

Dimetilsülfoksit İlavesi ile Farklı Şekillerde Dondurulmuş Rumen Sıvısının *in Vitro* Sindirim Denemelerinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması ^[1]

Nihat DENEK ¹  Abdullah CAN ² Mehmet AVCI ¹

^[1] Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No:TOVAG-1090445)

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-63100 Şanlıurfa - TÜRKİYE

² Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, TR-63100 Şanlıurfa - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2015-14414 Received: 18.09.2015 Accepted: 14.12.2015 Published Online: 13.01.2016

Özet

Bu çalışmada, rumen sıvısı kaynağı olarak; taze rumen sıvısı, sıvı azot içerisinde dimetilsülfoksit (DMSO) katkısız ve katkılı (%5), derin dondurucuda DMSO katkısız ve katkılı (%5) dondurulmuş rumen sıvısı kullanılmıştır. Çalışmada 4 farklı kaba yem (mısır silajı, yonca kuru otu, mercimek samanı, buğday samanı), 4 farklı karma yem (sığır besi yemi, sığır süt yemi, toklu besi yemi ve buzağı büyütme yemi) ve 4 farklı yem hammaddesi (arpa, mısır, pamuk tohumu küspesi, soya küspesi) yem materyali olarak kullanılmıştır. İki aşamalı sindirim yönteminde deneme yemleri genel olarak değerlendirildiğinde gerek sıvı azot içerisinde ve gerekse derin dondurucuda dondurulan rumen sıvılarından elde edilen *in vitro* organik madde sindirim (İVOMS) değerleri taze rumen sıvısından elde edilmiş değerlerden düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Gaz üretim yönteminde ise yemlerin tamamı için %5 DMSO katkısı ile sıvı azot içerisinde dondurulmuş rumen sıvısından elde edilen İVOMS değerleri taze rumen sıvısından elde edilen değerler ile benzer ($P>0.05$) bulunmuştur. Araştırmada değerlendirilen tüm dondurulmuş rumen sıvılarındaki toplam anaerob bakteri ve toplam protozoa sayılarının, taze rumen sıvısındaki toplam anaerob bakteri ve protozoa sayılarına kıyasla azaldığı ($P<0.05$) görülmüştür. Protozoa türleri incelendiğinde %5 DMSO ilave edilerek sıvı azot içerisinde dondurulmuş rumen sıvısındaki canlı protozoa sayılarının kontrol grubu ile genel olarak benzer ($P>0.05$) olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, %5 DMSO katkısı ile sıvı azot tankı içerisinde dondurulmuş rumen sıvılarının *in vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Rumen sıvısı, *in vitro* sindirim, Dondurma, Sıvı azot, Derin dondurucu, Dimetilsülfoksit, DMSO

An Investigation on Usage of Frozen Rumen Fluid with Adding Dimethylsulfoxide and Different Freezing Methods for Determination of *in Vitro* Digestibility

Abstract

In this study, fresh rumen fluid, liquid nitrogen frozen rumen fluids with addition of 5% dimethylsulfoxide (DMSO) or without DMSO, deep freeze frozen rumen fluid addition of 5% DMSO or without DMSO were investigated as inoculum sources. Four roughages (corn silage, alfalfa hay, lentil straw, wheat straw), four commercial feeds (beef finishing, dairy cattle, ram lamb finishing, calf growing feeds) and four feed ingredients (barley, corn, cotton seed meal, soybean meal) were chosen as feed materials. Values of *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) of feeds using fresh rumen fluid were found generally higher than the values obtained from nitrogen or deep freeze frozen inoculum sources ($P<0.05$) in two stage *in vitro* procedure. Values of IVOMD via gas production technique were similar ($P>0.05$) with using liquid nitrogen frozen rumen fluids with addition of 5% DMSO. Number of the anaerobic bacteria and total protozoa were diminished with both freezing methods comparison with fresh rumen fluid ($P<0.05$). Species of protozoa count of fresh rumen fluid and nitrogen frozen with 5% DMSO were found generally similar ($P>0.05$). According to result of this study liquid nitrogen frozen rumen fluid with addition of 5% DMSO can be suggest as an alternative inoculum source for the *in vitro* gas production technique.

Keywords: Rumen fluid, *in vitro* digestion, Freezing, Liquid nitrogen, Deep Freeze, dimethylsulfoxide, DMSO



İletişim (Correspondence)



