonlara kıyasla) MPS ve KZYA değerlerini düşürdüğü belirlenmiştir. Bu bulgu, yağ ilavesine bağlı olarak kolay çözünebilir karbonhidrat içeriğindeki düşme ile ilişkilendirilebilir (Freitas et al., 2018). Çalışmamızda orta laktasyon döneminde belirlenen düşük KZYA ve MPS değerleri bu dönemde kullanılan rasyonlardaki yüksek saponin içeriğiyle ilişkilendirilebilir (Jadhav et al., 2018).

5.5.5. Nitrat ve yağ (fndık ve soya yağı) katkılı erken ve orta laktasyon dönemi rasyonların *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlik değerleri.

Mevcut çalışmada, *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF sindirilebilirlik (İVNDFS) ve *in vitro* ADF sindirilebilirlik (İVADFS) Tablo 5.7.'de gösterilmektedir. Çalışmamızda erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonlar için belirlenen İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerlerinin orta laktasyon dönemi rasyonları için bulunan değerlere kıyasla yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.001$).

Bu bulgu erken laktasyon döneminde kullanılan rasyonların kesif/kaba yem oranının yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Gerçekten de, rasyonda başta kolay çözünebilir karbonhidratlar olmak üzere sindirilebilirlikleri yüksek olan besin maddelerince zengin olan kesif yemlerin yüksek oranda bulunması sindirilebilirlikle ilgili parametreleri (İVGS, İVNDFS ve İVADFS) yükseltici yönde etki yapmaktadır (Carro and Miller, 1999; Chiquete et al., 1995; Dung et al., 2014; Paula et al., 2019).

Bazı araştırmalarda da kesif yem içeriği yüksek rasyonların rumen pH'sını düşürerek (Tablo 5.6.) lifli maddelerin sindiriminden sorumlu olan bakterilerin (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, ve *Ruminococcus flavefaciens*) gelişimlerini olumsuz yönde etkileyerek sindirim parametrelerinde düşmeye yol açtığı bildirilmiştir (Agle et al., 2010; Granja-Salcedo et al., 2016; Moorby et al., 2006; Zhou et al., 2011). Bunun yanında, orta laktasyon dönemi rasyonları için bulunan düşük sindirilebilirlik değerleri aynı zamanda bu dönemde kaba yem kaynağı olarak kullanılan yonca bitkisindeki saponin varlığı ile açıklanabilir.

Nitekim, daha önceki çalışmalarda da rasyonda saponince zengin farklı kaba yemlerin kullanılması durumunda sindirim parametrelerinde düşme gerçekleştiği bildirilmiştir (Guyader et al., 2015 (tea saponin); Jadhav et al., 2018 (*Camellia sinensis*); Lila et al., 2003 (Sarsaponin); Patra and Yu, 2014 (Saponin); Wang et al., 2012 (Quillaja saponaria)).

Tablo 5.7. Nitrat ve yağ (findık ve soya yağı) ilaveli erken ve orta laktasyon dönemi süt sığırları rasyonlarının *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (İVGS), *in vitro* NDF (İVNDFS) ve ADF (İVADFS) sindirilebilirlik değerleri.

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	Yağ	İVNDFS	İVADFS	İVGS
Erken (4MS6KY)	Kontrol	Yağsız	74.24 ^a	65.84 ^a	73.81 ^a
		SY	66.97 ^{cd}	60.11 ^d	71.05 ^{bc}
		FY	70.27 ^b	64.09 ^{bc}	73.75 ^a
	NaNO ₃	Yağsız	67.91 ^{cd}	64.77 ^{ab}	73.01 ^a
		SY	64.45 ^f	56.65 ^e	69.60 ^c
		FY	66.33 ^{de}	62.81 ^c	72.51 ^{ab}
Orta (6MS4KY)	Kontrol	Yağsız	68.27 ^c	64.48 ^{ab}	65.84 ^d
		SY	64.97 ^{ef}	59.45 ^d	62.81 ^e
		FY	67.57 ^{cd}	62.75 ^c	64.09 ^{de}
	NaNO ₃	Yağsız	66.24 ^{de}	63.27 ^{bc}	64.77 ^{cd}
		SY	63.45 ^f	56.50 ^e	56.50 ^g
		FY	64.00 ^f	57.51 ^e	60.11 ^f
Laktasyon dönemi (LD)					
Erken			68.36	62.38	72.29
Orta			65.75	60.66	62.35
Yem katkı maddesi (YKM)					
Kontrol			68.72	62.79	68.56
NaNO ₃			65.40	60.25	66.08
Yağ					
Yağsız			69.17	64.59	69.36
SY			64.96	58.18	64.99
FY			67.04	61.79	67.62
O.S.H			0.503	0.551	0.947
Ana etkiler					
LD			<0.001	<0.001	<0.001
YKM			<0.001	<0.001	<0.001
Yağ			<0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM			0.007	0.045	<0.001
LD × Yağ			0.006	0.001	<0.001
YKM × Yağ			<0.001	<0.001	<0.001
LD × YKM × Yağ			0.006	0.001	0.001

a. b. c... Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Mevcut çalışmada her iki laktasyon döneminde nitrat ilaveli rasyonlar İVGS, İVNDFS ve İVADFS'i düşürmüştür (p<0.001). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyum içerisindedir (Klevesahl et al., 2003; Marini and Van Amburgh, 2003). Aynı şekilde, çalışmamızda sindirilebilirlik parametreleri ile ilgili elde edilen bulgular rasyona sodyum nitrat ilavesinin rumende bulunan selülotik bakterilerin (*Fibrobacter*

succinogenes, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*) sayısında ve buna bağlı olarak lif (NDF, ADF) sindirilebilirliğinde düşmeye yol açtığını bildiren Zhou et al. (2011) adı araştırmacının bulguları uyusmaktadır.

Diğer yandan, çalışmamızda kontrol gruplarında nitrat ilaveli gruplara kıyasla sindirim parametreleri ile ilgili belirlenen yüksek değerler kontrol gruplarında üre varlığı ile açıklanabilir. Bazı çalışmalarda rasyonda kullanılan ürenin sindirim parametrelerini artırıcı yönde etki yaptığı ortaya konulmuştur. Ürenin sindirim parametreleri üzerindeki artırıcı etkisi bu bileşiğin besin maddelerinin özellikle de lifli besin maddelerinin sindiriminde görev alan rumen mikroorganizmalarının gelişim ve çoğalmalarını teşvik edici etkisiyle açıklanabilir (Adejoro et al., 2019; Cherdthong et al., 2011; Khattab et al., 2013; Nair et al., 2018; Sakthivel et al., 2012).

Çalışmamızda erken ve orta laktasyon dönemlerinde İVGS, İVNDFS ve İVADFS değerleri yağ ilavesi ile düşme göstermiştir ($p < 0.001$). Yağ asitlerinin doymamışlık derecelerindeki artışa bağlı olarak selülotik bakteriler üzerindeki toksik etkileri artış göstermekte olup bu durum ÇDYA ile TDYA' nin lifli maddelerin sindirimi üzerindeki etki farklılığı ile açıklanmaktadır (Gawad et al., 2015; Maczulak et al., 1981).

Mevcut çalışmada her iki laktasyon dönemlerinde SY ilaveli rasyonlar (FY yağ ilaveli olan rasyonlara kıyasla) İVGS, İVNDFS ve İVADFS'i daha yüksek düzeyde düşürmüştür ($p < 0.001$). Bazı çalışmalarda bu bulguyu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (Hristov et al., 2015; Vargas et al., 2017). Bununla birlikte bazı çalışmalarda TDYA içeriğince zengin olan yağ kaynaklarının da ÇDYA içeriği yüksek olan yağlar kadar olmasa bile sindirim parametrelerini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (Kubelková et al., 2018; Oldick and Firkins, 2000). Ebeid et al. (2019), oleik asit (C_{18:1}) içeriği yüksek olan *Moringa oleifera* tohumun yağı İVNDFS, İVADFS ve İVGS değerlerini düşürdüğünü bildirmiştir.

5.5.6. Nitrat ve yağ (fındık ve soya yağı) katkılı iki (erken ve orta) laktasyon dönemi süt sığırı rasyonlarının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) ile ilgi veriler.

Mevcut çalışmada kullanılan rasyonlara ait kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) Tablo 5.8.'de verilmiştir. Mevcut çalışmada, her 2 laktasyon döneminde kullanılan tüm rasyonların. Erken laktasyon döneminde

kullanılan rasyonların (Orta laktasyonda kullanılan rasyonlarına kıyasla) KMT ve KMS in yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Erken laktasyon döneminde belirlenen yüksek KMT ve KMS kullanılan rasyonlardaki yüksek konsantrasyonlu yem oranı ve buna bağlı olarak yüksek kolay çözünebilir karbonhidrat içeriği ve besin maddeleri sindirilebilirliği ile ilişkilendirilebilir (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009). Bu bulgular bazı çalışmalar ile (Ba et al., 2008; Chen et al., 2015; Kljak et al., 2017; McMurphy et al., 2014) ile uyumlu iken, bazı çalışmalar ile (Agle et al., 2010; Arndt et al., 2015) uyumsuzdur.

Çalışmamızda orta laktasyon döneminde (Erken laktasyon dönemine kıyasla) bulunan düşük KMT ve KMS kaba/kesif yem oranının yüksekliği ve kaba yem kaynağı olarak kullanılan yonca bitkisindeki yüksek saponin içeriği ile ilişkilendirilebilir. Saponin ile sindirilebilirlik arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Jadhav et al., 2017).

Mevcut çalışmada her iki (erken ve orta) laktasyon döneminde nitrat ilavesi KMT ve KMS'i düşürmüştür ($p<0.001$). Bu bulgu bazı çalışmalar ile uyumludur (Farra ve Satter, 1971; Girma ve Tolera, 2018; Sar et al., 2005; Shi et al., 2012). Bazı araştırmacılar üre ve nitrat gibi azotlu bileşiklerin KMS ve KMT'i etkilediğini bulurken (Girma and Tolera, 2019; Lazzarini et al., 2009; Olijhoek et al., 2016; Shi et al., 2012; Tomkins et al., 2018), diğer bazı araştırmacılar KMS, KMT'nin azotlu bileşik ilavesinden etkilenmediğini bildirmişlerdir (Benu et al., 2015; Nolan et al., 2010; Trinh et al., 2009; van Zijderveld et al., 2010; Wang et al., 2018). Bunun yanında, nitratın besin maddelerinin sindirim dereceleri üzerindeki etkisiyle ilgili farklı literatür bildirişleri bulunmaktadır.

Hulshof et al. (2012), rasyona % 2.2 nitrat ilavesinin KMT azalttığını bildirirken, Lee and Beauchemin (2014), sığırların nitrat tüketimine adapte olmaları durumunda KMT'nin nitrat ilavesine bağlı olarak düştüğünü, adapte olmaları durumunda ise tersine nitrat ilavesinin KMT'de artışa neden olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, nitrat ilavesi KMT'ni düşürmüştür. Bu sonuç bazı çalışmalar (de Raphélis-Soissan et al., 2014; Hulshof et al., 2012; Klop et al., 2016; Lee et al., 2015a; b) ile uyumludur. Bazı *in vivo* çalışmalar nitratın KMT'ni etkilemediğini, ancak KMS'ni yükselttiğini bildirmiştir (Guyader et al., 2015; Newbold et al., 2014; Troy et al., 2015; van Zijderveld et al., 2011).

Tablo 5.8. Erken ve orta laktasyon dönemlerinde kullanılan rasyonda nitrat kullanımının kuru madde tüketimi (KMT) ve kuru madde sindirilebilirliği (KMS) üzerindeki etkileri

Laktasyon dönemi	Yem katkı maddesi	Yağ	KMT	KMS
Erken (4MS6KY)	Kontrol	Yağsız	3.61 ^a	73.18 ^a
		SY	3.55 ^b	72.58 ^d
		FY	3.61 ^a	73.07 ^{ab}
	NaNO ₃	Yağsız	3.54 ^{bc}	73.05 ^{ab}
		SY	3.53 ^c	72.88 ^{bc}
		FY	3.54 ^{bc}	72.72 ^{cd}
Orta (6MS4KY)	Kontrol	Yağsız	3.50 ^d	72.54 ^d
		SY	3.45 ^f	71.96 ^f
		FY	3.44 ^f	72.32 ^e
	NaNO ₃	Yağsız	3.48 ^e	71.99 ^f
		SY	3.44 ^f	71.91 ^f
		FY	3.45 ^f	72.07 ^f
Laktasyon dönemi (LD)				
Erken			3.56	72.91
Orta			3.46	72.13
Yem katkı maddesi (YKM)				
Kontrol			3.53	72.61
NaNO ₃			3.49	72.44
Yağ				
Yağsız			3.53	72.69
SY			3.49	72.33
FY			3.51	72.54
O.S.H			0.009	0.077
Ana etkiler				
LD			<0.001	<0.001
YKM			<0.001	<0.001
Yağ			<0.001	<0.001
LD × YKM			<0.001	0.010
LD × Yağ			<0.001	0.303
YKM × Yağ			0.002	<0.001
LD × YKM × Yağ			<0.001	0.027

a. b. c... Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır.

O.S.H: Ortalamanın standart hatası

Çalışmamızda, her iki laktasyon döneminde de yağ ilaveli rasyonlar KMT ve KMS'ini düşürmüştür ($p < 0.001$). Bu bulgu bazı araştırma bulguları ile uyurken (Mosley et al., 2007; Rabiee et al., 2012; Stoffel et al., 2015), diğer bazı çalışma

bulguları ile çelişmektedir (Allen, 2000; Harvatine and Allen, 2006; Pirondini et al., 2015; Relling and Reynolds, 2007). Mevcut çalışmada yağ (SY ve FY) ilavesine bağlı olarak KMS ve KMT’te ortaya çıkan düşme İVNDFS ve İVADFS değerleri (Tablo 5.7.) ile uyum göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda her iki laktasyon döneminde de SY (ÇDYA zengin) ilavesinin TDYA içeriği bakımından zengin FY ilavesine kıyasla KMS ve KMT’ni daha yüksek düzeyde düşürdüğü belirlenmiştir. Bu bulgu doymamış yağ asitlerinin lifli maddelerin sindiriminden sorumlu olan selülotik bakteriler üzerindeki toksik etkisiyle açıklanabilir (Guyader et al., 2015; Villar et al., 2019).

Mevcut çalışmada erken laktasyon döneminde nitrat + yağ ilaveli rasyonlar KMT ($p=0.002$) ve KMS ($p<0.001$) düşürmüştür. Bu bulgu da bir önceki paragrafta belirtildiği gibi İVNDFS ve İVADFS değerleri ile uyum göstermektedir. Çalışmamızda nitrat + SY ilavesi (nitrat + FY ilavesine kıyasla) KMS, KMT’i daha yüksek düzeyde düşürmüştür. Bu bulgu bazı çalışmalar ile uyumludur (Dorea et al., 2017; Guyader et al., 2015; Patra and Yu, 2015; Villar et al., 2019; Weld and Armentano, 2017).

Orta laktasyon döneminde nitrat + yağlı olan rasyonlar KMS, KMT’i azalttığı bulunmuştur. Bu bulgunun kaba yemin (*Medicago sativa*) oranı ve saponin içeriğinin artması ile ilişki olduğu söylenebilir. Bu sonuç bazı çalışmaları ile uyumludur (Beiranvand et al., 2014; Broderick 1995; Calberry et al., 2003; Coverdale et al., 2004; EbnAli et al., 2015; Hadda, 2000; Vagnoni et al., 1997). Mevcut çalışmada, laktasyon dönemi x yağ ilavesinin interaksyonu KMS ($p<0.001$) etkilerken KMT’ni ($p=0.303$) etkilememiştir. Ancak laktasyon dönemi x yem kaktı maddesi x yağ ilavesi interaksyonu KMS ($p<0.001$), KMT’i ($p=0.027$) etkilemiştir.

