

Biberiye ve Adaçayı Ekstraktlarının Ruminal Fermantasyon Üzerine Etkilerinin Rumen Simülasyon Tekniği (RUSITEC) ile Araştırılması

Ahu DEMİRTAŞ¹*, Hakan ÖZTÜRK¹, İlksin PİŞKİN¹, Deniz DEMİRKİRAN², Yasemin SALGIRLI¹,
Ulvi Reha FİDANCI², Bahri EMRE¹

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar: Ahu DEMİRTAŞ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara
e-posta: ahu-demirtas@hotmail.com, Tel: 0 312 317 03 15-432

Geliş Tarihi / Received: 09.03.2011

ÖZET

Bu araştırmanın amacı, uzun süreli bir inkübasyon modeli olan rumen simülasyon tekniğini (RUSITEC) kullanarak biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ekstraktlarının rumendeki mikrobiyal fermantasyon üzerine *in vitro* etkilerini belirlemektir. RUSITEC sisteminde hacimleri 1000 ml olan 6 fermenter kullanıldı. Her bir fermenterde günlük olarak 5 g arpa samanı ve 5 g arpadan oluşan bir deneme yemi karışımı inkübe edildi. Araştırma 12 gün sürdü. Altı günlük adaptasyon fazını takip eden 6 günlük deneme fazında, RUSITEC sistemin 6 fermenteri 3 gruba ayrıldı. İlk iki fermentere hiçbir ilave yapılmayıp kontrol fermenterleri olarak kullanılırken, ikinci iki fermentere günde 250 mg biberiye ekstraktı, üçüncü iki fermentere ise yine günde 250 mg adaçayı ekstraktı ilave edildi. Araştırmanın deneme fazı boyunca her gün ruminal pH ve protozoon sayısı belirlenerek, amonyak azotu (NH₃-N), uçucu yağ asitleri (UYA) ve yem kuru maddesi sindirilebilirliği analizleri için numuneler toplandı. Biberiye ve adaçayı ekstraktları ruminal pH, toplam UYA miktarı, propiyonat ve bütirat üretimi, toplam protozoon sayısı, NH₃-N konsantrasyonu ve yem kuru madde sindirilebilirliğinde istatistiksel bir değişikliğe neden olmadı. Ancak, hiçbir ilavenin yapılmadığı kontrol fermenterleri ile karşılaştırıldığında biberiye ve adaçayı ekstraktları asetat üretimini azaltarak, asetatın propiyonata oranını düşürdü (P < 0,05). Sonuç olarak, bu araştırmadan elde edilen bulgular biberiye ve adaçayı ekstraktlarının ruminal fermantasyonunun bazı parametreleri üzerinde olumlu etkiler oluşturduğunu gösterdi. Bu maddelerin ruminant rasyonlarına ilavesi yine benzer etkiler meydana getirdiği takdirde hayvan verimliliğinde olumlu değişiklikler gözlenebilir.

Anahtar Kelimeler: Adaçayı ekstraktı, biberiye ekstraktı, fermantasyon, rumen

ABSTRACT

EFFECTS OF ROSEMARY AND SAGE EXTRACTS ON RUMINAL FERMENTATION USING THE RUMEN SIMULATION TECHNIQUE (RUSITEC)

The aim of this study was to determine the effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) extracts on *in vitro* ruminal fermentation using the long-term rumen simulation technique (RUSITEC). The RUSITEC system was equipped with six fermenters, each with a capacity of 1000 ml. Each fermenter received daily 5 g barley straw and 5 g barley. The experiment lasted 12 days. After an adaptation period of 6 days, the fermenters divided into 3 groups, first two vessels received no additives (control), second two vessels received 250 mg

rosemary extract daily, and third two vessels received 250 mg sage extract daily. During the experimental period rumen fluid pH and protozoa number were determined and samples were collected for the analysis of ammonia nitrogen (NH₃-N), volatile fatty acids (VFA) and dry matter digestibility. Rosemary and sage extracts had no effect on ruminal pH, total-VFA, propionate and butyrate production, total protozoa number, NH₃-N concentration and dry matter digestibility. However, acetate production and acetate/propionate ratio decreased ($p < 0.05$) when compared with the unsupplemented control fermenters. The results of this study showed that rosemary and sage extracts exerted beneficial effects on some fermentation parameters in the RUSITEC system. If these effects were also induced when these substances are added to the rations of ruminants, beneficial changes in the animals performance may be expected.