+90 414 3183892



nihatdenek@hotmail.com

GİRİŞ

Ruminant beslemede kullanılan yem maddelerinin enerji ve sindirim değerlerinin belirlenmesi genellikle *in vivo* yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak *in vivo* yöntemlerin uygulanması zaman alıcı ve pahalı olması, araştırmacıları *in vitro* yöntemlere yönelmiştir^[1]. Yem maddelerinin *in vitro* sindirim değerlerinin belirlenmesinde mikrobiyal fermentasyon için taze rumen sıvısına ihtiyaç duyulmaktadır^[2,3]. Yem analizleri yapan araştırma ve kurum laboratuvarlarında rumen kanülü takılmış canlı hayvan barındırılma gücünü bu laboratuvarlarda *in vitro* denemelerin yapılmasını engellemektedir. *In vitro* sindirim yöntemlerinin uygulanmasında, taze rumen sıvısı temini için cerrahi operasyonla hayvanlara rumen kanülü takılması, olası sağlık problemlerinin ortaya çıkması, uzun süreli bakım masrafları ve bu hayvanların kullanımı ile ilgili etik ve hayvan refahı gibi faktörlerin bulunması bu konuda çalışanlar için dezavantaj olarak kabul edilmektedir^[4]. Bu faktörleri göz önünde bulunduran araştırmacılar taze rumen sıvısına alternatif inokulant kaynakları (dışı ve enzim) üzerine araştırmalar yapmışlar ancak elde edilen sonuçların güvenli olmadığı sonucuna varmışlardır^[5,6]. Rumen mikroorganizmalarının canlılıklarını sürdürdürebilmeleri için özel şartlara (oksijensiz ortam, 39°C ısı, nem vb.) ihtiyaç duyarlar. Rumen mikroorganizmaları için zorunlu olan bu ortam şartları rumen sıvısının kriyoprotektan ilave edilmeksizin dondurularak saklanmasında bazı olumsuzluklar oluşturmaktadır. Rumen sıvısının dondurulmasında çeşitli kriyoprotektan maddeler (gliserol, dimetil sülfoksit, propilen glikol, etilen glikol, sukroz ve trehalose) kullanılmaktadır. Bunlardan gliserol ve dimetil sülfoksit (DMSO) en yaygın kullanım alanı bulmuştur. Kriyoprotektanlar genel olarak donma işlemi sırasında ya hücre içindeki sıvıyı hücre dışına almakta veya hücre içindeki sıvıyı çok küçük partiküller şeklinde dondurarak donma esnasında intrasellular sıvının buz kristali oluşmasını engelleyerek hücre harabiyetini en aza indirmektedirler^[7,8]. Kriyoprotektanların bu özellikleri dondurulma ve çözme işlemi sonrasında rumen sıvısında bulunan çeşitli mikroorganizmaların aktivitelerinin devam etme olasılığını arttırmaktadır.

Gerek yemlerin iki aşamalı *in vitro* kuru madde sindirilebilirliklerinin belirlenmesinde ve gerekse gaz üretim tekniğinin uygulanmasında dondurulmuş rumen sıvısı kullanılarak yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Zeigler ve ark.^[9] iki aşamalı *in vitro* kuru madde sindirim denemesinde inokulant kaynağı olarak taze rumen sıvısı ve derin dondurucuda %5 gliserol ilave edilerek dondurulmuş rumen sıvısı kullanmışlardır. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre derin dondurucuda katkısız olarak dondurulan rumen sıvısı ile taze rumen sıvısından elde edilen İVKMS değeri benzer bulunmuş, %5 gliserol katkısı dondurulan rumen sıvısından elde edilen İVKMS değeri ise taze rumen sıvısından elde edilen değerden düşük bulunmuştur. Cone ve ark.^[10] tarafından *in vitro* gaz üretim denemesinde taze rumen sıvısını -24°C'de 1, 3, 10, 40 ve 76 gün boyunca dondurarak yaptıkları bir çalışmada, 10

günden daha uzun süre dondurulma işleminde gaz üretim miktarının olumsuz yönde etkilendiğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada^[11] gaz üretim tekniğinde 0°C'de 3, 6 ve 24 saat bekletilen ile -18°C'de 24 saat süre ile dondurulmuş rumen sıvıları kullanılmıştır. Kontrol grubu ile 0°C'de 3 ve 6 saat bekletilen rumen sıvılarından elde edilen sonuçlar benzer bulunurken, -18°C'de 24 saat süre ile dondurulmuş rumen sıvısından elde edilen değerler düşük bulunmuştur. Bu farklılık donma aşamasında intrasellüler buz kristallerinin oluşumuna ve buna bağlı olarak oluşan hücre harabiyeti ile açıklanmıştır. Prates ve ark.^[12] farklı şekillerde dondurulan rumen sıvısının gaz üretim tekniğinde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, gliserol katılarak sıvı azot içerisinde dondurulan rumen sıvısından en yüksek gaz üretimi sağlanmıştır. Bunun aksine -20°C'de derin dondurucuda ve gliserol katılmaksızın sıvı azot içerisinde dondurulmuş rumen sıvılarından ise en düşük gaz üretim değerleri elde edilmiştir. Abdel-Aziz ve ark.^[13] rumen protozoalarının sıvı azot içerisinde dondurulmalarına ilişkin yaptıkları bir çalışmada kriyoprotektan olarak %4, 5 ve 6 düzeyinde gliserol, DMSO ve etilen glikol kullanmışlardır. Dondurulma süresi sonunda çözdürülen protozoaların canlılıkları incelendiğinde, %5 DMSO ilavesinin en iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde Nsabimana ve ark.^[14] rumen protozoalarının dondurulmasında kriyoprotektan olarak %4, 5 ve 6 düzeyinde DMSO kullanmışlar, %5 DMSO katkısının protozoaların canlılıklarının korunmasında en etkili seviyenin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma, sıvı azot ve derin dondurucuda dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek dondurulmuş rumen sıvılarının, taze rumen sıvısına alternatif olarak iki aşamalı *in vitro* sindirim ve gaz üretim tekniğinde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada rumen sıvısı alınacak 3 baş ivesi toklusuna, cerrahi operasyonla rumen kanülü takılması, bakım ve beslenmeleri ve hayvanlardan deneme süresince rumen sıvısı alınması Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK)'nin 2009/6 sayılı kurul kararı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Araştırmada yem materyali olarak ruminant beslenmesinde yaygın olarak kullanılan yem hammaddeleri kullanılmıştır. Bu amaçla 4 farklı kaba yem (mısır silajı, yonca kuru otu, mercimek samanı, buğday samanı), 4 farklı karma yem (sığır besi yemi, sığır süt yemi, toklu besi yemi ve buzağı büyütme yemi) ve 4 farklı yem hammaddesi (arpa, mısır, pamuk tohumu küspesi, soya küspesi) kullanılmıştır. Yem maddeleri 1 mm elekten geçecek şekilde değirmende öğütüldükten sonra kuru madde (KM), ham kül (HK), ham yağ (HY), ham protein (HP) ve ham selüloz (HS) analizleri Weende analiz sistemine göre^[15], asit deterjan fiber (ADF) ve nötral deterjan fiber (NDF) analizleri Van Soest ve Robertson'a^[16] göre yapılmıştır.