Castro et al. (2019) ve Ueda et al. (2003) kaba/kesif yem oranı yüksek (65: 35) ve düşük (35:65) olan rasyonlara keten tohumu yağı (%3) ilavesinin etkisini ortaya koymak amacı ile yürüttüğü çalışmada yağ ilavesinin kaba/kesif yem oranı yüksek olan rasyonlarda lifli maddelerin sindirimini artırdığını, düşük olan rasyonlarda ise düşürdüğünü belirlemiştir. Bu bulgu çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyum içerisindedir. Buna benzer bulgular Palmquist ve Jenkins (2017) tarafından da bildirilmiştir.

5.6. Sonuç

Mevcut çalışmada nitrat ve/veya yağ (SY ve FY) ilaveli olan rasyonların rumen fermantasyonunu iyileştirme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Doymamış yağ derecesinin tek başına veya nitrat ile birlikte toplam gaz ve metan üretimini azalttığı TUYA, KZYA ve MPS'yi arttırdığı bulunmuştur. Çalışmamızda, nitratın tek başına veya yağlarla (SY ve FY) birlikte kullanması *in vitro* NDF, ADF sindirilebilirlikleri, *in vitro* gerçek sindirilebilirliği, KMS ve KMT'i etkilemiştir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Wareth, A. A. A., Hammad, S., Ahmed, H. (2014). Effects of *Khaya senegalensis* leaves on performance, carcass traits, hemtological and biochemical parameters in rabbits. *Excli journal*, 13, 502.
- Adejoro, F. A., and Hassen, A. (2017). Effect of supplementing or treating *Eragrostis curvula* hay with urea or nitrate on its digestibility and *in vitro* fermentation. *South African Journal of Animal Science*, 47(2), 168-177.
- Adejoro, F. A., and Hassen, A. (2018). *In vitro* methane production of eragrostis hay treated with graded levels of urea or nitrate. *Pakistan Agricultural Scientist's Forum*.
- Adejoro, F., Hassen, A., Akanmu, A. (2019). Effect of lipid-encapsulated acacia tannin extract on feed intake, nutrient digestibility and methane emission in sheep. *Animals* 9. doi:10.3390/ani9110863.
- Adejoro, F. A., Hassen, A., Akanmu, A. M., Morgavi, D. P. (2020). Replacing urea with nitrate as a non-protein nitrogen source increases lambs' growth and reduces methane production, whereas acacia tannin has no effect. *Animal Feed Science and Technology*, 259, 114360.
- AFRC (1993). Energy and protein requirements of ruminants. Agric. Food Res. Council Technical Committee on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, U.K., p. 159.
- Aganga, A. A., Tshwenyane, S. O. (2003). Feeding values and anti-nutritive factors of forage tree legumes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 170-177.
- Agle, M., Hristov, A. N., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P. M., Vaddella, V. K. (2010). Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(9), 4211-4222.
- Ahmed, A. (2010). Fodder yield and quality of rhodes grass-alfalfa mixtures as affected by sowing rates in makkah region. *JKAU: Met., Env. & Arid Land Agric. Sci.* 21(1): 19-33.
- Ahmed, M. A., Adeyemi, K. D., Jahromi, M. F., Jusoh, S., Alimon, A. R., Samsudin, A. (2017). Effects of dietary *Kleinhovia hospita* and *Leucaena leucocephala* leaves on rumen fermentation and microbial population in goats fed treated rice straw, *Trop. Ani. Health Prod.* 49: 1749-1756. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1388-3>.
- Ahmed, M. A., S. Jusoh, A. R. Alimon, M. Ebrahimi, Samsudin, A. A. (2018). Nutritive and anti-nutritive evaluation of *Kleinhovia hospita*, *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* with respect to their effects on *in vitro* rumen fermentation and gas production. *Trop. Anim. Sci. J.* 41:128-136. <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.128>
- Akingbade, A. A., Nsahlai, I. V., Bonsi, M. L. K., Morris, C. D., Du Toit, L. P. (2001). Reproductive performance of South African indigenous goats inoculated with DHP degrading rumen bacteria and maintained on *Leucaena leucocephala*/ grass mixture and natural pasture. *Small Ruminant Research* 39, 73-85.

- Akanmu, A. M., and Hassen, A. (2018). The use of certain medicinal plant extracts reduced *in vitro* methane production while improving *in vitro* organic matter digestibility. *Animal Production Science*, 58(5), 900-908.
- Alemu, A. W., Romero-Pérez, A., Araujo, R. C., and Beauchemin, K. A. (2019). Effect of encapsulated nitrate and microencapsulated blend of essential oils on growth performance and methane emissions from beef steers fed backgrounding diets. *Animals*, 9(1), 21.
- Alende, M., Lascano, G. J., Jenkins, T. C., & Andrae, J. G. (2019). Contrasting levels of fructose and urea added to an annual ryegrass based diet: effects on microbial protein synthesis, nutrient digestibility and fermentation parameters in continuous culture fermenters. *Semiárida*, 29(1), 33-41.
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 83(7), 1598-1624.
- Alvarez-Hess, P. S., Moate, P. J., Williams, S. R. O., Jacobs, J. L., Beauchemin, K. A., Hannah, M. C., ... & Eckard, R. J. (2019). Effect of combining wheat grain with nitrate, fat or 3-nitrooxypropanol on *in vitro* methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 256, 114237.
- Anggraeni, A. S., Herdian, H., Sakti, A. A., Sofyan, A., & Ekaningrum, M. (2017). Effect of urea treatment of cocoa pod on rumen fermentation characteristics *in vitro*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 101, No. 1, p. 012031). IOP Publishing.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J. (2008). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from *lespedeza*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 212-227.
- Annicchiarico, P., Barrett, B., Brummer, E. C., Julier, B., Marshall, A. H. (2015). Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Crit Rev Plant Sci.* 2015; 34:327-380.
- Ansah, T., Wilkinson, R. G., Huntington, J., Dei, H. K. (2018). Effects of tropical browse plants on *in vitro* rumen protein degradability. *Livestock Research for Rural Development. Volume 30, Article #46*. Retrieved May 13, 2019, from <http://www.lrrd.org/lrrd30/3/tans30046.html>.
- Anonymous, (2012). Turkish Food Codex Statement, 'Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği' 2012/29.2012. *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı*, Ankara, Turkey.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 942.05.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 985.26.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 990.03.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 992.09.

- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 7.074.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 2002.04.
- AOAC International, (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed., Gaithersburg, MD, Method 2003.05.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C₃ and C₄ grasses and legumes. *Anim. Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 59-64.
- Arndt, C., Powell, J. M., Aguerre, M. J., Crump, P. M., & Wattiaux, M. A. (2015). Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3938-3950.
- Asanuma, N., Yokoyama, S., & Hino, T. (2015). Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. *Animal Science Journal*, 86(4), 378-384.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., & Gäbel, G. (2011). Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of animal science*, 89(4), 1092-1107.
- Atawodi, S., Mari, D., Atawodi, J. C., Yahaya, Y. (2008). Assessment of *Leucaena leucocephala* leaves as a feed supplement in laying hens. *Afr J Biotechnol*, 7:317-21.
- Atawodi, S.E., Atawodi, J.C., Pala, Y., Idakwo P. (2009). Assessment of the polyphenol profile and antioxidant properties of leaves, Stem and root barks of *Khaya senegalensis* (Desv.) A. Juss. *Electronic Journal of Biology*, Vol. 5(4): 80-84.
- Auffret, M. D., Stewart, R., Dewhurst, R. J., Duthie, C. A., Rooke, J.A., Wallace, R.J., Freeman, T.C., Snelling, T. J., Watson, M., Roehe, R. (2018). Identification, comparison, and validation of robust rumen microbial biomarkers for methane emissions using diverse Bos Taurus breeds and basal diets. *Front. Microb.* 8, 2642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02642>.
- Awohouedji, D. Y. G., Babatounde, S., Adoukpe, J. G., Houinato, M., & Hounzangbe-Adote, S. (2013). Supplementing panicum maximum with two medicinal forages in the diet of Djallonke sheep at the Benin national sheep center. *Sci J Anim Sci*, 2, 285-295.
- Azeemoddin, G., Jaganmohan Rao, S., Thirumala Rao, S. D. (1988). Amino acid composition of subabul (*Leucaena leucocephala*) seed kernel proteins. *J. Food Sci. Technol.* 25, 158.
- Ba, N. X., Van, N. H., Ngoan, L. D., Leddin, C. M., Doyle, P. T. (2008). Amount of cassava powder fed as a supplement affects feed intake and live weight gain in Laisind cattle in Vietnam. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21:1143-1150
- Babatounde, S., Kakaï, R. G., Alkoiret, I., & Mensah, G. A. (2011). Intake and Digestibility of Native and Exotic Grasses Fed Ad libitum to Djallonke Sheep in South Benin. *Nong Ye Ke Xue Yu Ji Shu*, 5(4).

- Babayemi, O. J., Bamikole, M. A. (2004). Effects of *Tephrosia candida* DC leaf and its mixtures with Guinea grass on *in vitro* fermentation changes as feed for ruminants in Nigeria, *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 14-18.
- Bacab-Pérez, H. M., Solorio-Sánchez F. J. (2011) Oferta y consumo de forraje y producción de leche en ganado de doble propósito manejado en sistemas silvopastoriles en Tepalcatepec, Michoacán. *Trop Subtrop Agroecosyst* 13:271–278
- Bachruddin, Z., Latiefah S., Yusiati, L. M. (2019). Effect of the addition of sodium nitrate in a total mixed ration with fermented tofu waste on methane production from the rumen SIVISI. *Pakistan Journal of Nutrition*, 18: 408-412. doi:10.3923/pjn.2019.408.412
- Balgees, A., Elmnan, A., Hemeedan, A. A., Ahmed, R. I. (2015). Influence of different treatments on nutritive values of sugarcane bagasse. *Global Journal of Animal Scientific Research*, 2(3), 295.
- Barry, T. N., Manley, T. R., Duncan, S. J. (1986). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Bri. J. Nutr.* 55, 123-137.
- Basha, N. A., Scogings, P. F., Nsahlai, I. V. (2013). Effects of season, browse species and polyethylene glycol addition on gas production kinetics of forages in the subhumid subtropical savannah, South Africa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1338-1348.
- Bateman, H. G. II., Jenkins, T. C. (1998). Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non-lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility, *Journal of Dairy Science*, 81, 2451-2458.
- Bayat, A. R., Tapio, I., Vilkki, J., Shingfield, K. J., Leskinen, H. (2017). Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield. *J. Dairy Sci.* 101:1-16.
- Bayer, W. (1990). Use of native browse by Fulani cattle in central Nigeria. *Agroforestry Systems*, 12, 217–228.
- Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Eliason, M. V. (1997). Chewing activities and milk production of dairy cows fed alfalfa as hay, silage, or dried cubes of hay or silage. *Journal of Dairy Science* 80, 324–333.
- Beauchemin, K. A., and McGinn, S. M. (2005). Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of animal science*, 83(3), 653-661.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F., & McAllister, T. A. (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 85(8), 1990-1996.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara F., McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 21-27.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Benchaar, C., Holtshausen, L. (2009). Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production, *Journal of Dairy Science*, 92, 2118-2127.

- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M. (2015). Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets, *Journal of Animal Science*, 83, 653–661.
- Beever, D. E., Cottrill, B. R. (1994). Protein systems for feeding ruminant livestock: A European Assessment. *J. Dairy Sci.* 77: 2031-2043.
- Benchaar, C., Hassanat, F., Martineau, R., Gervais, R. (2015). Linseed oil supplementation to dairy cows fed diets based on red clover silage or corn silage: Effects on methane production, rumen fermentation, nutrient digestibility, N balance, and milk production, *Journal of Dairy Science*, 98, 7993–8008.
- Beiranvand, H., Ghorbani, G. R., Khorvash, M., Nabipour, A., Dehghan-Banadaky, M., Homayouni, A., Kargar, S. (2014). Interactions of alfalfa hay and sodium propionate on dairy calf performance and rumen development. *J. Dairy Sci.* 97(4):2270–2280. doi:10.3168/jds.2012-6332.
- Belanche, A., Ramos-Morales, E., and Newbold, C. J. (2016). *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3069-3078.
- Belewu, M.A., M.A. Ahmed, A.H.A. Badmos, T.O. Esan, K.O. Abdulsalam, M.B. Odebisi and A.K. Arise (2014). Effect of different levels of *moringa oleifera* oil on performance characteristics of pregnant goat. *Nigerian J. of Agric., Food and Environ.*, 10(2):29-33.
- Benitez-Sanchez, P. L., Leon-Camacho, M., Aparicio, R. (2003). A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *European Food Research and Technology*, 218, 13-19.
- Benu, I., Callaghan, M. J., Tomkins, N., Hepworth, G., Fitzpatrick, L. A., Parker, A. J. (2015). The effect of feeding frequency and dose rate of nitrate supplements on blood haemoglobin fractions in *Bos indicus* cattle fed Flinders grass (*Iseilemia* spp.) hay, *Animal Production Science*, 54, 1300-1304.
- Bergman, E. N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:567-590.
- Bhatta, R.; Uyeno, Y.; Tajima, K.; Takenaka, A.; Yabumoto, Y.; Nonaka, I.; Enishi, O.; Kurihara, M., (2009) Difference in nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science* 92, 5512– 5522.
- Biazzi, E., Nazzicari, N., Pecetti, L., Brummer, E. C., Palmonari, A., Tava, A., Annicchiarico, P. (2017). Genome-wide association mapping and genomic selection for alfalfa (*Medicago sativa*) forage quality traits. PLoS ONE, 12: e0169234. Doi :10.1371/journal. Pone.0169234.
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K. (1997). *In vitro* gas production: a technique revisited. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 77, 24–34.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., Masse, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review, *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 319-335.

- Bodas, R., Prieto, N., García-Gonzalez, R., Andres, S., Giraldez, F. J., Lopez, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 78e93.
- Bonsi, C., Rhoden, E., Woldeghebriel, A., Mount, P., Solaiman, S., Noble, R., ... & Cash, B. (1992). Kudzu-Goat Interactions--A Pilot Study. In: Solaiman, Sandra G.; Hill, Walter A. eds. *Using Goats to Manage Forest Vegetation, A Regional Inquiry*. Tuskegee, AL: *Tuskegee University Agricultural Experiment Station*: 84-88.
- Bougouin, A., Ferlay, A., Doreau, M., Martin, C. (2018). Effects of carbohydrate type or bicarbonate addition to grass silage-based diets on enteric methane emissions and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of dairy science*, 101(7), 6085-6097.
- Božic, A. K., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Ricke, S. C., Callaway, T. R., Yokoyama, M. T., ... & Nisbet, D. J. (2009). Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *Bioresource technology*, 100(17), 4017-4025.
- Brandt, R.T., Klopfenstein, T.J. (1986a). Evaluation of alfalfa-corn cob associative action. I. Interaction between alfalfa hay and ruminal escape protein on growth of lambs and steers. *Journal of Animal Science* 63, 894-901.
- Brandt, R.T., Klopfenstein, T.J. (1986b). Evaluation of alfalfa-corn cob associative action. II. Comparative tests of alfalfa hay as a source of ruminal degradable protein. *Journal of Animal Science* 63, 902-910.
- Brask, M., Weisbjerg, M. R., Hellwing, A. L. F., Bannink, A., & Lund, P. (2015). Methane production and diurnal variation measured in dairy cows and predicted from fermentation pattern and nutrient or carbon flow. *Animal*, 9(11), 1795-1806.
- Brito, A. F., Broderick, G. A., & Reynal, S. M. (2006). Effect of varying dietary ratios of alfalfa silage to corn silage on omasal flow and microbial protein synthesis in dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(10), 3939-3953.
- Broderick, G. A. (1995). Performance of lactating dairy cows fed either alfalfa silage or alfalfa hay as the sole forage. *Journal of Dairy Science* 78, 320-329.
- Broderick, G. A., Brito, A. F., Colmenero, J. J. O. (2007). Effects of feeding formate-treated alfalfa silage or red clover silage on the production of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci*, 90:1378-1391.
- Brown, D., Ng'ambi, J. W., & Norris, D. (2018). Effect of tanniniferous *Acacia* karroo leaf meal inclusion level on feed intake, digestibility and live weight gain of goats fed a *Setaria verticillata* grass hay-based diet. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 248-253.
- Bruinenberg, M. H., Valk, H., Korevaar, H., Struik, P. C. (2002). Factors affecting digestibility of temperate forages from seminatural grasslands: a review. *Grass and Forage Science*, 57(3), 292-301.
- Brzozowska, A., Oprządek, J. (2013). Lipid digestion and absorption in the gastrointestinal tract of ruminants. *Medycyna Weterynaryjna* 69, 622-665.