Key Words: Sage extract, rosemary extract, fermentation, rumen

Giriş

Rumen, geniş getiren hayvanların sindirim sistemlerinin hiç şüphesiz en önemli bölümüdür. Rumende bulunan mikroorganizmaların fermentatif faaliyetleri sonucu ruminantlar, insanların ve diğer hayvanların sindiremediği besin maddelerini değerlendirerek enerji kaynağına dönüştürür ve düşük kaliteli yem maddelerinden yüksek kaliteli proteinleri üretirler. Ancak canlı için çoğu zaman faydalı olan bu fermentasyon sürecinde yemden yararlanmayı kısıtlayan enerji ve protein kayıpları da şekillenmektedir. Yem brüt enerjisinin yaklaşık % 12'si ruminal fermentasyon sürecinde metan gazına dönüştürülerek geğirme (ruktus) yoluyla atmosfere atılır (Thornton ve Owens, 1981). Yine hayvanın tükettiği yem proteinleri rumendeki mikroorganizmalarca hızla sırasıyla peptitlere, aminoasitlere ve amonyağa parçalanmakta ve mikrobiyal proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Bir kısım amonyak ise rumen epitelinden emilerek karaciğerde üreye dönüştürülmektedir. Ürenin bir kısmı rumino-hepatik azot döngüsüne katılmakta, bir kısmı ise idrarla dışarı atılmaktadır. Dışarı atılan üre, hayvanın değerlendiremediği yem proteini olup, yemle alınan azotun % 20-25'lik kısmına karşılık gelmektedir (Leng ve Nolan, 1984). Bu kayıpların oluşumunda gram negatif bakterilere kıyasla rumende daha fazla hidrojen, metan, amonyak ve laktik asit üreten gram pozitif bakterilerin payı büyüktür. Dolayısıyla gram pozitif bakterileri baskılayıp fermentasyon profilini hayvanın lehine çevirebilmek için 1970'li yıllardan itibaren monensin başta olmak üzere gram pozitifler

üzerine etkili iyonofor grubu antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır (Russell ve Strobel, 1989). Ancak, hayvansal ürünlerde kalıntı bırakmaları ve bakterilerde direnç oluşturmaları nedeniyle, hayvan besleme alanında antibiyotik kullanımıyla ilgili kaygılar artmış, 1 Ocak 2006 itibarıyla antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanımları yasaklanmıştır (Jouany ve Morgavi, 2007). Bu yasağın ardından daha güvenli olan 'doğal' yem katkı maddelerinin hayvansal verimliliği artırma amaçlı kullanımı gündeme gelmiştir. Probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler ve ekzojen enzimler bu amaçla kullanılan yem katkı maddelerinden bazılarıdır. Son yıllarda ise özellikle antibiyotiklerin alternatifi olarak bitki ekstraktlarının kullanımı üzerinde durulmaktadır. Birçok bitki ekstraktının antibakteriyal, antiparaziter, antiviral özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Rios ve Recio, 2005).

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve adaçayı (*Salvia officinalis* L.) antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta, gıda ve ilaç sanayisinde kullanımları oldukça yaygın olan kuvvetli aromatik bitkilerdir (Biljana ve ark., 2007). Biberiyenin yapısında antimikrobiyal etkinlik gösteren karnosik asit, rosmarinik asit, karnosol, rosmarol, epirosmarol gibi fenolik maddeler bulunmaktadır. Bununla birlikte biberiyeden ekstre edilen eterik yağlarda yine antimikrobiyal etkinlik gösteren α -pinen, 1,8-sineol, kamfor, borneol gibi biyoaktif maddeler bulunmaktadır (Angioni ve ark., 2004; Faixová ve Faix, 2008). Adaçayı bitkisi de yoğun eterik yağ (α -tujon, amfor, viridiflorol, borneol, 1,8-sineol, β -tujon) ve fenolik içeriği (rosmarinik