Araştırmada *in vitro* sindirim denemeleri iki aşamalı sindirim denemesi ve gaz üretim tekniği olarak iki deneme

halinde yürütülmüştür. İki aşamalı *in vitro* organik madde sindirim değerlerinin belirlenmesinde Tilley ve Terry'nin ^[17] bildirdiği, *in vitro* gaz üretim tekniği Menke ve Steingass'ın ^[18] bildirdiği yöntemle göre uygulanmıştır. *In vitro* sindirim denemeleri her bir yem maddesi için 5'er tekerrür olacak şekilde uygulanmıştır. Araştırmada kullanılan rumen sıvısı, günde iki öğün halinde sabah 09:00 ve akşam 17:00 saatlerinde yaşama payının %25 fazlası düzeyinde %40 kesif (toklu besi yemi) ve %60 kaba yem (yonca kuru otu) ile beslenen rumen kanülü takılmış 60 kg (± 3 kg) canlı ağırlığında, bir yaşlı 3 baş İvesi erkek tokludan temin edilmiştir. Deneme hayvanlarının yeme alıştırmaya dönemi (20 gün) sonrasında sabah yemlemesinden 1 saat önce CO₂ gazı altında alınan rumen sıvısı içerisinde CO₂ gazı ve sıcak su ile ısıtılmış cam şişede toplanarak, termos içerisinde vakit kaybedilmeden laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen rumen sıvısı CO₂ gazı altında 4 kat tülbent bezinden süzülerek kontrol ve araştırma grupları için hazırlanan falkon tüplerine konulmuştur. Kontrol (taze rumen sıvısı) grubunda iki aşamalı *in vitro* sindirim yöntemi Tilley ve Terry'nin ^[17], gaz üretim tekniği ise Menke ve Steingass'ın ^[18] bildirdiği yöntemle göre hemen başlatılmıştır. Deneme grupları sıvı azot içerisinde dimetil sülfoksit (DMSO) katkısız ve katkılı (%5) derin dondurucuda DMSO katkısız ve katkılı (%5) dondurulmuş rumen sıvısından oluşturulmuştur. Bu amaçla; araştırma gruplarındaki tüplere (%5 DMSO katılan ve katılmayan) rumen sıvısı konarak tüplerin üzerinden CO₂ gazı geçirilmiş ve bu tüpler ağızları kapalı olarak içerisinde 39°C ısıda su ve buz bulunan küvetler içerisinde buzdolabında +4°C'de 30 dak. bekletilmiştir (equilibration süresi). Buzdolabında bekletme süresi içerisinde DMSO katılan tüplere %5 oranında DMSO 10'ar dakikalık ara ile üç aşamada otomatik pipet yardımı ile ilave edilmiş ve sonrasında içerisinde rumen sıvısı bulunan tüpler CO₂ gazı ile doyurulmuştur. DMSO katılmayan tüpler ise sadece CO₂ gazı ile doyurulma işlemi uygulanmıştır. Equilibration süresi sonunda DMSO katılan ve katılmayan tüpler derin

dondurucuda yatay bir şekilde -21°C'de 1 ay süre ile dondurularak saklanmışlardır. Eş zamanlı olarak sıvı azot içerisinde dondurulacak tüpler ise özel olarak hazırlanmış bir düzenek üzerinde yatay bir şekilde hareket ettirilerek önce sıvı azot buharı ile ön donmaya maruz bırakıldıktan sonra tüpler sıvı azot stok tankı içerisine atılarak donma işlemi -196°C'de sabitlenmiştir. Sıvı azot içerisinde dondurulan tüpler *in vitro* sindirim denemelerinin uygulanacağı zamana kadar (1 ay) sıvı azot tankı içerisinde saklanmıştır. DMSO katkılı ve katkısız olarak sıvı azot tankı ve derin dondurucuda bir ay süre ile dondurulan tüpler *in vitro* sindirim denemelerinin yapılacağı zamanda 39°C'deki su banyosu içerisinde 30-45 saniye içerisinde çözdürülerek kullanılmışlardır. Taze, DMSO katkılı ve katkısız sıvı azot içerisinde ve derin dondurucuda dondurulmuş rumen sıvılarındaki aktif rumen sıvısı bakterilerinin sayımı Dehority'nin ^[19] belirttiği metoda göre yapılmıştır. Taze, sıvı azot içerisinde ve derin dondurucuda DMSO ilave edilen ve edilmeyen dondurulmuş rumen sıvılarındaki toplam protozoaların sayımı Boyne ve ark.'nın ^[20] bildirdikleri yöntemle göre, protozoa tiplerinin identifikasyonu ise Boyne ve ark.^[20] ile Ogimoto ve Imai ^[21] tarafından bildirilen yöntemlere göre yapılmıştır.