- Buckley, M. T., Racimo, F., Allentoft, M. E., Jensen, M. K., Jonsson, A., Huang, H., ... & Jørgensen, M. E. (2017). Selection in Europeans on fatty acid desaturases associated with dietary changes. *Molecular biology and evolution*, 34(6), 1307-1318.
- Burda, D., Jurzysta, M. (1998). Isolation and identification of flavonoids from *Medicago lupulina* L. Flowers. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 57(4):563-571.
- Burque, A. R., Abdullah, M., Babar, M. E., Javed, K., & Nawaz, H. (2008). Effect of urea feeding on feed intake and performance of male buffalo calves. *J. Anim. Pl. Sci*, 18(1), 1-6.
- Calberry, J. M., Plaizier, J. C., Einarson, M. S., McBride, B. W. (2003). Effects of replacing chopped alfalfa hay with alfalfa silage in a total mixed ration on production and rumen conditions of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 3611-3619.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy sci.* 90: 2580-2595.
- Callaghan, M. J., Tomkins, N. W., Benu, I., & Parker, A. J. (2014). How feasible is it to replace urea with nitrates to mitigate greenhouse gas emissions from extensively managed beef cattle? *Animal Production Science*, 54(9), 1300-1304.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., & Molina-Alcaide, E. (2009). Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *Journal of Animal Science*, 87(2), 622-631.
- Capelari, M., Johnson, K. A., Latack, B., Roth, J., & Powers, W. (2018). The effect of encapsulated nitrate and monensin on ruminal fermentation using a semi-continuous culture system. *Journal of animal science*, 96(8), 3446-3459.
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 82(2), 149-157.
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmüller, A., & Hess, H. D. (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian journal of agricultural research*, 56(9), 961-970.
- Castells, L., Bach, A., Aris, A., Terré, M. (2013). Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.* 96(8):5226-5236. doi:10.3168/jds.2012-6419.
- Castillo-Lopez, E., Jenkins, C. J. R., Aluthge, N. D., Tom, W., Kononoff, P. J., & Fernando, S. C. (2017). The effect of regular or reduced-fat distillers grains with solubles on rumen methanogenesis and the rumen bacterial community. *Journal of applied microbiology*, 123(6), 1381-1395.
- Castro, T., Martinez, D., Isabel, B., Cabezas, A., & Jimeno, V. (2019). Vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids supplementation of dairy cows' diets: Effects on productive and reproductive performance. *Animals*, 9(5), 205.

- Castro-Montoya, J., De Campeneere, S., Van Ranst, G., & Fievez, V. (2012). Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on *in vitro* methane and VFA production. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 47-60.
- Chelikani, P. K., Bell, J. A., Kennelly, J. J. (2004). Effects of feeding or abomasal infusion of canola oil in holstein cows 1. Nutrient digestion and milk composition. *Journal of Dairy Research* 71, 279-287.
- Cheng, K. J., Phillippe, R. C., Kozub, G. C., Majak, W., Costerton, J. W. (1985). Induction of nitrate and nitrite metabolism in bovine rumen *in vitro* and the transfer of this capacity to untreated animals, *Can. J. Anim. Sci.*, 65, 647-652. doi: 10.4141/cjas85-076.
- Chen, C., Wang, Y. (2010). Polyprenol from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. *J Environ Prot*, 1:70-2.
- Chen, L., Guo, G., Yuan, X., Zhang, J., Li, J., & Shao, T. (2015). Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1678–1685.
- Chen, L., Dong, Z., Li, J., & Shao, T. (2019). Ensiling characteristics, *in vitro* rumen fermentation, microbial communities and aerobic stability of low-dry matter silages produced with sweet sorghum and alfalfa mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2140-2151.
- Cheok, C.Y., Salman, H. A. K., Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: a review. *Food Res. Int.* 59, 16-40.
- Cherdthong, A., Wanapat, M., & Wachirapakorn, C. (2011). Influence of urea–calcium mixtures as rumen slow-release feed on *in vitro* fermentation using a gas production technique. *Archives of Animal Nutrition*, 65(3), 242-254.
- Chiquette, J. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 75(3), 405-415.
- Chung, Y. H., He, M. L., McGinn, S. M., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A. (2011). Linseed suppresses enteric methane emissions from cattle fed barley silage, but not from those fed grasshay, *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 321-329.
- Cieslak, A., Soliva, C. R., Potkański, A., Szumacher-Strabel, M., Scheeder, M. R. L., & Machmüller, A. (2006). Effect of plant oils on methane emission and biohydrogenation *in vitro*. In *International Congress Series* (Vol. 1293, pp. 180-183). Elsevier.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal*, 7(s2), 253-265.
- Cieslak, A., Zmora, P., Stochmal, A., Pecio, L., Oleszek, W., Pers-Kamczyc, E., ... & Szumacher-Strabel, M. (2014b). Rumen antimethanogenic effect of *Saponaria officinalis* L. phytochemicals *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, 152(6), 981-993.

- Cieslak, A., El-Sherbiny, M., Szczechowiak J., Kowalczyk, D., Pers-Kamczyc, E., Bryszak, M., Szulc, P., Jozwik, A., Szumacher-Strabel, M. (2015). Rapeseed and fish oil mixtures supplied at low dose can modulate milk fatty acid composition without affecting rumen fermentation and productive parameters in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 357-372.
- Cone, J. W., & van Gelder, A. H. (1999). Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 76(3-4), 251-264.
- Cottle, D. J. (1991). Australian sheep and wool handbook. Inkata Press.
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., & Wiedemann, S. G. (2011). Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science*, 51(6), 491-514.
- Coverdale, J. A., Tyler, H. D., Quigley III, J. D., Brumm, J. A. (2004). Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *J. Dairy Sci.* 87(8):2554-2562. doi:10.3168/jds. S0022-0302(04)73380-9.
- Danthu, P., Gaye, A., Sarr, A. (1999). Long term storage of *Khaya senegalensis* seeds. *Int. Tree Crops J.* 10: 93–100.
- Davies, K. L., McKinnon, J. J., & Mutsvangwa, T. (2013). Effects of dietary ruminally degradable starch and ruminally degradable protein levels on urea recycling, microbial protein production, nitrogen balance, and duodenal nutrient flow in beef heifers fed low crude protein diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 93(1), 123-136.
- Dawson, K. A., Rasmussen, M. A., Allison, M. J. (1997). Digestive disorders and nutritional toxicity in the rumen microbial ecosystem, 2nd ed. (Ed. P. J. Hobson and C. S. Stewart), *Blackie Acad. Profess. London*. pp. 633-660.
- de Raphélis-Soissan, V., Li, L., Godwin, I. R., Barnett, M. C., Perdok, H. B., Hegarty, R. S. (2014). Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. *Anim. Prod. Sci.* 54:1860–1866. doi:10.1071/AN14329
- De Blas, C., Mateos, G.G. (2010). Feed formulation. In C. de Blas & J. Wiseman (Eds.), *Nutrition of the rabbit*, 2nd edn (pp. S222-S232). Oxfordshire, UK: CAB International.
- Delgado, M. J., Ligeró, F., Lluch, C. (1996). Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants, *Soil Biology and Biochemistry* 26: 371-376.
- Delgado, D. C., Galindo, J., Cairo, J., Orta, I., Dorta, N. (2013). Supplementation with foliage of *L. leucocephala*. Its effect on the apparent digestibility of nutrients and methane production in sheep, *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(3).
- Dentinho, M. T. P., Moreira, O. C., & Bessa, R. J. (2018). The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in *Cistus ladanifer* L. *Forest systems*, 27(1), 11.
- Devendra, C., McLeroy, G. B. (1982). Goat and sheep production in the tropics. Intermediate *Tropical Agriculture Series*, Longman, London.

- Diaz, M. J., Garcia, M. M., Eugenio, M. E., Tapias, R., Fernandez, M., Lopez, F. (2007). Variations in fiber length and some pulp chemical properties of *Leucaena* varieties. *Ind Crops Prod*, 26: 142e50.
- Diaz Carrasco, J. M., Cabral, C., Redondo, L. M., Pin Viso, N. D., Colombatto, D., Farber, M. D., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2017). Impact of chestnut and quebracho tannins on rumen microbiota of bovines. *BioMed Research International*, 2017.
- Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J., & Bannink, A. (2012). Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172(1-2), 22-33.
- Dohme, F., Machmüller, A., Estermann, B. L., Pfister, P., Wasserfallen, A., & Kreuzer, M. (1999). The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in applied Microbiology*, 29(3), 187-192.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. (2000). Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC, *Canadian Journal of Animal Science*, 80(3), 473-484.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. (2001). Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets, *Letters in Applied Microbiology*, 32, 47–51.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20-32.
- Dong, Y., Bae, H. D., McAllister, T. A., Mathison, G. W., Cheng, K. J. (1997). Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC), *Canadian Journal of Animal Science*, 77(2), 269-278.
- Dórea, J. R. R., Danés, M. A. C., Zanton, G. I., & Armentano, L. E. (2017). Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle: a meta-analysis. *Journal of dairy science*, 100(11), 8977-8994.
- Doreau, M., Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review, *Livestock Production Science*, 43, 97-110.
- Doreau, M., Jouany, J. P. (1995). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 81, 3214-3221.
- Doreau, M., Bauchart, D., Chilliard, Y., 2011. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding, *Animal Production Science*, 2011, 51,19-29.
- Doreau, M., Arturo-Schaan, M. and Laverroux, S., 2017. Garlic oil reduces ruminal fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), p.1500388.
- Drehmel, O. R. (2017). Effect of fat and fiber on methane production and energy utilization on lactating dairy cows. *University of Nebraska-Lincoln*, 8-2017.
- Duarte, A. C., Durmic, Z., Vercoe, P. E., Chaves, A. V. (2017). Dose-response effects of dietary pequi oil on fermentation characteristics and microbial population using a rumen simulation technique (Rusitec). *Anaerobe* (2017) 48:59–65. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.013.

- Duarte, A. C., Holman, D. B., Alexander, T. W., Kiri, K., Breves, G., Chaves, A. V. (2018). Incubation temperature, but not pequi oil supplementation, affects methane production, and the ruminal microbiota in a rumen simulation technique (Rusitec) system. *Front Microbiol.* 8:1076. doi: 10.3389/fmicb.2017.01076.
- Dung, D.V., Shang, W., and Yao, W. (2014). Effect of crude protein levels in concentrate and concentrate levels in diet on *in vitro* fermentation. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27:797-805.
- Duthie, C. A., Haskell, M. J., Hyslop, J. J., Waterhouse, A., Wallace, R. J., Roehe, R., & Rooke, J. A. (2017). The impact of divergent breed types and diets on methane emissions, rumen characteristics and performance of finishing beef cattle. *Animal*, 11(10), 1762-1771.
- Durmaz, K., Kamalak, A. (2019). Hasat zamanının Katran yoncasının (*Bituminaria bituminosa*) besin madde kompozisyonu, *in vitro* gaz ve metan üretimi üzerindeki etkisi. *Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci*, 34 (2019) ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online) doi:10.7161/omuanajas.440508
- Ecoport, (2009). Ecoport database. Ecoport <http://www.ecoport.org>.
- Ebeid, H. M., Shaaban, M. M., Gawad, R. M. A., Saleh, H. M., & Aboamer, A. A. (2019). Effect of *moringa oleifera* seed oil as natural feed supplement on the productive performance of lactating ewes. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 22(2), 273-282.
- EbnAli, A., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Nargeskhani, A., Malekkhahi, M., Mirzaei, M., Pezeshki, A., Ghaffari, M. H. (2015). Effects of forage offering method on performance, rumen fermentation, nutrient digestibility, blood metabolites, and nutritional behavior in Holstein dairy calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99, 1-8. doi: 10.1111/jpn.12442.
- Ehsanpour, A. A., Razavizadeh, R. (2005). Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *Am J Biochem Biotechnol*, 1, 107-110.
- Eugène, M., Archimède, H., Sauvant, D. (2004). Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science*, 85, 81-97.
- Ellis, J. L., Kebreab, E., Odongo, N. E., McBride, B. W., Okine, E. K., & France, J. (2007). Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *Journal of dairy science*, 90(7), 3456-3466.
- El-Zaiat, H. M., Araujo, R. C., Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Louvandini, H., Pires, A. V., ... & Abdalla, A. L. (2014). Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. *Journal of animal science*, 92(5), 2214-2224.
- Emmanuel, N., Patil, N. V., Bhagwat, S. R., Lateef, A., Xu, K., & Liu, H. (2015). Effects of different levels of urea supplementation on nutrient intake and growth performance in growing camels fed roughage based complete pellet diets. *Animal Nutrition*, 1(4), 356-361.

- Ergün, A., Çolpan, İ., Yıldız, G., Küçükersan, S., Tuncer, Ş.D., Yalçın, S., Küçükersan, M.K., Şehu, A., Saçaklı, P. (2007). Hayvan besleme ve beslenme hastalıkları. Genişletilmiş 7.
- Etschmann, B., Suplie, A., & Martens, H. (2009). Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation. *Archives of animal nutrition*, 63(1), 26-38.
- FAO, (2016). Agriculture's greenhouse gas emissions on the rise. <http://www.fao.org/news/story/en/item/216137/icode/>.
- FAO, (2017). Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM). Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). [accessed September 3, 2018]. Available from www.fao.org/gleam/en/
- Farra, P. A., & Satter, L. D. (1971). Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. *Journal of Dairy Science*, 54(7), 1018-1024.
- Fievez, V.; Vlaeminck, B.; Jenkin, T.; Enjalbert, F. and Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109 :740-756.
- Fiorentini, G., Messina, J. D., Dian, P. H., Reis, R. A., Canesin, R. C., Pires, A. V., Berchielli, T. T. (2013). Digestibility, fermentation and rumen microbiota of crossbred heifers fed diets with different soybean oil availabilities in the rumen. *Anim Feed Sci Technol*. 181:26–34.
- Fiorentini, G., Carvalho, I. P., Messina, J. D., Castagnino, P. S., Berndt, A., Canesin, R. C., Frighetto, R. T., Berchielli, T. T. (2014). Effect of lipid sources with different fatty acid profiles on the intake, performance, and methane emissions of feedlot Nelore steers. *J. Anim Sci*. 92:1613–1620.
- Fiorentini, G., Carvalho, I. P. C., Messina, J. D., Canesin, R. C., Castagnino, P. S., Lage, J. F., Berchielli, T. T. (2015). Effect of lipid sources with different fatty acid profiles on intake, nutrient digestion and ruminal fermentation of Feedlot Nelore steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(11), 1583-1591. Doi: 10.5713/ajas.15.0130.
- Franzolin, R., & Dehority, B. A. (1996). Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of animal science*, 74(11), 2803-2809.
- Freitas, D. S., Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Machado, F. S., Campos, M. M., Corrêa, P. S., Abdalla, A. L., Maurício, R. M., Chaves, A. V. (2018). Unconventional vegetable oils for a reduction of methanogenesis and modulation of ruminal fermentation. *Front. Vet. Sci*. 5:201. doi:10.3389/fvets.2018.00201.
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecón, Á. R., Pérez, V., Giráldez, F. J. (2004). Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Animal Research*, 53(2), 127-136.
- Galindo, J., García, C., Marrero, Y., Castillo, E., Aldana, A. I., Torres, V., Sarduy, L. (2007). Effect of the composition of a grassland of *Leucaena leucocephala* with grasses on the microbial rumen population of bulls. *Cuban J. Agric. Sci*. 41:137.