asit, karnosol, karnosik asit, metil karnosat) nedeniyle birçok bakteri ve mantar türü üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (Biljana ve ark., 2007; Tajkarimi ve ark., 2010). Pintore ve ark. (2002), biberiyeden ekstre ettikleri eterik yağların gram pozitif bakteriler üzerine gram negatiflere kıyasla daha kuvvetli antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Adaçayıdan elde edilen ekstraktın ise vankomisine dirençli enterokoklar ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ile *Streptococcus pneumoniae* gibi gram pozitif bakteriler üzerine bakterisitik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Horiuchi ve ark., 2007). Antimikrobiyal özellikleri ile öne çıkan bu bitkilerin domuz ve kanatlılarda günlük kilo kazancını artırmak amacıyla antibiyotiklerin alternatifi olarak kullanılabilirlerine dair çalışmalar (Hernández ve ark., 2004; Marcin ve ark., 2006) bulunmasına rağmen, rumen metabolizmasına etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır. Bu bitkilerin ruminal fermentasyon üzerine etkileri ile ilgili az sayıdaki çalışmada çoğunlukla kısa süreli (24-48 saat) basit inkubasyon tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir (Castillegos ve ark., 2008; Hristov ve ark., 2008; O'Grady ve ark., 2006). Oysaki araştırmalar rumendeki mikroorganizma gruplarının belli bir süre sonunda eterik yağlara adaptasyon sağlayabileceklerini göstermiştir (Benchaar ve ark., 2007; Cardozo ve ark., 2004). Bu nedenle inkubasyonun ilk günlerinde fermentasyon parametrelerinde gözlenen etkilerin ilerleyen günlerde ortadan kalkma ihtimali söz konusudur.

Bu çalışmanın amacı, uzun süreli bir inkubasyon modeli olan RUSITEC sistemini kullanarak biberiye ve adaçayı ekstraktlarının rumendeki mikrobiyal fermentasyona *in vitro* etkilerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

İnkübasyon tekniği

Araştırmada yarı-sürekli kapalı bir inkübasyon metodu olan RUSITEC (**R**umen

Simulation **T**echnique) tekniği Czerkawski ve Breckenridge (1977)'in tanımladığı şekilde uygulanmıştır. Sistem temelde sıcaklığı 39°C olan su banyoları içerisinde muhafaza edilen fermenterler ile bunlar içerisinde yerleştirilmiş olan delikli iç kaplardan oluşmaktadır. İç kaplar, elektromotora bağlı olan vertikal karıştırıcılar ile dakikada 6 kez aşağı-yukarı hareket ettirilerek rumen kontraksiyonları taklit edilmektedir. Peristaltik pompalar ile fermenterlere iletilen günlük yaklaşık 750 ml suni tükürük solüsyonu ile (tampon solüsyon; pH: 7,40, ozmolalite: 293 mosmol/l) de sıvı döngüsü sağlanmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Tampon solüsyonun kimyasal bileşimi.
Table 1. Chemical composition of the buffer solution.

Kimyasallar	mmol/l
NaCl	28,00
KCl	7,69
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,22
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,63
NH ₄ Cl	5,00
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	10,00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	10,00
NaHCO ₃	97,90

Sistem fermenterlerine inokule edilecek rumen içeriği mezbahanedeki kesilmiş canlı ağırlıkları yaklaşık 45 kg olan iki erkek koyundan elde edilmiştir. Hayvan sahiplerinin koyunları beslediği rasyona (500 g/gün arpa ve *ad libitum* saman) uygun olması amacıyla, *in vitro* inkubasyonda da deneme yemi olarak aynı rasyon kullanılmıştır. Deneme yemi, önceden 0,5 cm uzunluğunda kesilen arpa samanının 5 gramı ve 5 gram ezilmiş arpanın hassas terazide tartılıp, 150 µm gözenekli naylon keselere yerleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Tablo 2'de deneme yeminin kimyasal bileşimi verilmiştir. Termokaplar içerisinde muhafaza edilip yaklaşık 30 dakika içerisinde laboratuara ulaştırılan taze rumen içerikleri, karıştırıldıktan sonra 3 katlı steril gazlı bezden süzülerek sıvı ve katı kısımlarına ayrılmıştır. Sıvı kısım fermenterlere aktarılmıştır. Delikli iç kaplara ise biri 80 gr katı rumen içeriği, diğeri ise