Elde edilen veriler tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Deneme sonunda elde edilen veriler deneme modeline uygun olarak varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır ^[22]. İstatistiksel analizler SAS ^[23] paket programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan yem maddelerinin ham besin madde içerikleri *Tablo 1*'de sunulmuştur. Çalışmada değerlendirilen yemlerin iki aşamalı *in vitro* sindirim yöntemi ile İVOMS değerlerinin belirlenmesinde dondurulma

Tablo 1. Araştırmada kullanılan yem maddelerinin ham besin madde içerikleri (g/kg, KM)

Table 1. The chemical composition of the experimental feeds (g/kg, DM)

Yemler	DM	HK	HY	HP	ADF	NDF	HS
Mısır silajı	932	63	36	71	288	532	240
Yonca kuru otu	914	87	21	139	390	529	263
Mercimek samanı	899	111	27	95	316	476	215
Buğday samanı	930	111	25	43	459	753	353
Siğir besi yemi	882	85	28	141	81	239	49
Siğir süt yemi	884	59	28	170	88	212	48
Toklu besi yemi	879	69	32	139	101	310	62
Buzağı büyütme yemi	892	94	37	175	111	299	72
Arpa	900	26	23	104	72	381	52
Mısır	873	13	30	81	45	163	21
Pamuk tohumu küspesi	898	60	10	283	291	447	164
Soya küspesi	871	65	10	476	76	130	36

KM: Kuru madde; HK: Ham kül; HY: Ham yağ; HP: Ham protein; ADF: Asit deterjan fibre; NDF: Nötr deterjan fibre; HS: Ham seluloz

yöntemi ile dimetil sülfoksit (DMSO) seviyesinin etkisi *Tablo 2*'de sunulmuştur. Deneme yemleri genel olarak ele alındığında gerek sıvı azot içerisinde ve gerekse derin dondurucuda dondurulan rumen sıvılarından elde edilen iki aşamalı İVOMS değerleri kontrol grubundan düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Sıvı azot içerisinde DMSO katkısız olarak dondurulmuş rumen sıvısı kullanılarak elde edilen iki aşamalı İVOMS değerleri incelendiğinde bazı yemlerin (mısır silajı, buzağı büyütme yemi, arpa ve soya küspesi) haricinde elde edilen tüm yemler için bulunan İVOMS değerleri kontrol değerlerinden düşük ($P<0.05$) bulun-

muştur. Araştırmada değerlendirilen yemlerin *in vitro* gaz üretim tekniği ile İVOMS değerlerinin belirlenmesinde dondurulma yöntemi ile dimetil sülfoksit (DMSO) seviyesinin etkisi *Tablo 3*'te sunulmuştur. Deneme yemleri genel olarak değerlendirildiğinde %5 DMSO ilavesi ile sıvı azot içerisinde dondurulmuş rumen sıvısının inokulant olarak kullanıldığı *in vitro* gaz üretim tekniğinde elde edilen İVOMS değerleri tüm yemler için kontrol değerleri ile benzer ($P>0.05$) bulunmuştur. Araştırmada kullanılan kontrol ve dondurulmuş rumen sıvılarına ait toplam anaerob bakteri ve protozoa sayılarına ilişkin elde edilen veriler *Tablo 4*'te

Tablo 2. Yemlerin iki aşamalı *in vitro* metot ile organik madde sindirilebilirliklerinin belirlenmesinde dondurulma yöntemi ile dimetil sülfoksit (DMSO) seviyesinin etkisi

Table 2. The effects of freezing method and dimethyl sulfoxide (DMSO) level on *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD, %) of feedstuffs via two stage method

Yemler	Kontrol	Sıvı Azot		Derin Dondurucu		SEM
		0% DMSO	5% DMSO	0% DMSO	5% DMSO	
Mısır silajı	72.58 ^a	69.6 ^{ab}	68.59 ^b	59.36 ^c	54.66 ^d	1.44
Yonca kuru otu	69.04 ^a	66.03 ^b	67.00 ^b	60.03 ^c	60.66 ^c	0.75
Mercimek samanı	75.90 ^a	71.16 ^b	71.41 ^b	66.12 ^c	66.10 ^c	0.78
Buğday samanı	58.73 ^a	55.19 ^b	51.26 ^c	36.71 ^e	39.32 ^d	1.79
Siğir besi yemi	91.96 ^a	89.78 ^b	90.21 ^b	85.75 ^c	84.92 ^c	0.58
Siğir süt yemi	91.74 ^a	88.17 ^b	89.00 ^b	84.64 ^c	83.85 ^c	0.64
Toklu besi yemi	90.32 ^a	88.0 ^b	87.07 ^{bc}	83.35 ^d	85.58 ^c	0.50
Buzağı büyütme yemi	88.59 ^a	86.90 ^{ab}	85.69 ^b	82.00 ^c	81.57 ^c	0.61
Arpa	90.84 ^a	88.23 ^a	87.41 ^a	81.47 ^b	79.96 ^b	0.94
Mısır	95.33 ^a	91.72 ^b	90.30 ^b	84.40 ^c	86.41 ^c	0.83
Pamuk tohumu küspesi	70.17 ^a	65.12 ^b	63.72 ^b	61.93 ^{bc}	59.03 ^c	0.82
Soya küspesi	95.51 ^a	94.74 ^{ab}	94.04 ^b	94.65 ^{ab}	94.69 ^{ab}	0.16