- Galindo, J., González, N., Delgado, D., Sosa, A., Marrero, Y., González, R., Aldana, A.,
 Moreira, I.O. (2008). Effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* on rumen fermentation, methane production and population of rumen protozoa in heifers fed low-quality forage. *Zootecnia Trop.* 26, 249-252.
- Galindo, J., Marrero, Y., Ruiz, T., González, N., Díaz, A., Aldama, A., Moreira, O.,
 Hernández, J., Torres V., Sarduy, L. (2009). Efecto de una mezcla múltiple de leguminosas herbáceas y *Leucaena leucocephala* en la población microbiana y productos fermentativos del rumen de añejos mestizos de Cebú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 43: 256-264.
- Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., ... & Sarduy, L. (2016). Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and *in vitro* ruminal protozoa population, *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(4).
- Gassenschmidt, U., Jany, K.D., Tauscher, B., and Niebergall, H. (1995). Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochimica Biophysica Acta*, 1243: 477 – 481.
- Gawad, A. E. A. E., Khattab, M. S. A., , El-Nor, S. H. A. A., & El-Sherbiny, M. (2015). The effect of diet supplemented with vegetable oils and/or monensin on the vaccenic acid production in continuous culture fermenters. *Animal Nutrition*, 1(4), 320-323.
- Gautier, D., Bonnerat, A. and Njoya, A. (2005). The relationship between herders and trees in space and time in northern Cameroon. *The Geographical Journal*, 171, 324-339.
- Geishauer, T., Linhart, N., Neidl, A., Reimann, A. (2012). Factors associated with ruminal pH at herd level, *Journal of dairy science*, 95(8), 4556-4567.
- Gemeda, B. S., Hassen, A. (2014). *In vitro* fermentation, digestibility and methane production of sixteen tropicalperennial grass species. *Crop Pasture Sci.* 65, 479-488.
- Gemeda, B. S., & Hassen, A. (2015). Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(2), 188.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G. (2013). Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome: FAO. Available from <http://www.fao.org/3/a-i3437e.pdf>
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), 261-281.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2000). Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin rich browse and herbaceous legumes. *Bri. J. Nutri.* 84: 73-83.
- Getachew, G.; E.J. DePeters, P.H. Robinson and S.J. Taylor (2001). *In vitro* rumen fermentation and gas production: influence of yellow grease, tallow, corn oil and their potassium soaps. *Anim. Feed Sci. Technol.* 93 :1-15.

- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., & Taylor, S. J. (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 111(1-4), 57-71.
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D. H., Dandekar, A., Goyal, S., & DePeters, E. J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 140(3-4), 444-461.
- Ghamkhar, K., Rochfort, S., Banik, B. K., & Revell, C. (2018). Candidate metabolites for methane mitigation in the forage legume biserrula. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 30.
- Giang, N. T. T., Wanapat, M., Phesatchal, K., Kang, S. (2016). Level of *Leucaena leucocephala* silage feeding on intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy steers. *Tropical Animal Health and Production*, 48, 1057-1064. doi:10.1007/s11250-016-10603.
- Giger-Reverdin, S., & Sauvant, D. (2014). Challenges, opportunities and drawbacks in intensifying goat feeding systems in the context of climate-smart agriculture.
- Giridhar, K. S., Prabhu, T. M., Thirumalesh, T., Umashankar, B. C., Ajith, K. S., & Siddeswara, N. C. (2018). Prediction of intake and digestibility of some forest tree leaves using rumen *in vitro* gas production method. *Journal of Experimental Zoology, India*, 21(2), 1227-1234.
- Girma, T., & Tolera, A. (2019). Comparative evaluation of chemical composition, *in vitro* fermentation and methane production of selected tree forages. *Agroforestry Systems*, 1-10.
- Global Methane Initiative, (2011).
https://www.epa.gov/sites/production/files/201601/documents/usg_2011_accomplishments.pdf
- Goad, D. W., Goad, C. L., & Nagaraja, T. G. (1998). Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of animal science*, 76(1), 234-241.
- Goel, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2008). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 770-777.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A.R., Juárez, M., de la Fuente, M.A., Hervás, G. (2008). Milk production, conjugated linoleic acid content, and *in vitro* ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J. Dairy Sci.* 91, 1560–1569.
- Gorski, P. M., Jurzysta, M., Burda, S., Oleszek, W. A., Ploszyski, M. (1984). Studies on *Medicago lupulina* saponins IV. Variation in the saponin content of *M. lupulina*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 53: 543.
- Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., & Wittenberg, K. M. (2005). Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1399–1403. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72807-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1)

- Grainger, C., Clarke, T., Beauchemin, K. A., McGinn, M. S., Eckard, R. J. (2008).
Supplementation with whole cottonseed reduces methane emissions and can profitably increase milk production of dairy cows offered a forage and cereal grain diet, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 73-76.
- Grainger, C., Beauchemin, K. A. (2011). Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production, *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 308-320.doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021.
- Granja-Salcedo, Y. T., Ribeiro Júnior, C. S., de Jesus, R. B., Gomez-Insuasti, A. S., Rivera, A. R., Messana, J. D., ... & Berchielli, T. T. (2016). Effect of different levels of concentrate on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nellore steers. *Archives of Animal Nutrition*, 70(1), 17-32.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yépez, M., Ruales, P. (2016). Plant-food by-products to improve farm-animal health. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220, 121-135.
- Gumilar, D. A. K. W., Rianto, E., Arifin, M. (2018). The concentrations of rumen sivisi volatile fatty acids and ammonia, and rumen microbial protein production in sheep given feed during the day and night time. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 119, No. 1, p. 012045. IOP Publishing.
- Gunun, P., Wanapat, M., & Anantasook, N. (2013). Rumen fermentation and performance of lactating dairy cows affected by physical forms and urea treatment of rice straw. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26(9), 1295.
- Gunun, P., Wanapat, M., Gunun, N., Cherdthong, A., Sirilaophaisan, S., Kaewwongsa, W. (2016). Effects of condensed tannins in mao (*Antidesma thwaitesianum* Muell. Arg.) seed meal on rumen fermentation characteristics and nitrogen utilization in goats. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(8), 1111.
- Gunun, N., Gunun, P., Wanapat, M., Cherdthong, A., Kang, S., & Polyorach, S. (2017). Improving the quality of sugarcane bagasse by urea and calcium hydroxide on gas production, degradability and rumen fermentation characteristics. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(6).
- Guo, W. S., Schaefer, D. M., Guo, X. X., Ren, L. P., Meng, Q. X. (2009). Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis *in vitro*, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(4), 542-549.
- Guyader, J., Eugène, M., Meunier, B., Doreau, M., Morgavi, D. P., Silberberg, M., ... & Martin, C. (2015). Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle, *Journal of Animal Science*, 93(7), 3564-3577.
- Guyader, J., Janzen, H. H., Kroebel, R., Beauchemin, K. A. (2016). Forage use to improve environmental sustainability of ruminant production, *Journal of animal science*, 94(8), 3147-3158.
- Hadda, S. G. (2000). Associative effects of supplementing barley straw diets with alfalfa hay on rumen environment and nutrient intake and digestibility for ewes. *Animal Feed Science and Technology* 87, 163-171.

- Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R. Jr, editors, (1988). Alfalfa and alfalfa improvement. *Agron. Monogr. 29*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- Hao, N.V., Ledin, I. (2001). Performance of growing goats fed *Gliricidia maculata*. *Small Ruminant Research*, 39, 113–119. doi:10.1016/S0921-4488(00)00177-2.
- Hariadi, B. T., Santoso, B. (2010). Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen sivisi, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), 456-461. doi:10.1002/jsfa.3839.
- Harun, A. Y., & Sali, K. (2019). Factors Affecting Rumen Microbial Protein Synthesis: A review. *Vet Med Open J.* 4(1): 27-35. doi: 10.17140/VMOJ-4-133
- Harvatine, K. J., Allen, M. S. (2006). Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 89(3): 1092-103.
- Hassanat, F., Gervais, R., Julien, C., Chouinard, P. Y., Massé, D. I., Lettat, A., Petit, H. V., Benchaar, C. (2013). Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, balance, and milk production, *J. Dairy Sci*, 96:4553-4567.
- Hatew, B., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., Hendriks, W. H., Carbonero, C. H., Smith, L. M. J., & Pellikaan, W. F. (2016). Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*O nobrychis viciifolia*) on *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(2), 348-360.
- Healy, D. A., Wallace, F. A., Miles, E. A., Calder, P. C., Newsholme, P. (2000). Effect of low-to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids*, 35(7), 763-768.
- Hegarty, R. S., Gerdes, R. (1999). Hydrogen production and transfer in the rumen. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 12, 37-44.
- Herawati, R., Jamarun, N., Arnim, M. Z., Ningrat, R. W. S. (2013). Effect of supplementation *Sacharomyces cerevisiae* and *Leucaena leucocephala* on low quality roughage feed in beef cattle diet, *Pak. J. Nutr.*, 12, 182-184.
- Herrera-Saldana, R. E., Huber, J. T., Poore, M. H. (1990). Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains1. *J Dairy Sci.* 73:2386–93. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78922-9
- Herrick, K. J., Hippen, A. R., Kalscheur, K. F., Anderson, J. L., Ranathunga, S. D., Patton, R. S., & Abdullah, M. (2012). Lactation performance and digestibility of forages and diets in dairy cows fed a hemicellulose extract. *Journal of dairy science*, 95(6), 3342-3353.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Diaz, T. E., Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turn over and methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.* 54, 703-713.

- Huyen, N. T., Fryganas, C., Uittenbogaard, G., Mueller-Harvey, I., Verstegen, M. W. A., Hendriks, W. H., & Pellikaan, W. F. (2016). Structural features of condensed tannins affect *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *The Journal of Agricultural Science*, 154(8), 1474-1487.
- Holden, L. A. (1999). Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of dairy science*, 82(8), 1791-1794.
- Hook, S. E., Steele, M. A., Northwood, K. S., Dijkstra, J., France, J., Wright, A. D., & McBride, B. W. (2011). Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), 275–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01154.x>
- Hristov, A. N., McAllister, T. A., Van Herk, F. H., Cheng, K. J., Newbold, C. J., Cheeke, P. R. (1999). Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Ani. Sci.* 77: 2554-2563.
- Hristov, A. N., Ropp, J. K., Grandeen, K. L., Abedi, S., Etter, R. P., Melgar, A., & Foley, A. E. (2005). Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 83(2), 408-421.
- Hristov, A. N., Vander Pol, M., Agle, M., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P., Karnati, S. K. R. (2009). Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows, *Journal of Dairy Science*, 92, 5561-5582.
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., ... & Gerber, P. J. (2013). Special topics Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 91(11), 5045-5069.
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., ... & Kindermann, M. (2015). An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10663-10668.
- Hristov, A. N., Harper, M., Meinen, R., Day, R., Lopes, J., Ott, T., ... & Randles, C. A. (2017). Discrepancies and uncertainties in bottom-up gridded inventories of livestock methane emissions for the contiguous United States. *Environmental science & technology*, 51(23), 13668-13677.
- Hu, W., Liu, J., Ye, J., Wu, Y., Guo, Y., (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120, 333-339.
- Hu, W., Murphy, M. R., Constable, P. D., & Block, E. (2007). Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of dairy cows postpartum. *Journal of dairy science*, 90(7), 3367-3375
- Hughes, C. E. (1998). Monograph of *Leucaena (Leguminosae: Mimosoideae)*. *Syst Bot Monogr* 55:1-244.
- Hunt, C. W., Paterson, J. A., Williams, J. E. (1985). Intake and digestibility of alfalfa-tall fescue combination diets fed to lambs. *Journal of Animal Science* 60, 301-312.

- Hulshof, R. B. A., Berndt, A., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., van Zijderveld, S. M., Newbold, J. R. (2012). Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets, *J. Anim. Sci.*, 90, 2317–2323. doi: 10.2527/jas.2011-4209.
- Hutchinson, J., Dalziel, J. M. (1954). *Flora of West Tropical Africa*. Crown Agents For overseas Government and administration. London. 1: 698-699.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Cameron, S. J. S., Gridwood, S. E., Davies, L., Tweed, J., Vallin, H., Scollan, N. D. (2015). Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microbial Biotechnology*, 8, 331-341.
- Ibrahim, J. A., Ayodele, E. A., Jegede, A. I., Kunle, Y. F. (2006). Comparative studies on *Khaya*. A. Juss (*Meliaceae*) in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5 (11), pp. 1154-1160.
- Ibrahim, M. A., Koorbanally, N. A., & Islam, M. S. (2014). Antioxidative activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes (α -glucosidase and α -amylase) by *Khaya senegalensis*. *Acta Pharmaceutica*, 64(3), 311-324.
- İlhan, D., Li, X., Brummer, E.C., Sakiroglu, M. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of Tetraploid Accessions of the *Medicago sativa-falcata* Complex. *Crop Sci.* 56: 1-11.
- IPCC, Field, C. B. (Ed.). (2014). *Climate change 2014—Impacts, adaptation and vulnerability: Regional aspects*. Cambridge University Press.
- Ivan, M., Mir, P. S., Koenig, K. M., Rode, L. M., Neill, L., Entz, T., & Mir, Z. (2001). Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research*, 41(3), 215-227.
- Iwamoto M., Asanuma, N., Hino, T. (1999). Effects of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*, *Anim. Sci. J.*, 70:471-478.
- Iwamoto, M., Asanuma, N., Hino, T. (2001). Effects of pH and electron donors on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbiota. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 72(2), pp.117-125.
- Jadhav, R. V., Kannan, A., Bhar, R., Sharma, O. P., Bhat, T. K., Gulati, A., ... & Sharma, V. K. (2017). Effect of tea (*Camellia sinensis*) seed saponin supplementation on growth performance, nutrient utilization, microbial protein synthesis and hemato-biochemical attributes of Gaddi Goats. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 17(2), 255-268.
- Jadhav, R. V., Kannan, A., Bhar, R., Sharma, O. P., Gulati, A., Rajkumar, K., ... & Verma, M. R. (2018). Effect of tea (*Camellia sinensis*) seed saponins on *in vitro* rumen fermentation, methane production and true digestibility at different forage to concentrate ratios. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 118-124.
- Jalc, D., Kišidayová, S., & Nerud, F. (2002). Effect of plant oils and organic acids on rumen fermentation *in vitro*. *Folia microbiologica*, 47(2), 171-177.
- Jalc, D., & Čertík, M. (2005). Effect of microbial oil, monensin and fumarate on rumen fermentation in artificial rumen. *Czech J. Anim. Sci.*, 50(10), 467-472.

- Jalc, D., Certik, M., Kundrikova, K., & Namestkova, P. (2007). Effect of unsaturated C. *Veterinarni Medicina*, 52(3), 87-94.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C. R., Marquardt, S., Kreuzer, M., Leiber, F. (2011). Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 163: 231-243.
- Jayanegara, A., Wina, E., & Takahashi, J. (2014). Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(10), 1426.
- Jenkins, T. C., Bridges Jr, W. C. (2007). Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 778-789.
- Johnson, K. A., Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle, *J. Anim. Sci*, 73, 2483–2492.
- Jones, R. J. (1994). Management of anti-nutritive factors – with special reference to *Leucaena*. In: Gutteridge, R.C., Shelton, H.M. (Eds). Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. CABI, Wallingford, UK
- Jones, R. M., Bunch, G. A. (2000). A further note on the survival of plants of *Leucaena leucocephala* in grazed stands. *Trop. Agric.* 77, 109-110.
- Kaensombath, L., & Frankow-Lindberg, B. E. (2012). Effect of harvesting interval on biomass yield and chemical composition of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) for feeding pigs in Laos. *Field Crops Research*, 128, 71-75.
- Kakengi, A. M., Shem, M. N., Mtengeti, E. P., Otsyina, R. (2001). *Leucaena leucocephala* leaf meal as supplement to diet of grazing dairy cattle in semi arid Western Tanzania. *Agroforestry Systems*, 52(1), 73-82.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Ozay, O., & Ozkose, E. (2005). Chemical composition and its relationship to *in vitro* gas production of several tannin containing trees and shrub leaves. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 18(2), 203-208.
- Kamra, D. N., Pawar, M., Singh, B. (2012). Effect of plant secondary metabolites on rumen methanogens and methane emissions by ruminants. *Dietary Phytochemicals and Microbes*, 351-370
- KanthaRaju, M., Jagadeeswary, V., Satyanarayan, K., Veeranna, K., Rajeshwari, Y., Nagaraj, C., Shilpa Shree, J. (2018). Intensive Cultivation of *Medicago sativa* for Sustainable Milk Production An Action Oriented Approach. *International Journal of Livestock Research*, 8(4), 101-108.
- Kayouli, C., Van Nevel, C. J., Dendooven, R., Demeyer, D. I. (1986). Effect of defaunation and refaunation of the rumen fermentation and nitrogen flow in the duodenum of sheep. *Archiv für Tierernährung* 36, 827-838.
- Keay, R. W. J., Onochie, C. F. A., Stanfield, D. P. (1964). *Nigerian Trees*, Vol. II Department of Forest Research, Ibadan.