deneme yemi karışımı içeren 150 µm por genişliğine sahip 2 adet naylon kese yerleştirilmiştir. Katı rumen içeriği bulunan naylon kese 24 saat sonra deneme yemi karışımı içeren başka bir kese ile değiştirilmiştir. Her gün yem keselerinden sadece bir tanesi yenisiyle yer değiştirmiş, diğer kese ise 24 saat daha sistemde tutularak 48 saat sonra sistemden çıkarılmıştır. Anaerobik koşulların devamlılığı için ise yem keselerinin değişimi esnasında fermenterlere CO₂ uygulanmıştır.

Tablo 2. Deneme yeminin kimyasal bileşimi.

Table 2. Chemical composition of the experimental diet.

Besin Maddeleri	Arpa samanı (%)	Arpa (%)
Kuru madde	92,0	88,9
Ham protein	3,8	9,2
Ham yağ	1,4	1,7
Ham selüloz	31,0	4,3
Ham kül	7,5	2,4

Deney kurgusu

Araştırma 12 gün sürmüştür, bu sürecin ilk 6 günlük kısmı adaptasyon fazını, ikinci 6 günlük kısmı ise deneme fazını oluşturmuştur. Araştırma sürecinde RUSITEC sisteminde hacimleri 1000 ml olan 6 fermenter eşzamanlı olarak çalıştırılmıştır. Adaptasyon fazında fermenterlere hiçbir madde ilavesi yapılmamış ve rumen mikroorganizmalarının *in vitro* şartlara adaptasyonu sağlanmıştır. Deneme fazında ise RUSITEC sistemin 6 fermenteri 3 gruba ayrılmış, ilk iki fermentere herhangi bir ilave yapılmayıp kontrol fermenterleri olarak kullanılmış, ikinci iki fermentere günde 250 mg biberiye ekstraktı, üçüncü iki fermentere ise yine günde 250 mg adaçayı ekstraktı ilave edilmiştir. Etkileri araştırılan bitki ekstraktları doğrudan fermenterler içerisindeki rumen sıvılarına eklenmiştir. Literatürde, bitkisel eterik yağlar ve bunların aktif bileşiklerinin genel olarak 50-500 mg/l dozlarının ruminal fermantasyonu modifiye etme amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Calsamiglia ve

ark., 2007). Bu nedenle sunulan çalışmada biberiye ve adaçayı ekstraktlarının 250 mg dozu tercih edilmiştir. Araştırmada kullanılan biberiye ve adaçayının sıvı ekstraktları Kale Naturel Ltd. Şti.'den (Balıkesir) temin edilmiştir.

Numune toplanması ve analizler

Fermenterlerdeki rumen sıvılarının pH değerleri, araştırmanın deneme fazı boyunca her gün bir pH elektrotu (WD-35801-00, Oakton) ve bağlı olduğu pH metre (Ion 6, Acorn series, Oakton) yardımıyla ölçülmüştür. NH₃-N ve UYA analizi için numuneler, fermenterlerden geçen rumen sıvılarının toplandığı kuru buza yerleştirilmiş erlenmayerlerden her gün alınmıştır. NH₃-N analizi için alınan rumen sıvısı örnekleri doğrudan -20 °C'ye konulurken, UYA'ların analizi için alınan 5'er ml rumen sıvıları, 12 N H₂SO₄'den 90 µl eklendikten sonra -20 °C'ye konulmuştur.