DMSO: Dimetilsülfoksit; SEM: Standart hata ortalaması; ^{a-d} Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$)

Tablo 3. Yemlerin *in vitro* gaz üretim tekniği ile organik madde sindirilebilirliklerinin belirlenmesinde dondurulma yöntemi ile dimetil sülfoksit (DMSO) seviyesinin etkisi

Table 3. The effects of freezing method and dimethyl sulfoxide (DMSO) level on *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD, %) of feedstuffs via gas production technique

Yemler	Kontrol	Sıvı Azot		Derin Dondurucu		SEM
		0% DMSO	5% DMSO	0% DMSO	5% DMSO	
Mısır silajı	61.24 ^a	58.45 ^a	59.86 ^a	40.87 ^c	48.01 ^b	1.68
Yonca kuru otu	60.06 ^a	51.76 ^b	57.95 ^a	39.67 ^d	44.26 ^c	1.63
Mercimek samanı	61.07 ^a	56.67 ^a	57.30 ^a	40.66 ^b	43.49 ^b	1.77
Buğday samanı	40.64 ^a	37.02 ^b	41.75 ^a	27.03 ^c	27.26 ^c	1.33
Siğir besi yemi	73.61 ^a	73.96 ^a	71.63 ^a	62.80 ^b	64.44 ^b	1.05
Siğir süt yemi	71.44 ^a	72.73 ^a	70.31 ^{ab}	63.45 ^c	66.04 ^{bc}	0.82
Toklu besi yemi	68.56 ^{ab}	68.69 ^{ab}	70.90 ^a	67.34 ^b	65.75 ^b	0.45
Buzağı büyütme yemi	66.62 ^a	63.89 ^a	65.30 ^a	54.37 ^b	54.54 ^b	1.13
Arpa	76.11 ^a	75.35 ^a	74.42 ^a	72.25 ^b	67.50 ^c	0.66
Mısır	77.71 ^a	74.45 ^b	78.91 ^a	68.21 ^c	65.88 ^c	1.09
Pamuk tohumu küspesi	52.82 ^a	45.82 ^b	50.71 ^a	37.65 ^c	36.28 ^c	1.38
Soya küspesi	77.11 ^a	72.57 ^b	77.12 ^a	56.92 ^c	56.47 ^c	1.93

DMSO: Dimetilsülfoksit; SEM: Standart hata ortalaması; ^{a-d} Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$)

Table 4. Toplam canlı anaerob bakteri ve protozoa sayıları (cfu/ml) üzerine dondurulma yöntemi ile dimetil sülfoksit (DMSO) seviyesinin etkisi
Table 4. The effects of freezing method and dimethyl sulfoxide (DMSO) level on the number of total bacteria and protozoa (cfu/ml)

Bakteri ve Protozoa Sayıları	Kontrol	Sıvı Azot		Derin Dondurucu		SEM
		0% DMSO	5% DMSO	0% DMSO	5% DMSO	
TABS	104.0x10 ^{8a}	13.2x10 ^{8bc}	21.6x10 ^{8b}	6.4x10 ^{8c}	16.8x10 ^{8bc}	7.46
TPS	380.9x10 ^{3a}	121.3x10 ^{3b}	130.7x10 ^{3b}	128.9x10 ^{3b}	136.4x10 ^{3b}	20.76
<i>Entodinium</i> spp.	91.6x10 ^{3a}	66.8x10 ^{3b}	91.2x10 ^{3a}	60.4x10 ^{3c}	65.4x10 ^{3b}	2.77
<i>Epidinium</i> spp.	31.6x10 ^{3a}	29.8x10 ^{3a}	30.4x10 ^{3a}	8.4x10 ^{3b}	8.80 ^b	2.22
<i>Polipastron</i>	4.0x10 ^{3a}	2.2x10 ^{3b}	2.8x10 ^{3b}	0.00 ^c	0.00 ^c	0.34
<i>İsostrichia</i> spp.	2.0x10 ^{3a}	1.0x10 ^{3ab}	0.8x10 ^{3ab}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.21
<i>Dastrichia</i> spp.	1.2x10 ^{3a}	0.2x10 ^{3b}	0.6x10 ^{3ab}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.13

TABS: Toplam Anaerob bakteri sayısı; **TPS:** Toplam protozoa sayısı; **DMSO:** Dimetilsülfoksit; **SEM:** Standart hata ortalaması; ^{a-c} Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık önemlidir (P<0.05)