- Kennedy, P. M., Charmley, E. (2012). Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Anim. Prod. Sci.* 52, 225-239.
- Kertz, A. F. (2010). Urea feeding to dairy cattle: A historical perspective and review. *The Professional Animal Scientist*, 26(3), pp.257-272.
- Ketzis, J. K., Vercruyssen, J., Stromberg, B. E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J. G. (2006). Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet Parasitol* 2006; 139:321-35.
- Khadem, A. A., Sharifi, M., Afzalzadeh, A., Rezaeian, M. (2009). Effects of diets containing alfalfa hay or barley flour mixed alfalfa silage on feeding behavior, productivity, rumen fermentation and blood metabolites in lactating cows. *Animal Science Journal*, 80(4), 403–410. Doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00653.x
- Khafipour, E., Krause, D. O., & Plaizier, J. C. (2009). Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1712–1724. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1656>
- Khan, M. A., Weary, D. M., von Keyserlingk, M. A. G. (2011). Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *J. Dairy Sci.* 94(7):3547-3553. doi:10.3168/jds.2010-3871.
- Khatab, I. M., Salem, A. Z. M., Abdel-Wahed, A. M., & Kewan, K. Z. (2013). Effects of urea supplementation on nutrient digestibility, nitrogen utilisation and rumen fermentation in sheep fed diets containing dates. *Livestock Science*, 155(2-3), 223-229.
- Kicel, A., & Olszewska, M. A. (2015). Evaluation of antioxidant activity, and quantitative estimation of flavonoids, saponins and phenols in crude extract and dry fractions of *Medicago lupulina* aerial parts. *Natural product communications*, 10(3), 1934578X1501000326.
- Kim, S. H., Mamuad, L. L., Kim, E. J., Sung, H. G., Bae, G. S., Cho, K. K., ... & Lee, S. S. (2018). Effect of different concentrate diet levels on rumen *Sivisi* inoculum used for determination of *in vitro* rumen fermentation, methane concentration, and methanogen abundance and diversity. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 359-367.
- Klevesahl, E. A., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C., Wickersham, T. A., Farmer, C. G., Arroquy, J. I., & Johnson, D. E. (2003). Effect of a wide range in the ratio of supplemental rumen degradable protein to starch on utilization of low-quality, grass hay by beef steers. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1-4), 5-20.
- Klop, G., Hatew, B., Bannink, A., Dijkstra, J. (2016). Feeding nitrate and docosahexaenoic acid affects enteric methane production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 99: 1161-1172.
- Kljak, K., Pino, F., Heinrichs, A. J. (2017). Effect of forage to concentrate ratio with sorghum silage as a source of forage on rumen fermentation, N balance, and purine derivative excretion in limit-fed dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 100:213-223.
- Kolver, E. S., de Veth, M. J., Roche, J. R., Chand, A. (2002): Enhancing ruminal concentrations of conjugated linoleic acid and vaccenic acid. *Journal of Animal Science*, 80 (Suppl.1)/*Journal of Dairy Science*, 85(Suppl.1), 183 (Abstr.).

- Koukoura, Z., Kyriazopoulos, A. P., & Parissi, Z. M. (2009). Growth characteristics and nutrient content of some herbaceous species under shade and fertilization. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (2), 431-438.
- Kozłowska, M., Cieślak, A., Józwiak, A., El-Sherbiny, M., Stochmal, A., Oleszek, W., ... & Szumacher-Strabel, M. (2020). The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 1922-1930.
- Köster, H. H., Woods, B. C., Cochran, R. C., Vanzant, E. S., Titgemeyer, E. C., Grieger, D. M., ... & Stokka, G. (2002). Effect of increasing proportion of supplemental N from urea in prepartum supplements on range beef cow performance and on forage intake and digestibility by steers fed low-quality forage. *Journal of Animal Science*, 80(6), 1652-1662.
- Krause, K. M., & Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal feed science and technology*, 126 (3-4), 215-236.
- Kropp, J. R., Johnson, R. R., Males, J. R., & Owens, F. N. (1977). Microbial protein synthesis with low quality roughage rations: Isonitrogenous substitution of urea for soybean meal. *Journal of Animal Science*, 45(4), 837-843.
- Kuchenmeister, K., Z., Kyriazopoulos, A. P., Parissi, Z. M. (2009). Growth characteristics and nutrient content of some herbaceous species under shade and fertilization. *Spanish J. Agric. Res.*, 7(2): 431-438.
- Kuchenmeister, K., Kuchenmeister, F., Kayser, M., WRAGE, M. N., & Isselstein, J. (2013). Influence of drought stress on nutritive value of perennial forage legumes. *Int. J., Plant Prod.*, 7(4): 693-710.
- Kubelková, P., Jalč, D., Jančík, F., Homolka, P. (2018). *In vitro* ruminal fermentation and fatty acid production by various oil seeds. *South African Journal of Animal Science*, 48(3), 526. doi:10.4314/sajas. v48i3.13.
- Kubkomawa, I. H., Ogundu, M. A., Okoli, I. C., & Udedibie, A. B. I. (2017). Biochemical profiling of the values of dry season feed resources in pastoralcattle environment in Nigeria. *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*, 4(4), 23-36.
- Kume, S. (2002). In: Takahashi, J., Young, B.A. (Eds.), Establishment of Profitable Dairy Farming System on Control of Methane Production in Hokkaido Region in Greenhouse Gases and Animal Agriculture. *Elsevier Science*, Obihiro, Japan, pp. 87-94.
- Kutlu, H. R. (2008). Yem Değerlendirme ve Analiz Yöntemleri Ders Notları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana.
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R. A., McCrabb, G. J. (1999). Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of nutrition*, 81(3), 227-234.
- Kreuzer, M., Kirchgessner, M., Müller, H. L. (1986a). Effect of defaunation on the loss of energy in wethers fed different quantities of cellulose and normal or steam flaked maize starch, *Anim. Feed Sci. Technol*, 16: 233-241.

- Latham, E. A., Anderson, R. C., Pinchak, W. E., & Nisbet, D. J. (2016). Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. *Frontiers in microbiology*, 7, 228.
- Larsen, P. H., Middleton, C. H., Bolam, M. J., Chamberlain, J. (1998). *Leucaena* in large-scale grazing systems: challenges for development. In: Shelton, H.M., Gutteridge, R.C., Mullen, B.F., Bray, R.A. (Eds.), *Leucaena – Adaptation, Quality and Farming Systems*. Australian Centre for *International Agricultural Research*, Canberra, pp. 324-330.
- Lazzarini, I., Detmann, E., Sampaio, C. B., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. D. C., Souza, M. A. D., & Oliveira, F. A. (2009). Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(10), 2021-2030.
- le Houérou, H. N. (1980). Chemical composition and nutritive value of browse in tropical West Africa. In: H.N. le Houérou (ed), *Browse in Africa: The current state of knowledge*. International Symposium on Browse in Africa. April 8-12. ILCA, Addis Ababa, Ethiopia, pp. 261-290.
- Le Thi Ngoc Huyen, H. Q., Do, P. T., & Leng, R. A. (2010). Nitrate as fermentable nitrogen supplement to reduce rumen methane production. *Livestock Research for Rural Development*, 22(8).
- Lee, G., Hennessy, D. W., Nolan, J. V., & Leng, R. A. (1987). Responses to nitrogen and maize supplements by young cattle offered a low-quality pasture hay. *Australian Journal of Agricultural Research*, 38(1), 195-207.
- Lee, C., Beauchemin, K. A. (2014). A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance, *Can. J. Anim. Sci.*, 94 pp. 557-570.
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., Beauchemin, K. A., (2015a). Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum, *J. Anim. Sci.*, 93, 2405–2418. doi: 10.2527/jas.2014-8851.
- Lee, C., Araujo, R., Koenig, K., Beauchemin, K. (2015b). Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93:2391–2404. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8845>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017). *In situ* and *in vitro* evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. *Animal Feed Science and Technology*, 231, 97-106.
- Lengowski, M. B., Zuber, K. H., Witzig, M., Mohring, J., Boguhn, J., & Rodehutschord, M. (2016). Changes in rumen microbial community composition during adaption to an *in vitro* system and the impact of different forages. *PLoS One*, 11(2), e0150115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150115>
- Leng, R. A. (1990). Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews* 3, 277-303.

- Leng, R. A. (2008). Decline in available world resources; implications for livestock production systems in Asia. *Livestock Research for Rural Development*, 20, Article 8 <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd20/1/leng20008.htm>
- Leng, R. A., & Preston, T. R. (2010). Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. *Livestock Research for Rural Development*, 22 (221).
- Leng, R. A. (2014). Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science*, 54(5), 519-543.
- Li, L., Davis, J., Nolan, J., & Hegarty, R. (2012). An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. *Animal Production Science*, 52(7), 653-658
- Li, F., Lin, H., Chang, L., Shi, H. (2007). Energy evaluation on the cropping mode and the cropping breeding coupled mode in the ecotone between farming and cropping areas. *Acta Agrestia Sinica* 15, 322-326.
- Li, L., Davis, J., Nolan, J., Hegarty, R. (2012). An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source, *Anim. Prod. Sci*, 52, 653-658. doi: 10.1071/an11254.
- Liang, H., Zhao, E., Feng, C., Wang, J., Xu, L., Li, Z., ... & Qu, M. (2020). Effects of slow-release urea on *in vitro* rumen fermentation parameters, growth performance, nutrient digestibility and serum metabolites of beef cattle. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(4), 1399-1414.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T., & Itabashi, H. (2003). Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3330-3336.
- Lillis, L., Boots, B., Kenny, D. A., Petrie, K., Boland, T. M., Clipson, N., Doyle, E. M. (2011). The effect of dietary concentrate and soya oil inclusion on microbial diversity in the rumen of cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1426–1435. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05154.x.
- Lin, M., Schaefer, D. M., Guo, W. S., Ren, L. P., and Meng, Q. X. (2011). Comparisons of *in vitro* nitrate reduction, methanogenesis, and fermentation acid profile among rumen bacterial, protozoal and fungal fractions”. *Asian Australas. J. Anim. Sci*, 24, 471-478. Doi: 10.5713/ajas.2011.10288.
- Lin, M., Schaefer, D. M., Zhao, G. Q., & Meng, Q. X. (2013). Effects of nitrate adaptation by rumen inocula donors and substrate fiber proportion on *in vitro* nitrate disappearance, methanogenesis, and rumen fermentation acid. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 7(7), 1099.
- Linn, J. G. (1998). National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products. Designing Foods: Animal Product Options in the Market place. Washington (DC): National Academies Press (US); 1988. Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows.

- Liu, K. H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Chung, H. S., ... Ishida, T. (2017). Discovery of nitrate CPK NLP signalling in central nutrient–growth networks, *Nature*, 545(7654), 311.
- Liu, C., Qu, Y. H., Guo, P. T., Xu, C. C., Ma, Y., Luo, H. L. (2018). Effects of dietary supplementation with alfalfa (*Medicago sativa* L.) on lamb growth performance, nutrient digestibility, and plasma parameters. *Animal Feed Science and Technology* 236 (2018) 98–106.
- Liu, X., Xu, Q., Wang, D., Wu, Y., Yang, Q., Liu, Y., ... & Yang, G. (2019). Unveiling the mechanisms of how cationic polyacrylamide affects short-chain fatty acids accumulation during long-term anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Water research*, 55, 142-151.
- Livingstone, K. M., Humphries, D. J., Kirton, P., Kliem, K. E., Givens, D. I., & Reynolds, C. K. (2015). Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 4000-4011.
- Longo, C., Nozella, E. F., Cabral Filho, S. L. S., Lavorenti, N., Vitti, D. M. S. S., & Abdalla, A. L. (2008). Voluntary intake, apparent digestibility and nitrogen balance by sheep supplemented with *Leucaena leucocephala*. *Livestock Research for Rural Development*, 20(11).
- Lopez, F., Garcia, M. M., Yanez, R., Tapias, R., Fernandez, M. J., Diaz, M. J. (2008). *Leucaena* species valoration for biomass and paper production in 1 and 2 year harvest. *Bioresour Technol*, 99:4846e53.
- Loor, J., Herbein, J., Jenkins, T. (2002). Nutrient digestion, biohydrogenation, and fatty acid profiles in blood plasma and milk fat from lactating Holstein cows fed canola oil or canolamide. *Animal Feed Science and Technology* 97, 65-82.
- Lu, C. D., & Jorgensen, N. A. (1987). Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *The Journal of nutrition*, 117(5), 919-927.
- Lu, Z., Gui, H., Yao, L., Yan, L., Martens, H., Aschenbach, J. R., & Shen, Z. (2015). Short-chain fatty acids and acidic pH upregulate UT-B, GPR41, and GPR4 in rumen epithelial cells of goats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(4), R283-R293.
- Lu, Z., Shen, H., & Shen, Z. (2019). Effects of Dietary-SCFA on microbial protein synthesis and urinal urea-N excretion are related to microbiota diversity in rumen. *Frontiers in physiology*, 10, 1079.
- Lund, P., Dahl, R., Yang, H. J., Hellwing, A. L. F., Cao, B. B., Weisbjerg, M. R. (2014). The acute effect of addition of nitrate on *in vitro* and *in vivo* methane emission in dairy cows. *Anim. Prod. Sci.* 2014; 54: 1432-1435.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.

- Maia, M. D. O., Susin, I., Ferreira, E. M., Nolli, C. P., Gentil, R. S., Pires, A. V., & Mourão, G. B. (2012). Intake, nutrient apparent digestibility and ruminal constituents of sheep fed diets with canola, sunflower or castor oils. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(11), 2350-2356.
- Maccarana, L., Cattani, M., & Bailoni, L. (2013). Rumen *in vitro* gas production of combinations between slowly and rapidly fermentable fibre sources. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(3), 229-233.
- Maccarana, L., Cattani, M., Tagliapietra, F., Bailoni, L., & Schiavon, S. (2016). Influence of main dietary chemical constituents on the *in vitro* gas and methane production in diets for dairy cows. *Journal of animal science and biotechnology*, 7(1), 54.
- Machmüller, A., Ossowski, D. A., & Kreuzer, M. (2006). Effect of fat supplementation on nitrogen utilisation of lambs and nitrogen emission from their manure. *Livestock Science*, 101(1-3), 159-168.
- Macome, F. M., Pellikaan, W. F., Schonewille, J. T., Bannink, A., Van Laar, H., Hendriks, W. H., ... & Cone, J. W. (2017). *In vitro* rumen gas and methane production of grass silages differing in plant maturity and nitrogen fertilisation, compared to *in vivo* enteric methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 230, 96-102.
- Maczulak, A. E., Dehority, B. A. and Palmquist, D. L. (1981). Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 856-862.
- Majewska, M.P., Miltko, R., Bełżęcki, G., Skomial, J., Kowalik, B. (2017). Supplementation of rapeseed and linseed oils to sheep rations: effects on ruminal fermentation characteristics and protozoal populations. *Czech J. Anim. Sci.*, 62, 527-538.
- Makkar, H. P., Becker, K., Abel, H. J., & Szegletti, C. (1995). Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(4), 495-500.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? *Agroforestry systems*, 40(1), 59-68.
- Makkar, H. P. (2003). Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual. *Springer Science & Business Media*.
- Makkar, H. P. (2005). *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 291-302.
- Makut, M. D., Gyar, S. D., Pennap, G. R. I., Anthony, P. (2008). Phytochemical screening and antimicrobial activity of the ethanolic and methanolic extracts of the leaf and bark of *Khaya senegalensis*. *Afr J. Biotechnol*; 7 :1216-9.
- Malik, P. K., Singhal, K. K. (2009). Effect of lucerne (*Medicago sativa*) fodder supplementation on nutrient utilization and enteric methane emission in male buffalo calves fed on wheat straw based total mixed ration. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 79(4).