NH₃-N analizi için alınan numuneler 4°C'de çözdürülmüş ve NH₃-N konsantrasyonu indofenol mavisi yöntemi ile kolorimetrik olarak 546 nm'de belirlenmiştir (Chaney ve Marbaeh, 1962).

UYA için alınan numuneler yine 4 °C'de çözdürüldükten sonra 30 dakika 13.000 g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, gözenek çapı 0,2 µm olan naylon filtrelerden geçirildikten sonra, asetik, propiyonik ve bütirik asit konsantrasyonları HPLC sisteminde (Dionex Summit P680, ASI100, UVD170), Rezex ROA organik asit kolonu (300x7.8 mm, Phenomenex) ve Rezex ROA organik asit koruyucu kolonu (50x7.8 mm, Phenomenex) kullanılarak belirlenmiştir (Oeztuerk ve ark., 2010). UYA'ların günlük üretim miktarları ise konsantrasyon değerlerinin erlenmayerlerde biriken günlük miktarları ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

Protozoon sayımı için, 1 litrelik balon jojeye 0,6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml % 37'lik formaldehit konmuş, üzeri 1000 ml çizgisine kadar distile su ile tamamlanarak protozoon sayım çözeltisi hazırlanmıştır. Fermenterlerden

alınan 1 ml rumen sıvısı 1 ml protozoon sayım çözeltisiyle karıştırılmış ve ışık mikroskobu ve Fuchs-Rosenthal lamı (derinlik: 0,2 mm, küçük kare alanı: 0,0625 mm²) yardımıyla protozoon sayımı yapılmıştır (Harmayer, 1965).

Yem kuru maddesi sindirilebilirlik oranı, yem maddelerinin fermantasyon öncesi ve sonrası içerdikleri kuru madde miktarları arasındaki fark belirlenerek hesaplanmıştır. Bunun için yem numunelerinin nemi, fermantasyon öncesi ve sonrasında 60 °C'lik etüvde 48 saat bekletilerek uzaklaştırılmış ve kuru madde miktarları belirlenmiştir. Kuru madde miktarları arasındaki fark sindirilebilirlik oranı olarak kabul edilmiştir (Ørskov ve ark., 1980).

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific, Erkrath, Almanya) istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile test edilmiş, varyans analizi sonucunda gruplar arasında fark tespit edildiğinde, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

P<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tablo 3'te sunulan sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Bulgular

Tablo 3'te biberiye ve adaçayı ekstraktlarının ruminal mikrobiyal fermantasyonun temel parametreleri üzerine olan etkileri görülmektedir. Biberiye ve adaçayı ekstraktları ruminal pH, toplam UYA miktarı, propiyonat ve bütirat üretimleri, toplam protozoon sayısı, NH₃-N konsantrasyonu ve yem kuru madde sindirilebilirliğinde istatistiksel bir değişime neden olmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte adaçayı ekstraktı eklenen grupta propiyonat üretiminde artma, NH₃-N konsantrasyonunda ise azalma eğilimi gözlenmiştir. Bununla birlikte biberiye ve adaçayı ekstraktı eklenen gruplarda, asetat üretimi sırasıyla % 19 ve % 13 oranında azalmıştır (P < 0,05). Asetatın propiyonata oranı da biberiye ekstraktı eklenen grupta % 19, adaçayı ekstraktı eklenen grupta ise % 21 oranında azalmıştır (P < 0,05).

Table 3. Biberiye ve ada çayı ekstraktlarının ruminal mikrobiyal fermantasyon üzerine *in vitro* etkileri.

Table 3. Effects of rosemary and sage extracts on *in vitro* rumen microbial fermentation.