sunulmuştur. Toplam anaerob bakteri ve toplam protozoa sayıları tüm dondurulmuş rumen sıvılarında kontrol deneşmesinden düşük (P<0.05) bulunmuştur. Ancak gerek sıvı azot içerisinde ve gerekse derin dondurucuda uygulanan dondurma işleminde %5 DMSO ilavesinin rakamsal olarak toplam anaerob bakteri ve protozoa sayısını arttırdığı görülmüştür. Protozoa türleri incelendiğinde *Polipastron* türü haricinde, sıvı azot içerisinde %5 DMSO katkısı ile dondurulmuş rumen sıvısındaki protozoa türlerinin kontrol grubu ile genel olarak benzer (P>0.05) olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada iki aşamalı *in vitro* yöntem ile elde edilen İVOMS değerleri incelendiğinde gerek sıvı azot içerisinde ve gerekse derin dondurucuda dondurulan rumen sıvılarından elde edilen İVOMS değerlerinin kontrol grubundan düşük (P<0.05) olduğu gözlenmiştir. Bazı yemlerin (mısır silajı, buzağı büyütme yemi, arpa ve soya küspesi) sıvı azot içerisinde DMSO ilave edilmeden dondurulmuş rumen sıvısından elde edilen İVOMS değerlerinin kontrol değerleri ile benzer (P>0.05) olduğu, ancak bu benzerliğin yemlerin genelini kapsamadığı gözlenmiştir. Zeigler ve ark.'nın [9] yapmış oldukları çalışmada yemlerin *in vitro* kuru madde sindirim değerlerinin belirlenmesinde kriyoprotektan ilave edilmeksizin dondurulmuş rumen sıvısının kullanılabilmesi, %5 gliserol ilave edilerek dondurulan rumen sıvılarından elde edilen sonuçların ise taze rumen sıvısından elde edilen değerlerden düşük sonuç verdiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar konsantre yemler için katkısız ve %5 gliserol katkılı dondurulmuş rumen sıvısından elde ettikleri *in vitro* sindirim değerlerinin taze rumen sıvısı ile benzer olduğunu, ancak yüksek selüloz içeriğine sahip kaba yemlerde *in vitro* sindirim değerinin düşük olduğunu, bu farklılığın ise dondurulma ve çözme işlemi sürecinde rumen sıvısında bulunan selülotik bakterilerin zarar görmüş olabileceği varsayımına bağlamaktadırlar [9]. Jones ve ark.'nın [24] yaptıkları bir çalışmada taze rumen sıvısının +18°C'de 48 saat boyunca etkinliğini yitirmeden saklanabileceğini bildirmektedirler. Araştırmacılar [24] kaba yemlerin iki aşamalı

İVOMS değerlerinin belirlenmesinde +18°C'de 48 saat muhafaza edilen rumen sıvısının kullanılabilmesini ancak iki aşamalı *in vitro* sindirim metodunun mikrobiyal sindirim aşamasındaki 48 saatlik sürenin yetersiz olduğunu bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda [24-26], araştırmacılar kaba yemler için iki aşamalı *in vitro* sindirim metodunun mikrobiyal sindirim aşamasındaki 48 saatlik sürenin 72 saate çıkarılmasının gerektiğini bildirilmektedir. Benzer şekilde Denek ve ark. [27] bazı yem maddelerinin *in vitro* kuru madde sindirim değerlerinin iki aşamalı yöntem ile belirlenmesinde derin dondurucuda %5 DMSO ilave edilerek dondurulmuş rumen sıvısı kullanmışlardır. Araştırmacılar [27] kaba yemler için 48 saatlik mikrobiyal sindirim aşamasının yeterli olmadığını, bu sürenin 72 saate çıkarıldığında iki aşamalı sindirim yönteminde elde edilen sonuçların taze rumen sıvısından elde edilen sonuçlar ile benzer bulunduğu bildirmektedirler. Bu bildirimler doğrultusunda iki aşamalı *in vitro* sindirim yöntemi ile yemlerin İVOMS değerlerinin belirlenmesinde mikrobiyal inokulant kaynağı olarak sıvı azotta dondurulmuş rumen sıvısının kullanılabilmesi, ancak 48 saatlik mikrobiyal inkubasyon arttırılmasına ilişkin yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, gaz üretim tekniği ile elde edilen İVOMS değerleri incelendiğinde, sıvı azot içerisinde %5 DMSO ilavesi ile dondurulmuş rumen sıvısından elde edilen İVOMS değerlerinin tamamı kontrol değerleri ile benzer (P>0.05) bulunmuştur. Ancak sıvı azot içerisinde DMSO ilave edilmeden dondurulmuş rumen sıvılarında ise bazı yemlerin (yonca kuru otu, mısır, pamuk tohumu küspesi ve soya küspesi) İVOMS değerlerinin kontrolden düşük (P<0.05) olduğu görülmüştür. Derin dondurucuda gerek %5 DMSO ilave edilmiş ve gerekse DMSO ilave edilmemiş gruplardan elde edilen İVOMS değerleri kontrol değerlerinden düşük (P<0.05) bulunmuştur. Prates ve ark. [12] *in vitro* gaz üretim tekniğinin uygulanmasında sıvı azotta dondurulmuş rumen sıvısının taze rumen sıvısına alternatif olabileceğini, Rumen mikroorganizmalarının etkinliği bakımından sıvı azotta dondurmanın derin dondurucuda dondurmaktan daha etkin olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde elde edilen sonuç-