- Mamvura, C. I., Cho, S., Mbiriri, D. T., Lee, H., Choi, H. J. (2014). Effect of encapsulating nitrate in sesame gum on *in vitro* rumen fermentation parameters, *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*, 27, 1577-1583.
- Marinho, A. A. M. (1997). Modifications in the reticulum-rumen of sheep fed high nitrate diets. I. Their effects on bacteria and ciliates. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 92: 124-128 [in Portuguese, English abstract].
- Marini, J. C., & Van Amburgh, M. E. (2003). Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *Journal of animal science*, 81(2), 545-552.
- Martin, C., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M. (2009). Decrease in methane emissions in dairy cows with increase in dietary linseed content, *In proceedings of the British Society of Animal Science*, 30 March-1 April 2009, Southport, UK, p. 21.
- Martin, C., Morgavi, D., & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365.
- Martin, N. P. (2014). Perspectives of alfalfa in North America. *Legume Perspect.* pp. 7-8.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J. Dairy Sci.* 93, 3684-3698.
- Mazinani, M., Naserian, A. A., Mesgaran, M. D., & Valizadeh, R. (2018). Effects of adding coated urea on *in vitro* gas production of dairy cow. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(2), 343-350.
- Meale, S. J., Chaves, A. V., Baah, J., McAllister, T. A. (2012). Methane production of different forages in *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25, 86-91.
- Meena, O. P., Maurya, B. R., Meena, V. S. (2013). Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica, *Agric Sust Dev*, 1, 53-56.
- Mertens, D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of dairy science*, 80(7), 1463-1481.
- Messana, J. D., Berchielli, T. T., Arcuri, P. B., Reis, R. A., Canesin, R. C., Ribeiro, A. F., ... & Fernandes, J. J. D. R. (2013). Rumen fermentation and rumen microbes in Nelore steers receiving diets with different lipid contents. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(3), 204-212.
- Meuret, M., Boza, J., Narjisse, N. and Nastis, A. (1990). Evaluation and utilization of rangeland feeds by goats. In: Morand-Fehr, P (Editors). *Goat Nutrition*, PUDOC. Wageningen, The Netherlands, pp.161-170.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K., & Mathison, G. W. (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), 231-243.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., Wilkinson, R. G. (2012). *Animal Nutrition Seventh Edition*. Prentice Hall, Harlow, England.

- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93, 217±222.
- Menke, K. H., Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis.
- Merry, R. J., Lee, M. R. F., Davies, D. R., Dewhurst, R. J., Moorby, J. M., Scollan, N. D., Theodorou, M. K. (2006). Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. *In vitro* and *in vivo* studies of nitrogen utilization. *J. Anim. Sci.* 84:3049-3060.
- McGinn, S. M., Bodas, K. A., Coates, T., Colombatto, D. (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid, *Journal of animal science*, 82(11), 3346-3356.
- McGinn, M., Beauchemin, S. M., Entz, K. A., Okine, T., Harstad, E. K., McAllister, T. A. (2015). Impact of ruminal pH on enteric methane emissions, *Journal of Animal Science*, 93(4), 1760-1766
- McMurphy, C. P., Sexten, A. J., Mourer, G. L., Sharman, E. D., Trojan, S. J., Rincker, M. J., Coblenz, W. K., Lalman, D. L. (2014). Effects of including saponins (Micro-Aid*) on intake, rumen fermentation and digestibility in steers fed low-quality prairie hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 190, 47-58.
- McSweeney, C. S., Ngu, N. T., Halliday, M. J., Graham, S. R., Giles, H. E., Dalzell, S. A., & Shelton, H. M. (2011, July). Enhanced ruminant production from leucaena: new insights into the role of the 'leucaena bug'. In 'SAADC 2011 strategies and challenges for sustainable animal agriculture–crop systems. Vol. I: invited papers. In *Proceedings of the 3rd international conference on sustainable animal agriculture for developing countries*, Nakhon Ratchasima, Thailand (pp. 26-29).
- Michaud, R., Lehman, W. F., Rumbaugh, M. D. (1988). World distribution and historical development. In A.A. Hanson[ed.], D.K. Barnes and R.R. Hill Jr. [co-eds], *Alfalfa and alfalfa improvement*, Agronomy monograph 29, 93-124. American Society of Agronomy, Crop Science Society of Agronomy, and Soil Science Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Miller, E. L. (1973). Evaluation of foods as sources of nitrogen and amino acids. *Proc. Nutr. Soc.* 32:79.
- Milton, C. T., Brandt Jr, R. T., & Titgemeyer, E. C. (1997). Urea in dry-rolled corn diets: finishing steer performance, nutrient digestion, and microbial protein production. *Journal of Animal Science*, 75(5), 1415-1424.
- Min, B. R., Solaiman, S., Shange, R., Eun, J. S. (2014). Gastrointestinal bacterial and methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannin-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *International journal of microbiology*, 58: 64-69.
- Mirzaei-Aghsaghali, A. & Meheri-Sis, N. (2011). Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding strategies. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6(9), 888-908.

- Mirzaei, M., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Kazemi Bonchenari, M., Riasi, A., Nabipour, A., van den Borne, J. J. G. C. (2015). Effects of supplementation level and particle size of alfalfa hay on growth characteristics and rumen development in dairy calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99(3):553-564. doi:10.1111/jpn.12229.
- Miyazaki, A. (1977). Effects of dietary nitrate on the performance of ruminants, *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 48: 53-61.
- Moate, P. J., Williams, S. R. O., Jacobs, J. L., Hannah, M. C., Beauchemin, K. A., Eckard, R. J., & Wales, W. J. (2017). Wheat is more potent than corn or barley for dietary mitigation of enteric methane emissions from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7139-7153.
- Moate, P. J., Williams, S. R. O., Deighton, M. H., Hannah, M. C., Ribaux, B. E., Morris, G. L., ... & Wales, W. J. (2019). Effects of feeding wheat or corn and of rumen fistulation on milk production and methane emissions of dairy cows. *Animal Production Science*, 59(5), 891-905.
- Mohsen, K., Valizadeh, R. (2019). Nutritive Value of Some Rangeland Plants Compared to *Medicago sativa*. *Journal of Rangeland Science*, 9(2), 136-150.
- Mokoboki, H. K., Sebola, A. N., Ravhuhali, K. E., & Nhlane, L. (2019). Chemical composition, *in vitro* ruminal dry matter degradability and dry matter intake of some selected browse plants. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1587811.
- Molina Botero, I. C., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G. A., Barahona Rosales, R. (2013). *In vitro* methane production from two tropical grasses alone or in combination with *Leucaena leucocephala* or *Gliricidia sepium*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15-31.
- Molina-Botero, I. C., Arroyave-Jaramillo, J., Valencia-Salazar, S., Barahona-Rosales, R., Aguilar-Pérez, C. F., Burgos, A. A., ... & Ku-Vera, J. C. (2019). Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 1-11.
- Molina-Alcaide, E.G, M. A., & Aguilera, J. F. (1996). The voluntary intake and rumen digestion by grazing goats and sheep of a low-quality pasture from a semi-arid land. *Livestock Production Science*, 52(1), 39-47.
- Moorby, J. M., Evans, R. T., Scollan, N. D., MacRae, J. C., & Theodorou, M. K. (2006). Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Evaluation in dairy cows in early lactation. *Grass and Forage Science*, 61(1), 52-59.
- Moran, J. (2005). Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia.
- Morgavi, D. P., Martin, C., Jouany, J. P., and Ranilla, M. J. (2012). Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause effect relationship. *The British Journal of Nutrition* 107, 388–397.
- Morsy, T. A., Kholif, A. E., Kholif, S. M., Kholif, A. M., Sun, X., & Salem, A. Z. (2016). Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Annals of Animal Science*, 16(1), 209-222.

- Moss, A. R., Jouany, J. P., Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231-253.
- Mosley, S. A., Mosley, E. E., Hatch, B., Szasz, J. I., Corato, A., Zacharias, N., ... & McGuire, M. A. (2007). Effect of varying levels of fatty acids from palm oil on feed intake and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 987-993.
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2010-2037.
- Muhlisin, L. M., Yusiati, C., Hanim, M. A., Anas, Muktiari, B. N. (2019). Effect of *Leucaena leucocephala* substitution on *in vitro* rumen fermentation and methane emission in thin tailed-sheep. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 387 012124. doi:10.1088/1755-1315/387/1/012124
- Muir, J. P., Ocumpaugh, W. R., Read, J. C. (2003). Spring forage yield and nutritive value of Texas black medic accessions. *Agron. J.*, 95 (4): 908-912.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., Koong, L. J. (1982). Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J. Animal Sci.* 55, 279–296.
- Musco, N., Koura, I. B., Tudisco, R., Awadjihè, G., Adjolohoun, S., Cutrignelli, M. I., ... & Calabrò, S. (2016). Nutritional characteristics of forage grown in south of Benin. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(1), 51.
- Nair, J., Christensen, D., Yu, P., Beattie, A. D., McAllister, T., Damiran, D., & McKinnon, J. J. (2018). Effect of variety and level of inclusion of barley silage selected for varying neutral detergent fiber digestibility on ruminal fermentation and nutrient digestibility in feedlot heifers fed backgrounding and finishing diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(2), 268-282.
- Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 523-632). Springer, Dordrecht.
- Nakatani, M., Abdelgaleil, S. A., Kassem, S. M., Takezaki, K., Okamura, H., Iwagawa, T., & Doe, M. (2002). Three new modified limonoids from *Khaya senegalensis*. *Journal of natural products*, 65(8), 1219-1221.
- Nathaly, C., Romero, J., Huws, S., & Vargas, E. (2019). Effect of dietary olive oil and palm oil on rumen bacterial composition in dairy cows. *Access Microbiology*, 1(1A), 888.
- Negesse, T., Bayssa, M., & Banerjee, S. (2018). An *in vitro* assessment of nutritive value of nine roughages supplemented with concentrates containing graded levels of ground linseed “*Linum usitatissimum*”. *J Dairy Vet Anim Res*, 7(6), 304-312.
- Nemati, M., Amanlou, H., Khorvash, M., Mirzaei, M., Moshiri, B., Ghaffari, M. H. (2016). Effect of different alfalfa hay levels on growth performance, rumen fermentation, and structural growth of Holstein dairy calves. *J. Anim. Sci.* 2016.94:1-8. doi: 10.2527/jas2015-0111.

- Newbold J. R., van Zijderveld S. M., Hulshof R. B. A., Fokkink W. B., Leng R. A., Terencio P., Powers, W. J., van Adrichem, P. S. J., Paton, N. D., Perdok, H. B. (2014). The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. *J. Anim. Sci.* 92, 5032–5040. 10.2527/jas.2014-7677.
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen, *Frontiers in Microbiology*, 6:1-6.
- Neya, O. (2006). Conservation of tree seeds from tropical drylands PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands 160 p.
- Nguyen, V. T., Wanapat, M., Khejornsart, P., & Kongmun, P. (2012). Nutrient digestibility and ruminal fermentation characteristic in swamp buffaloes fed on chemically treated rice straw and urea. *Tropical animal health and production*, 44(3), 629-636.
- Nguyen, S. H., Barnett, M. C., & Hegarty, R. S. (2016). Use of dietary nitrate to increase productivity and reduce methane production of defaunated and faunated lambs consuming protein-deficient chaff. *Animal Production Science*, 56(3), 290-297.
- Njidda, A. A. (2010). Chemical composition, fibre fraction and anti-nutritional substances of semi-arid browse forages of North-Eastern Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 18(2).
- Njidda, A. A., Olatunji, E. A., Raji, A. Y. (2012). Semi-arid browse forages: Their antinutritive substances and in sacco neutral detergent fibre and organic matter degradability. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 1(6), 2.
- Nolan, J. V., Hegarty, R. S., Hegarty, J., Godwin, I. R., Woodgate, R. (2010). Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep, *Anim. Prod. Sci.* 50, 801-806. doi: 10.1071/AN09211.
- NRC, (2001). Nutrient requirements of dairy cattle (7th ed.). Washington, DC: National Academy Press.
- Nur Atikah, I., Alimon, A. R., Yaakub, H., Abdullah, N., Jahromi, M. F., Ivan, M., Samsudin, A. A. (2018). Profiling of rumen fermentation, microbial population and digestibility in goats fed with dietary oils containing different fatty acids. *BMC Veterinary Research*, 14:344.
- Ntiranyibagira E., Niteen, V., Patil Shekbar R, Bhagwat Abdul L, Kang X, Hongnan L (2015). Effects of different levels of urea supplementation on nutrient intake and growth performance in growing camels fed roughage based complete pellet diets. *Anim. Nutr.* 1:356-361
- Odenyo, A.A., Osuji, P.O., Karanfil, O., Andinew, K. (1997). Microbial evaluation of *Acacia angustissima* as a protein supplement for sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65, 99-112.
- Offiah, N. V., Makama, S. Elisha, L., Makoshi, M. S., Gotep, J. G., Dawurung, C. J., Oladipo, O. O., Lohlum, A. S., and Shamaki, D. (2011). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of animal diarrhoea in Plateau State, Nigeria. *BMC Vet. Res.* 7:1.

- Oh, Y. K., Kim, J. H., Kim, K. H., Choi, C. W., Kang, S. W., Nam, I. S., Kim, D. H., Song, M. K., Kim, C. W., Park, K. K. (2008). Effects of level and degradability of dietary protein on ruminal fermentation and concentrations of soluble non-ammonia nitrogen ruminal and omasal digesta of Hanwoo steers. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 21: 392-403.
- Oji, U. I., Etim, H. E., Okoye, F. C. (2007). Effects of urea and aqueous ammonia treatment on the composition and nutritive value of maize residues. *Small Ruminant Res.* 69: 232-236.
- Ojo, O. A., Fagade, O. E. (2002). Persistence of Rhizobium inoculants originating from *Leucaena leucocephala* fallowed plots in Southwest Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 1(1):23-7.
- Oldick, B. S., & Firkins, J. L. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *Journal of Animal Science*, 78(9), 2412-2420.
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Weisbjerg, M. R., Højberg, O., Larsen, M. K., Lund P., (2016). Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6191-6205.
- Olowokudejo, J. D., Nyananyo, B. L. (1990). Taxonomy of Medicinal Plants. 1. Epidermal Morphology of the genus *Khaya* (*Meliaceae*) in West Africa. *Feddes. Repert. Berlin* 101:7-8, 401-407.
- Ørskov, E.R., McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92, 499±503.
- Ørskov, E. R., Liu, J. X., Chen, X. B. (1999). Optimization of steam treatment as a method for upgrading rice straw as feeds. *Animal Feed Science and Technology* 76, 345-357.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya.
- Ouédraogo-Koné, S., Kaboré-Zoungrana, C. Y. and Ledin, I. (2006). Behaviour of goats, sheep and cattle on natural pasture in the sub-humid zone of West Africa. *Livestock Science*, 105, 224-252.
- Owens, F. N., Zinn, R. (1988). Protein metabolism of ruminant animals. In: Church, D. C. (Ed.), *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. Waveland Press Inc., Prospect Heights, IL, USA, pp. 227-249.
- Padmavathy, P., Shobha, S. (1987). Effect of processing on protein quality and mimosine content of Soobabul (*Leucaena leucocephala*). 1. *Food Sci. Technol.* 24, 180-182.
- Pal, K., Patra, A. K., Sahoo, A., & Mandal, G. P. (2014). Effect of nitrate and fumarate in *Prosopis cineraria* and *Ailanthus excelsa* leaves-based diets on methane production and rumen fermentation. *Small Ruminant Research*, 121(2-3), 168-174.
- Palmquist, D. L. (1988). The feeding value of fats. In E. R. Ørskov (Ed.), *Feed science* (pp. 293-311). Amsterdam, Netherlands: *Elsevier Science Publishers*.