ların Prates ve ark.'nın ^[12] sonuçları ile benzer olduğu görülmektedir. Hervas ve ark.'nın ^[11] yapmış oldukları bir çalışmada, kriyoprotektan ilave edilmeden 0°C'de 3, 6 ve 24 saat ile derin dondurucuda veya -18°C'de 24 saat süre ile dondurulmuş rumen sıvısını gaz üretim tekniğinde, 0°C'de 3 ve 6 saat bekletilen rumen sıvılarından elde edilen gaz üretim değerlerinin kontrol grubu ile benzer bulunurken, -18°C'de 24 saat süre ile dondurulan rumen sıvısından elde edilen gaz üretim değerleri ise düşük bulunmuştur. Araştırmacılar bu farklılığın sebebini donma aşamasında rumen mikroorganizmalarında intrasellüler buz kristallerinin oluşumuna ve buna bağlı olarak hücre harabiyetine bağlamaktadırlar. Bu çalışmada benzer olarak DMSO katkılı ve katkısız olarak derin dondurucuda bir ay süre ile dondurulmuş rumen sıvılarından elde edilen İVOMS değerleri kontrol değerlerinden düşük bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan taze ve dondurulmuş rumen sıvılarına ait toplam anaerob bakteri sayılarına ilişkin elde edilen veriler incelendiğinde, toplam canlı anaerob bakteri sayıları gerek sıvı azot ve gerekse derin dondurucuda DMSO etkisine bakılmaksızın azaldığı (P<0.05) tespit edilmiştir. Ancak %5 DMSO katkısının her iki dondurma işlemi de anaerob canlı bakteri sayısında rakamsal olarak artışa yol açtığı görülmektedir. Stewart ve ark.^[28] rumen ortamında gram negatif bakterilerin çoğunlukta olduğunu ve bu bakterilerin dondurma ve çözme işlemlerinden olumsuz şekilde etkilendiklerini bildirmekteler. Rumen sıvısının 0°C ve -30°C ısılarda dondurulması ile kötü sonuçlar elde edilirken, sıvı azot içerisinde (-196°C) yapılan dondurma işlemi ise mikroorganizmaların uygulanan dondurma işleminden fazla etkilenmediği bildirilmektedir ^[29,30]. Protozoa değerleri incelendiğinde sıvı azot içerisinde %5 DMSO ilavesi ile dondurulmuş rumen sıvısındaki canlı protozoa sayılarının kontrol grubu ile genel olarak benzer (P>0.05) olduğu belirlenmiştir. Bu benzerlik *Entodinium spp.*, *Epidinium spp.*, *Isotrichia spp.* ve *Dastrichia spp.* türlerinde tespit edilirken, *Polipastron* türünde tespit edilememiştir. Bazı çalışmalarda ^[31,32] rumen protozolarının %5 DMSO ilavesi ile dondurulması ve sonrasında çözüldüğünde canlılıklarının yüksek düzeyde olduğu belirtilmektedir. Yine Abdel-Aziz ve ark.'nın ^[13] rumen protozolarının sıvı azot içerisinde dondurulmalarına ilişkin yaptıkları bir çalışmada kriyoprotektan olarak %4, 5 ve 6 düzeyinde gliserol, DMSO ve etilen glikol kullanmışlardır. Çözdürülen protozoların canlılıkları incelendiğinde %5 DMSO ilavesinin en iyi sonuç verdiği görülmüştür. Benzer şekilde Nsabimana ve ark.^[14] kriyoprotektan olarak %4, 5 ve 6 düzeyinde DMSO kullanmışlar ve en etkili DMSO seviyesinin %5 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda rumen mikroorganizmaları üzerine DMSO'nun diğer kriyoprotektanlardan daha etkin koruma sağlamasını hücreye daha hızlı nüfuz etmesine ^[33,34] ve donma işlemi sırasında hücre içerisinde buz kristalleri oluşturmamasına bağlamaktadırlar ^[34].

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, yemlerin *in vitro* gaz üretim tekniği ile İVOMS değerlerinin tespitinde mikrobiyal

inokulant kaynağı olarak sıvı azot içerisinde %5 DMSO katılarak dondurulmuş rumen sıvısının kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre belirli merkezlerde rumen kanülü takılmış hayvanlardan elde edilecek rumen sıvısına %5 düzeyinde DMSO ilave edilerek sıvı azot içerisinde dondurulması ile rumen kanülü açılmış donör hayvan barındırma imkânı bulunmayan araştırma merkezlerinin bu inokulantları kullanarak *in vitro* sindirim deneylerini gerçekleştirmeleri mümkün görünmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No.TOVAG-109O445). Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve çalışma kapsamında protozoa ve mikroorganizma sayımında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hüdayi İPEK ve Doç. Dr. Osman Yaşar TEL'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Canbolat Ö:** Bazı buğdaygil kaba yemlerinin *in vitro* gaz üretimi, sindirilebilir organik madde, nispi yem değeri ve metabolik enerji içeriklerinin karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 571-577, 2012. DOI: 10.9775/kvfd.2011.5833
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W:** The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agric Sci Camb*, 93, 217-222, 1979. DOI: 10.1017/S0021859600086305
- Williams BA:** Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. **In**, Givens DJ, Owen E, Axford RFE, Omed HM (Eds): Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. 189-213, CAB International, Wallingford, UK, 2000.
- Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK:** A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol*, 79, 321-330, 1999. DOI: 10.1016/S0377-8401(99)00033-4
- Mould FL:** Predicting feed quality-chemical analysis and *in vitro* evaluation. *Field Crops Res*, 84, 31-44, 2003. DOI: 10.1016/S0378-4290(03)00139-4
- Mauricio RM, Owen E, Mould FL, Givens I, Theodorou MK, France J, Davies DR, Dhanoa MS:** Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Anim Feed Sci Technol*, 89, 33-48, 2001. DOI: 10.1016/S0377-8401(00)00234-0
- Mazur P:** Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247, 125-142, 1984.
- Tanasawa I:** Things we do not know about cryopreservation of biological organs. *Ann N Y Acad Sci*, 858, 227-234, 1998. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10156.x
- Zeigler LD, Schlegel ML, Edwards MS:** Development of a rumen fluid reservation technique and application to an *in vitro* dry matter digestibility assay. *AZA Nutrition Advisory Group*, 69-74, 2003.
- Cone JW, Van Gelder AH, Bachman H:** Influence of inoculum source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. **In**, Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. *Proc. EAAP Satellite Symposium on Gas Production*, Wageningen, The Netherlands, 18-19 August 2000. BSAS, Edinburgh, UK, pp.74-75, 2000.
- Hervas G, Frutos P, Giraldez FJ, Mora MJ, Fernandez B, Mantecon AR:** Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for *in vitro* gas production techniques. *Anim Feed Sci Technol*, 123, 107-118, 2005. DOI: 10.1016/J.anifeedsci.2005.05.004
- Prates A, de Oliveira JA, Abecia L, Fondevila M:** Effects of