- Palmquist, D. L., & Jenkins, T. C. (2017). A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(12), 10061-10077.
- Pandey, V. C., Kumar, A. (2013). *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant for pulp and paper production. *Genet Resour Crop Evol*, 60(3): 1165-1171.
- Parker, D. S., Lomax, M. A., Seal, C. J., & Wilton, J. C. (1995). Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society*, 54(2), 549-563.
- Papachristou, T. G., and Nastis, A. S. (1996). Influence of deciduous broadleaved woody species in goat nutrition during the dry season in Northern Greece. *Small Ruminant Research*, 20: 15-22.
- Parkinson, T. J., Vermunt, J. J., & Malmo, J. (2010). Diseases of cattle in Australasia: a comprehensive textbook. New Zealand Veterinary Association Foundation for Continuing Education.
- Paterson, J. A., Klopfenstein, T. J., Britton, R. A. (1982). Digestibility of sodium hydroxide-treated crop residues when fed with alfalfa hay. *Journal of Animal Science* 54, 1056-1066.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 363-375.
- Patra, A. K. (2013). The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock science*, 155(2-3), 244-254.
- Patra, A. K., & Yu, Z. (2013). Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. *Bioresource technology*, 148, 352-360.
- Patra, A. K. (2014). Prediction of enteric methane emission from buffaloes using statistical models. *Agriculture, ecosystems & environment*, 195, 139-148.
- Patra, A. K., & Yu, Z. (2014). Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures *in vitro* while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresource technology*, 155, 129-135.
- Patra, A. K., Yu, Z. (2015). Effects of garlic oil, nitrate, saponin and their combinations supplemented to different substrates on *in vitro* fermentation, ruminal methanogenesis, and abundance and diversity of microbial populations, *Journal of applied microbiology*, 119(1), 127-138.
- Paula, E. M., da Silva, L. G., Brandao, V. L. N., Dai, X., & Faciola, A. P. (2019). Feeding canola, camelina, and carinata meals to ruminants. *Animals*, 9(10), 704.
- Petit, S. (2000). Fourrage ligneux et parcours des troupeaux de pasteurs peuls de l'Ouest burkinabé. Note de recherche. (Tree forage and grazing paths of fulani herds in the west of Burkina Faso. Research notes). *Bois et Forêts des Tropiques*, 265, 77-80.

- Penner, G. B., Steele, M. A., Aschenbach, J. R., & McBride, B. W. (2011). Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *Journal of Animal Science*, 89(4), 1108-1119.
- Petri, R. M., Schwaiger, T., Penner, G. B., Beauchemin, K. A., Forster, R. J., McKinnon, J. J., & McAllister, T. A. (2013). Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and environmental microbiology*, 79(12), 3744-3755.
- Petrović, Z. S. (2008). Polyurethanes from vegetable oils. *Polymer Reviews*, 48(1), 109-155.
doi: 10.1080/15583720701834224
- Piñeiro-Vázquez, A. T., Jiménez-Ferrer, G. O., Chay-Canul, A. J., Casanova-Lugo, F., Díaz-Echeverría, V. F., Ayala-Burgos, A. J., ... & Ku-Vera, J. C. (2017). Intake, digestibility, nitrogen balance and energy utilization in heifers fed low-quality forage and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology*, 228, 194-201.
- Piñeiro-Vázquez, A. T., Canul-Solis, J. R., Jiménez-Ferrer, G. O., Alayón-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Aguilar-Pérez, C. F., Ku-Vera, J. C. (2018). Effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* on rumen fermentation, methane production and population of rumen protozoa in heifers fed low-quality forage. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31:1738-1746.
- Pirondini, M., Colombini, S., Malagutti, L., Rapetti, L., Galassi, G., Zanchi, R., & Crovetto, G. M. (2015). Effects of a selection of additives on *in vitro* ruminal methanogenesis and *in situ* and *in vivo* NDF digestibility. *Animal Science Journal*, 86(1), 59-68.
- Phesatcha, K., & Wanapat, M. (2016). Improvement of nutritive value and *in vitro* ruminal fermentation of *Leucaena* silage by molasses and urea supplementation. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(8), 1136.
- Phuong, L. T. B., Preston, T. R., and Leng, R. A. (2011). Mitigating methane production from a ruminants; effect of supplementary sulphate and nitrate on methane production in an *in vitro* incubation using sugar cane stalk and cassava leaf meal as substrate. *Livestock Research for Rural Development. Volume 23, Article #22.*
<http://www.lrrd.org/lrrd23/2/phuo23022.htm>.
- Plaizier, J. C., 2004. Replacing chopped alfalfa hay with alfalfa silage in barley grain and alfalfa based total mixed rations for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87:2495-2505.
- Popova, M., Guyader, J., Silberberg, M., Seradj, A. R., Saro, C., Bernard, A., ... & Morgavi, D. P. (2019). Changes in the rumen microbiota of cows in response to dietary supplementation with nitrate, linseed, and saponin alone or in combination. *Applied and environmental microbiology*, 85(4).
- Pottinger, A. J., Hughes, C. E. (1995). A review of wood quality in *Leucaena*. In: Shelton HM, Piggin CM, Brewbaker JL(eds) *Leucaena* opportunities and limitations: proceedings of a workshop held in Bangor. ACIAR Proceedings, Can-berra, Indonesia, pp 98-102.
- Prasad, J. V. N. S., Korwar, G. R., Rao, K. V., Mandal, U. K., G.R.Rao, Srinivas, I., Kulkarni, H.D., (2011). Optimum stand density of *Leucaena leucocephala* for wood production in Andhra Pradesh, Southern India. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 227-235.

- Quiros, C. F., Bauchan, G. R. (1988). The Genus *Medicago* and the Origin of the *Medicago sativa* Complex, 93-124.
- Rabiee, A. R., Breinhild, K., Scott, W., Golder, H. M., Block, E., & Lean, I. J. (2012). Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of dairy science*, 95(6), 3225-3247.
- Radović, J., Sokolović, D., & Marković, J. J. B. A. H. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
- Radrizzani, A., Dalzell, S. A., Kravchuk, O., Shelton, H. M. (2010). A grazier survey of the long-term productivity of *leucaena* (*Leucaena leucocephala*)-grass pastures in Queensland. *Anim. Prod. Sci.* 50, 105-113.
- Ramos, S., Tejido, M. L., Martínez, M. E., Ranilla, M. J., & Carro, M. D. (2009). Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *Journal of Animal Science*, 87(9), 2924-2934.
- Ranilla, M. J., Carro, M. D., Valdés, C., Giráldez, F. J., & López, S. (1997). A comparative study of ruminal activity in Churra and Merino sheep offered alfalfa hay. *Animal Science*, 65(1), 121-128.
- Rebelo, L. R., Luna, I. C., Messana, J. D., Araujo, R. C., Simioni, T. A., Granja-Salcedo, Y. T., ... & Berchielli, T. T. (2019). Effect of replacing soybean meal with urea or encapsulated nitrate with or without elemental sulfur on nitrogen digestion and methane emissions in feedlot cattle. *Animal feed science and technology*, 257, 114293.
- Reid, J. T. (1953). Urea as a protein replacement for ruminants: A review. *Journal of Dairy Science*, 36(9), 955-996.
- Relling, A. E., & Reynolds, C. K. (2007). Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1506-1515.
- Reynolds, C. K., Humphries, D. J., Kirton, P., Kindermann, M., Duval, S., & Steinberg, W. (2014). Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(6), 3777-3789.
- Rira, M., Chentli, A., Boufenera, S., Bousseboua, H. (2015). Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of Sheep *in vitro*. *Energy Procedia* 74, 15-24.
- Rittner, U. & Reed, J. D. (1992). Phenolics and *In vitro* degradability of protein and fiber in West African browse. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 21-28
- Robinson, P. H., Veira, D. M., & Ivan, M. (1998). Influence of supplemental protein quality on rumen fermentation, rumen microbial yield, forestomach digestion, and intestinal amino acid flow in late lactation Holstein cows. *Canadian journal of animal science*, 78(1), 95-105.
- Rochfort, S., Parker, A. J., Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69: 299-322.

- Rodrigues, J. P. P., Ramin, M., Huhtanen, P., Aru, F., Detmann, E., Marcondes, M. I. (2017). Effect of soyabean oil supplementation and forage type on methane production and fibre digestibility using the *in vitro* gas production system, *Grass Forage Sci*, 00: 1-13.
- Rodríguez, B. M., Sandoval-Castro, C. A., Solorio-Sánchez, J., Sarmiento-Franco, L. A., Rojas-Herrera, R., & Klieve, A. V. (2014). *Leucaena leucocephala* in ruminant nutrition. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 17(2), 173-183.
- Rodríguez, B.M. A., Solorio-Sánchez F. J., Sandoval-Castro, C. A., Ahmed, A. M. M., Rojas Herrera, R., Briceño-Poot, E. G., Ku-Vera, J. C. (2014). Effect of intake of diets containing tannins and saponins on *in vitro* gas production and sheep performance'', *Anim. Reprod. Sci*, 54: 1486-1489.
- Rohweder, D. A., Barnes, R. F., Jorgensen, N. (1978). Proposed hay grading standards based on laboratory analyses for evaluating quality. *Journal of Animal Science* 47, 747-759.
- Rop O, Jurikova T, Mlcek J, Kramarova D, Sengee Z. (2009). Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains. *Scientia Horticulturae*, 122, 545-549.
- Roy, A., Mandal, G. P., & Patra, A. K. (2017). Effects of different vegetable oils on rumen fermentation and conjugated linoleic acid concentration *in vitro*. *Veterinary World*, 10(1), 11.
- Rubanza C D K, Shem M N, Bakengesa S S, Ichinohe T, Fujihara T. (2007). Effects of *Acacia nilotica*, *A. polyacantha* and *Leucaena leucocephala* leaf meal supplementation on performance of Small East African goats fed native pasture hay basal forages. *Small Ruminant Research*, 70, 165-173.
- Russell, J. B., & Wilson, D. B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of dairy science*, 79(8), 1503-1509.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 9-30.
- Sakthivel, P. C., Kamra, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. (2012). Effect of sodium nitrate and nitrate reducing bacteria on *in vitro* methane production and fermentation with buffalo rumen liquor. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(6), 812.
- Salem, H. B., Krzeminski, R., Ferlay, A., Doreau, M. (1993). Effect of lipid supply on *in vivo* digestion in cows: Comparison of hay and corn silage diets, *Canadian Journal of Animal Science*, 73, 547-557.
- Salem, A. Z. M., Salem, M. Z. M., El-Adawy, M. M., & Robinson, P. H. (2006). Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3-4), 251-267.
- Salem, A. Z. M., Gonzalez-Ronquillo, M, Camacho, L. M., Cipriano, M. (2011). Major chemical constituents of *Leucaena leucocephala* and *Salix babylonica* leaf extracts, *J. Trop Agric*; 49:95-8

- Salem, A. Z., Zhou, C. S., TAN, Z. L., Mellado, M., Salazar, M. C., Elghandopur, M. M., & Odongo, N. E. (2013). *In vitro* ruminal gas production kinetics of four fodder trees ensiled with or without molasses and urea. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(7), 1234-1242.
- Sánchez, N. R., Ledin, S., Ledin, I. (2006). Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua. *Agroforestry Systems*, 66, 231-242. doi:10.1007/s10457-005-8847-y.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H., Takahashi, J. (2004). Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with β 1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep, *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:129-142.
- Sar, C., Mwenya, B., Pen, B., Takaura, K., Morikawa, R., Tsujimoto, A., Kuwaki, K., Isogai, N.,;Shinzato, I., Asakura, Y., Toride, Y., Takahashi, J. (2005). Effect of ruminal administration of Escherichia coli wild type or a genetically modified strain with enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep, *Br. J. Nutr.* 94:691-697.
- Satter, L. D., Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*, *Brit. J. Nutr.* 32:199-208.
- Scandellari F, Ventura M, Gioacchini P, Antisari L V, Tagliavini M. (2010). Seasonal pattern of net nitrogen rhizodeposition from peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) trees in soils with different textures. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136, 162-168.
- Schmelzer, G. H., Achigan-Dako, E. G., Bosch, C. H. (2010). Medicinal plants of Tropical Africa Conclusions, recommendations based on PROTA 11(1): 'Medicinal plants' PROTA Foundation, Nairobi, Kenya, 148 p.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal feed science and technology*, 91(1-2), 21-40.
- Schöner, F. J. (1981). Schätzung des energetischen Futterwertes von Milchleistungsfuttern (Ergänzungsfutter für Milchkühe) unter besonderer Berücksichtigung des Hohenheimer Futterwerttestes. Dissertation, Bonn University, Bonn, Germany.
- Sebata, A., L. R. Ndlovu, and J. S. Dube (2011). Chemical composition, *in vitro* dry matter digestibility and *in vitro* gas production of five woody species browsed by Matebele goats (*Capra hircus* L.) in a semi-arid savanna, Zimbabwe. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, (170): 122.
- Sehested, J., Andersen, J. B., Aaes, O., Kristensen, N. B., Diernæs, L., Møller, P. D., & Skadhauge, E. (2000). Feed-induced changes in the transport of butyrate, sodium and chloride ions across the isolated bovine rumen epithelium. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 50(1), 47-55.
- Sharifi, M., Taghizadeh, A., Khadem, A. A., Hosseinkhani, A., Mohammadzadeh, H. (2018). Effects of nitrate supplementation and forage level on gas production, nitrogen balance and dry-matter degradation in sheep, *Animal Production Science. Animal Production Science*, 59(3), 515-523.
- Shelton, M., Dalzell, S. (2007). Production, economic and environmental benefits of *leucaena* pastures. *Trop. Grassl.* 41, 174-190.

- Shen, X Chang, G., Zhang, K., Xu, L., Jin, D., Bilal, M. S., & Guo, J. (2017). Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet. *Oncotarget*, 8(29).
- Shi, S., Valle-Rodríguez, J. O., Khoomrung, S., Siewers, V., & Nielsen, J. (2012). Functional expression and characterization of five wax ester synthases in *Saccharomyces cerevisiae* and their utility for biodiesel production. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 7.
- Silanikove, N., Gilboa, N., and Nitsan, Z. (1997). Interactions among tannins, supplementation and polyethylene glycol in goats given oak leaves: effects on digestion and food intake. *Animal Science* 64:479–483.
- Silivong, P., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2011). Effect of sulphur and calcium nitrate on methane production by goats fed a basal diet of molasses supplemented with Mimosa (*Mimosa pigra*) foliage. *Livestock Research for Rural Development*, 23(3), 2011.
- Singh, M., Roy, A. K., & Sharma, S. (2015). Augmentation of milk production by supplementing bypass fat in dairy animals. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 10(9), 476-488.
- Singh, G., Singh, R., Verma, P. K., Singh, R., & Anand, A. (2016). Anthelmintic efficacy of aqueous extract of *Zanthoxylum armatum* DC. seeds against *Haemonchus contortus* of small ruminants. *Journal of parasitic diseases*, 40(2), 528-532.
- Spanghero, M., Robinson, P. H., Zanfi, C., Fabbro, E. (2009). Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153, 153–157.
- Spanghero, M., Mason, F., Zanfi, C., & Nikulina, A. (2017). Effect of diets differing in protein concentration (low vs medium) and nitrogen source (urea vs soybean meal) on *in vitro* rumen fermentation and on performance of finishing Italian Simmental bulls. *Livestock Science*, 196, 14-21.
- Soliva, C. R., Meile, L., Cieślak, A., Kreuzer, M., Machmüller, A. (2004). Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis, *British Journal of Nutrition*, 92 (4), 689-700.
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M., Lucas, R. C., Louvandini, H., Kreuzer, M., Abdalla, A. L. (2013). Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition*, 67(3), 169-184.
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Lucas, R. C., & Abdalla, A. L. (2017). Potential of mimosine of *Leucaena leucocephala* for modulating ruminal nutrient degradability and methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 223, 30-41.
- Sokumbi, O. A., Egbunike, G. N. (2000). Physiological responses of growing rabbits to neem (*Azadirachta indica*) leaf meal based diets: Haematology and serum biochemistry. *Trop. Anim. Prod. Invest*, 3:81-87.
- Stergiadis, S., Allen, M., Chen, X. J., Wills, D., & Yan, T. (2015). Prediction of nutrient digestibility and energy concentrations in fresh grass using nutrient composition. *Journal of dairy science*, 98(5), 3257-3273.

- Stoffel, C. M., Crump, P. M., & Armentano, L. E. (2015). Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *Journal of dairy science*, 98(1), 431-442.
- Stumm, C. K., Gijzen, H. J., Vogels, G. D. (1982). Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *The British Journal of Nutrition* 47, 95–99.
- Sun, Y. K., Yan, X. G., Ban, Z. B., Yang, H. M., Hegarty, R. S., & Zhao, Y. M. (2017). The effect of cysteamine hydrochloride and nitrate supplementation on *in-vitro* and *in vivo* methane production and productivity of cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 232, 49-56.
- Szumacher-Strabel, M., Martin, S. A., Potkanski, A., Cieslak, A., Kowalczyk, J. (2004). Changes in fermentation processes as the effect of vegetable oil supplementation in *in vitro* studies, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13, 215-218.
- Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., Nowakowska, A. (2009). Effect of oils rich in linoleic acid on *in vitro* rumen fermentation parameters of sheep, goats and dairy cows, *J. Anim. Feed Sci*, 18(3), 440-452
- Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Cieslak, A., Kozłowska, M., Kuznicki, D., Kowalczyk, M., & Oleszek, W. (2019). Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2243-2250.
- Tagliapietra, F., Cattani, M., Guadagnin, M., Haddi, M. L., Sulas, L., Muresu, R., ... & Bailoni, L. (2015). Associative effects of poor-quality forages combined with food industry byproducts determined *in vitro* with an automated gas-production system. *Animal Production Science*, 55(9), 1117-1122.
- Tamminga, S. (1979). Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science*, 49(6), 1615-1630.
- Tamminga, S., Bannink, A., Dijkstra, J., & Zom, R. L. G. (2007). Feeding strategies to reduce methane loss in cattle (No. 34). Animal Sciences Group.
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal feed science and technology*, 169(3-4), 185-193.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., Sivakumaran, S. (2005). Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 403-419.
- Tewari, S. K., Katiyar, R. S., Ram, B., Misra, P. N. (2004). Effect of age and season of harvesting on the growth, coppicing characteristics and biomass productivity of *Leucaena leucocephala* and *Vitex negundo*, *Biomass Bioenergy*, 26:229-234.
- Teixeira, E. I., Moot, D. J., Brown, H. E. (2008). Defoliation frequency and season affected radiation use efficiency and dry matter partitioning to roots of lucerne (*Medicago sativa* L.) crops. *Eur. J. Agron.* 28: 103–111. doi: 10.1016/j.eja.2007.05.004.

- Theart, J. J. F. (2015). Forage quality of some Kalahari browse species and its ability to reduce enteric methane emission (Doctoral dissertation, University of Pretoria).
- Tillman, A. D., Sheriha, G. M., Sirny, R. J. (1965). Nitrate reduction studies with sheep. *J. Anim. Sci*, 24, 1140-1146.
- Tolera, A., Khazaal, K., Ørskov, E. R. (1997). Nutritive evaluation of some browse species. *Animal Feed Science and Technology* 67, 181-195.
- Tomkins, N., Parker, A. J., Hepworth, G., & Callaghan, M. J. (2018). Nitrate supplementation has marginal effects on enteric methane production from *Bos indicus* steers fed Flinders grass (*Iseilema spp.*) hay, but elevates blood methaemoglobin concentrations. *Animal Production Science*, 58(2), 262. doi:10.1071/an16002
- Toral, P.G.; A. Belenguer; P. Frutos and G. Hervás (2009). Effect of the supplementation of a high concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. *Small Ruminant Research*, 81:119-125.
- Tubiello, F. N., Salvatore, M., Rossi, S., Ferrara, A., Fitton, N., & Smith, P. (2013). The FAOSTAT database of greenhouse gas emissions from agriculture. *Environmental Research Letters*, 8(1), 015009.
- Trinh, P. H., Do, H. Q., Preston, T. R., Leng, R. A. (2009) Nitrate as a fermentable nitrogen supplement for goats fed forage-based diets low in true protein. *Livestock Research for Rural Development* 21.(1)
- Troy, S. M., Duthie, C. A., Hyslop, J. J., Roehe, R., Ross, D. W., Wallace, R. J., ... & Rooke, J. A. (2015). Effectiveness of nitrate addition and increased oil content as methane mitigation strategies for beef cattle fed two contrasting basal diets. *Journal of Animal Science*, 93(4), 1815-1823.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Looor, J. J., Chilliard, Y., & Doreau, M. (2003). Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 86(12), 3999-4007.
- Ungerfeld, E. M., & Kohn, R. A. (2006). The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, 55-85.
- Urrutia, N. L., & Harvatine, K. J. (2017). Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 147(5), 763-769. doi:10.3945/jn.116.245001
- Ushida, K., & Jouany, J. P. (1996). Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2), 129-132.
- Uslu, S., O., Kurt, O., Kaya, E., & Kamalak, A. (2018). Effect of species on chemical composition, metabolizable energy, organic matter digestibility and methane production of some legume plants grown in Turkey. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1158-1161.
- Uza, D. V., Barde, R. E., & Ayoade, J. A. (2005). The effect of urea treated cassava peels as supplement to West African Dwarf (WAD) goats grazing natural pasture. *Nigerian Veterinary Journal*, 26(1), 1-9.

- Vagnoni, D. B., Broderick, G. A., & Muck, R. E. (1997). Preservation of protein in wilted lucerne using formic, sulphuric or trichloroacetic acid. *Grass and Forage Science*, 52(1), 5-11.
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell University Press. USA.
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., Leng, R. A. and Perdok, H. B. (2010) Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J. Dairy Sci.* 93, 5856–5866
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A., & Perdok, H. B. (2011). Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4028-4038.
- Vargas, J. E., Andrés, S., Yáñez Ruiz, D. R., & López, S. (2011). The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique. *Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Options Méditerranéennes: Série A Séminaires Méditerranéens*, (99), 163-168.
- Vargas, J. E., Andrés, S., Snelling, T. J., López-Ferreras, L., Yáñez-Ruiz, D. R., García-Estrada, C., & López, S. (2017). Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, *in vitro* fermentation and digesta fatty acid profile. *Frontiers in microbiology*, 8, 1124.
- Velazco, J. I., Cottle, D. J., & Hegarty, R. S. (2014). Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. *Animal Production Science*, 54(10), 1737-1740.
- Veneman, J. B., Muetzel, S., Hart, K. J., Faulkner, C. L., Moorby, J. M., Molano, G., ... & Newbold, C. J. (2013). Dietary nitrate but not linseed oil decreases methane emissions in two studies with lactating dairy cows. In *Proceedings of the livestock, climate change and food security conference* (p. 38).
- Veneman, J. B., Muetzel, S., Hart, K. J., Faulkner, C. L., Moorby, J. M., Perdok, H. B., & Newbold, C. J. (2015). Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows? *PloS one*, 10(10), e0140282.
- Verma, A. K., Singh, P., Dass, R. S., & Mehara, U. R. (2006). Impact of feeding urea ammoniated and urea supplemented wheat straw on intake and utilization of nutrients in crossbred cattle. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 76(6).
- Veira, D. M., Ivan, M., & Jui, P. Y. (1983). Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *Journal of Dairy Science*, 66(5), 1015-1022.
- Villar, M. L., Hegarty, R. S., Nolan, J. V., Godwin, I. R., & McPhee, M. (2019). The effect of dietary nitrate and canola oil alone or in combination on fermentation, digesta kinetics and methane emissions from cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 259, 114294.

- Waghorn, G. C., & Shelton, I. D. (1997). Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 128(3), 365-372.
- Waghorn, G. C., Tavendale, M. H., & Woodfield, D. R. (2002). Methanogenesis from forages fed to sheep. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* (pp. 167-171).
- Waghorn, G. C. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production progress and challenges. *Anim Feed Sci Technol* 147:116–139.
- Wahyuni, S., Yulianti, E. S., Komara, W., Yates, N. G., Obst, J. M., & Lowry, J. B. (1982). The performance of Ongole cattle offered either grass, sundried *Leucaena leucocephala* or varying proportions of each. *Tropical Animal Production*, 7(3), 275.
- Wallace, R. J. (1996). The mode of action of yeast culture in modifying rumen fermentation. In: Lyons, T.P., Jacques, K.A. (Eds.), *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc. of Alltech's 12th Ann. Symp. Nottingham Univ. Press, Nottingham, United Kingdom, pp. 217–232.
- Waller, P. J. (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 29, 155–164.
- Wanapat, M., Pilajun, R., & Kongmun, P. (2009). Ruminant ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal feed science and technology*, 151(3-4), 205-214.
- Wanapat, M., Cherdthong, A., Phesatcha, K., & Kang, S. (2015). Dietary sources and their effects on animal production and environmental sustainability. *Animal Nutrition*, 1(3), 96-103.
- Wanapat, M., Phesatcha, K., & Kang, S. (2016). Rumen adaptation of swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) by high level of urea supplementation when fed on rice straw-based diet. *Tropical animal health and production*, 48(6), 1135-1140.
- Wang, J. K., Ye, J. A., & Liu, J. X. (2012). Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance. A review. *Tropical animal health and production*, 44(4), 697-706.
- Wang, H. T., Yao, C. H., Liu, Y. N., Meng, Y. Y., Wang, W. L., Cao, X. P., & Xue, S. (2014). Identification of fatty acid biomarkers for quantification of neutral lipids in marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*. *Journal of applied phycology*, 27(1), 249-255.
- Wang, M., Wang, R., Xie, T. Y., Janssen, P. H., Sun, X. Z., Beauchemin, K. A., ... & Gao, M. (2016). Shifts in rumen fermentation and microbiota are associated with dissolved ruminal hydrogen concentrations in lactating dairy cows fed different types of carbohydrates. *The Journal of Nutrition*, 146(9), 1714-1721.
- Wang, R., Wang, M., Ungerfeld, E. M., Zhang, X. M., Long, D. L., Mao, H. X., ... & Tan, Z. L. (2018). Nitrate improves ammonia incorporation into rumen microbial protein in lactating dairy cows fed a low-protein diet. *Journal of dairy science*, 101(11), 9789-9799.

- Wei, Z. H., Liang, S. L., Wang, D. M., Liu, H. Y., Wanapat, M., & Liu, J. X. (2019). Lactation performance and rumen fermentation in dairy cows fed a diet with alfalfa hay replaced by corn stover and supplemented with molasses. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(8), 1122.
- Weld, K. A., & Armentano, L. E. (2017). The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. *Journal of dairy science*, 100(3), 1766-1779.
- Wencelova, M., Varadyova, Z., Mihalikova, K., Kisidayova, S., & Jalc, D. (2014). Evaluating the effects of chitosan, plant oils, and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38(1), 26-33.
- Wheeler, R. A., Chaney, W. R., Johnson, K. D., & Butler, L. G. (1995). *Leucaena* forage analysis using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 64(1), 1-9.
- Wiedmeier, R. D., Arambel, M. J., Walters, J. L. (1987). Effect of orally administered pilocarpine on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. *Journal of dairy science*, 70(2), 284-289.
- Witzig, M., Lengowski, M. B., Zuber, K. H., Möhring, J., & Rodehutsord, M. (2018). Effects of supplementing corn silage with different nitrogen sources on ruminal fermentation and microbial populations *in vitro*. *Anaerobe*, 51, 99-109.
- Wu, D., Xu, L., Tang, S., Guan, L., He, Z., Guan, Y., ... & Wang, M. (2016). Influence of oleic acid on rumen fermentation and fatty acid formation *in vitro*. *PLoS One*, 11(6), e0156835.
- Xu, J., Hou, Y., Yang, H., Shi, R., Wu, C., Huo, Y., Zhao, G. (2014). Effects of forage sources on rumen fermentation characteristics, performance, and microbial protein synthesis in midlactation cows. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(5), 667.
- Xu, Y., Li, Z., Moraes, L. E., Shen, J., Yu, Z., & Zhu, W. (2019). Effects of incremental urea supplementation on rumen fermentation, nutrient digestion, plasma metabolites, and growth performance in fattening lambs. *Animals*, 9(9), 652.
- Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., ... & Looor, J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 3(11), 1562.
- Yang C, Rooke JA, Cabeza I and Wallace RJ (2016) Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: Microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Front. Microbiol.* 7:132. doi: 10.3389/fmicb.2016.00132
- Yang, K., Wei, C., Zhao, G. Y., Xu, Z. W., & Lin, S. X. (2017). Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(2), 302-310.

- Yuan, C. M., Zhang, Y., Tang, G. H., Di, Y. T., Cao, M. M., Wang, X. Y., ... & Hao, X. J. (2013). Khayseneganins A–H, limonoids from *Khaya senegalensis*. *Journal of natural products*, 76(3), 327-333.
- Zadeh, J. B., & Kor, Z. M. (2013). Utilization and Addition Sugars to Ruminants Rations. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(10), 1236-1245.
- Zayed, M. Z., and Samling, B., (2016). Phytochemical constituents of the leaves of *Leucaena leucocephala* from Malaysia. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(12), 174-179.
- Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., & Troegeler-Meynadier, A. (2013). Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *Journal of dairy science*, 96(1), 451-459.
- Zhang, C. M., Yi, X. W., Yuan, Z. P., Liu, J. X., & Zhu, W. Y. (2008). Effects of adding mixtures of linoleic acid and linolenic acid with different proportions on rumen fermentation and methanogenesis *in vitro*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 20(2), 223-227.
- Zhang, S., Long Cheng, Xuefeng Guo, Chunhui Ma, Aiwei Guo & Yingluck Moonsan (2016) Effects of urea supplementation on rumen fermentation characteristics and protozoa population *in vitro*, *Journal of Applied Animal Research*, 44:1, 1-4, DOI: 10.1080/09712119.2014.978779
- Zhao, L., Meng, Q., Ren, L., Liu, W., Zhang, X., Huo, Y., & Zhou, Z. (2015). Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(10), 1433.
- Zhou, Z., Meng, Q., Yu, Z. (2011). Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundance of methanogen and cellulolytic bacteria in *in-vitro* ruminal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2634–2639.
- Zhou, Z., Yu, Z., & Meng, Q. (2012). Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. *Bioresource Technology*, 103(1), 173-179.
- Zhou, M., Peng, Y. J., Chen, Y., Klinger, C. M., Oba, M., & Liu, J. X. (2018). Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 6(1), 62.

Yayınlar

A - Uluslararası Yayınlar

Euloge O.A. OLOMONCHI, Ünal KILIÇ, Ali Vaiz GARİPOĞLU, Abdul kadir ERİSEK. Comparison of Forage Quality and *in vitro* Digestibilities of Fodder Beet (*Beta vulgaris var. rapa*) Fresh Material and Silage. Journal of Scientific and Engineering Research, 2019, 6(11):172-178.

B – Kongreler

1. Ogoukayodé A. Euloge Olomonchi, Ali Vaiz Garipoğlu, Recep Merhap. Possibilities of using aromatic plants for mitigating methane production in digestive systems of ruminants: Review. In: Proceedings of the 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. Konya, Turkey: TABKON; 2017. pp. 257.
2. Euloge O.A. Olomonchi, Ali V. Garipoğlu. Effect of nitrogen fertilization rate of various forage sources on rumen parameters: Review. In: Proceedings of International Congress of the New Approches and Technologies for Sustainable Development. Isparta, Turkey: ICNATSD; 2017. pp. 256-262.
3. Euloge O.A. Olomonchi, Jerry D. Agossou, Ali V. Garipoğlu. Effect of protected fat and protein on animal performance: Review. In: Proceedings of the 10th International Animal Science Conference. Antalya, Turkey: IASC; 2018. pp. 457-459.
4. Ogoukayodé A. Euloge Olomonchi, Ahmet Akdağ, Ali Vaiz Garipoğlu. Possibilities of Using Rice Brain in Dairy Nutrition: Review. In: Proceedings of the 4th International Agriculture Congress. Cappadocia, Turkey: IAC; 2018. pp. 108.