- preservation procedures of rumen inoculum on *in vitro* microbial diversity and fermentation. *Anim Feed Sci Technol*, 155, 186-193, 2010. DOI: 10.1016/J.anifeedsci.2009.12.005
- 13. Abdel-Aziz HM, Hassan HY, Abd-El-Raof YM, Abou-Zeina HAA, Galbt SA:** Trails for cryopreservation of rumen protozoa in sheep. *Global Veterinaria*, 1, 9-16, 2007.
- 14. Nsabimana E, Kisidayova S, Macheboeuf D, Newbold CJ, Jouany JP:** Two-step freezing procedure for cryopreservation of rumen ciliates, an effective tool for creation of a frozen rumen protozoa bank. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3826-3832, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.7.3826-3832.2003
- 15. AOAC:** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. (5th revision). AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 1999.
- 16. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA:** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-3591, 1991. DOI: 10.3168/JDS.S0022-0302(91)78551-2
- 17. Tilley JMA, Terry RA:** A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage. *J Br Grassl Soc*, 18, 104-111, 1963. DOI: 10.1111/J.1365-2494.1963.tb00335.x
- 18. Menke KH, Steingass H:** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Devel*, Separate Print, 28, 7-55, 1988.
- 19. Dehority BA:** Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *J Bacteriology*, 99, 189-196, 1969.
- 20. Boyne AW, Eadie JM, Raitt K:** The development and testing of a method of counting rumen ciliate protozoa. *J Gen Microbiol*, 7, 414-423, 1957. DOI: 10.1099/00221287-17-2-414
- 21. Ogimoto K, Imai S:** Atlas of Rumen Microbiology. Japan Sci Soc, Press, Tokyo, pp. 158-231, 1981.
- 22. Snedecor GW, Cochran WG:** Statistical methods. 6th ed., The Iowa State Univ. Press. Ames, 1980.
- 23. SAS Institute:** SAS User's Guide: Statistics, 5th ed., SAS Inc., Cary, NC, USA, 1989.
- 24. Jones RJ, Stoltz MA, Meyer JHF, Bechaz FM:** The effect of rumen fluid storage time on digestive capacity with five forage/browse samples. *Trop Grassl*, 32, 270-272, 1998.
- 25. Can A, Hummel J, Mobashar M, Boeser U, Sudekum KH:** Comparison of sheep ruminal fluid with sheep and horse faeces as inoculum for *in vitro* gas production measurements. *J Appl Anim Res*, 35, 143-148, 2009. DOI: 10.1080/09712119.2009.9707004
- 26. Omed HM, Lovett D, Axford RFE:** Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. **In**, Givens DJ, Owen E, Axford RFE, Omed HM (Eds): Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. 135-154, CAB International, Wallingford, 2000.
- 27. Denek N, Can A, Avci M:** Frozen rumen fluid as a source of microbial inoculum for the two-stage *in vitro* digestibility assay of some ruminant feeds. *S Afr J Anim Sci*, 40, 251-256, 2010.
- 28. Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP:** The rumen bacteria. **In**, Hobson PN, Stewart CS (Eds): The rumen Microbial Ecosystem. 2nd ed., 1072, Blackie Academic & Professional, London, UK, 1997.
- 29. Malik KA:** Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World J Microbiol Biotechnol*, 7, 629-632, 1991. DOI: 10.1007/BF00452850
- 30. Perry SF:** Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Mol Biotechnol*, 9, 59-64, 1998.
- 31. Kisidayova S, Varadyova Z, Michalowski T, Newbold CJ:** Regeneration of cryoresistance of *in vitro* rumen ciliate cultures. *Cryobiology*, 51, 76-84, 2005. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.05.001
- 32. Kisidayova S, Michalowski T, Varadyova Z:** Preliminary results of the regeneration of the *in vitro* rumen ciliate cultures - Effect of their cytoresistance. *Endocytobiosis Cell Res*, 17, 146-149, 2006.
- 33. Hubalek Z:** Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229, 2003. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4
- 34. De la Fuente G, Cebria'n JA, Fondevila M:** A cryopreservation procedure for the rumen protozoon *Entodinium caudatum*: estimation of its viability by fluorescence microscopy. *Lett Appl Microbiol*, 38, 164-168, 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2003.01464.x