Parametreler	Deneme grupları		
	Kontrol (0 g/gün)	Biberiye (250 mg/gün)	Adaçayı (250 mg/gün)
pH	6,78±0,04	6,77±0,05	6,80±0,03
Toplam UYA (mmol/gün)	26,70±2,21	24,03±2,66	25,31±2,83
Asetat	14,74±1,29 ^a	12,08±1,91 ^b	12,79±1,46 ^b
Propiyonat	7,66±0,93	7,67±0,91	8,39±1,26
Bütirat	4,30±0,65	4,28±0,54	4,13±0,47
Asetat : propiyonat	1,94±0,24 ^a	1,59±0,28 ^b	1,54±0,17 ^b
Toplam protozoon (x10 ³ /ml)	3,70±5,63	4,01±9,02	3,91±9,28
NH ₃ -N (mmol/l)	3,46±0,48	3,19±1,03	3,06±0,70
Yem kuru maddesi sindirilebilirliği (%)	44,87±7,77	39,93±5,66	40,37±5,82

^{a, b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı (P < 0,05) göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama ± standart sapmadır.

Tartışma ve Sonuç

Bitkiler kendilerini parazitlere, insektlere ve kendi türleri arasındaki rekabete karşı korumak

için birtakım ikincil bioaktif metabolitler sentezlerler. Antimikrobiyal özelliğe sahip olan, adeta birer antibiyotik gibi iş gören ve

fitokimyasallar olarak da adlandırılan bu metabolitler arasında karotenoidler, alkaloidler, flavanoidlerin de içinde bulunduğu fenolik bileşikler ile tanenler, saponinler ve eterik yağlar yer alır (Kaçar, 2008). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneyler adı geçen metabolitleri yoğun olarak içeren bazı bitki ekstraktlarının rumende metan, amonyak ve laktik asit üretimini azalttığını, asetatın propiyonata oranını düşürerek rumendeki uçucu yağ asidi profilini hayvanın lehine çevirdiğini ortaya koymuştur (Cardozo ve ark., 2004; Castillegos ve ark., 2008). Araştırmalar, biberiye ve adaçayıdan elde edilen ekstraktların da yüksek oranda eterik yağ ve fenolik bileşik içerdiğini göstermektedir (Biljana ve ark., 2007).

Rumende, karbon içeren bileşiklerin mikrobiyal fermantasyonu sonucu şekillenen ve ruminantın günlük enerji ihtiyacının % 70'ini karşılayan uçucu yağ asitlerinden başlıcaları asetik, bütirik ve propiyonik asittir (Yang ve ark., 1970). Bunlardan asetik ve bütirik asidin mikrobiyal üretimi esnasında fazla miktarda hidrojen açığa çıkmaktadır. Hidrojen ise methanojenik bakterilerce kullanılmakta, CO₂ ile birleştirilerek metan gazına dönüştürülmektedir. Ruminantlarda ruktusla dışarı atılan metan gazı ile besinlerle elde edilen brüt enerjinin % 12'si kaybedilmektedir (Thornton ve Owens, 1981). Propiyonik asidin üretimi esnasında ise asetik ve bütirik asidin aksine, ortamdaki hidrojen iyonları kullanılmaktadır. Ayrıca propiyonik asit glikojenik bir enerji kaynağı olup, özellikle laktasyon döneminde hayvanın ihtiyaç duyduğu glikozun % 90'undan sorumlu olan bir karbon kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır (Yost ve ark., 1977). Asetik ve bütirik asidin ise propiyonik asit gibi glikoneogenezise katılması söz konusu değildir (Newbold ve ark., 1998). Tüm bu sebeplerden dolayı UYA profilini propiyonat lehine çevirmek, yem enerjisinin ruminant tarafından daha verimli kullanılmasına aracılık etmektedir. Sunulan araştırmada hem biberiye hem de adaçayı ekstraktı, asetat miktarını ve asetatın propiyonata oranını azaltmıştır. Ayrıca adaçayı eklenen grupta propiyonat üretiminde artma, bütirat üretiminde ise azalma eğilimi gözlenmiştir. Castillegos ve ark. (2008) 24

saatlik basit inkubasyon tekniği kullanarak biberiye ve adaçayı eterik yağlarının ruminal fermantasyon üzerine etkilerini araştırmışlar, her iki eterik yağın 5 ve 50 mg/l'lik dozlarının fermantasyon parametreleri üzerinde bir değişikliğe yol açmadığını gözlemlemişlerdir. Aynı araştırmada 500 mg/l'lik dozlar ise bizim sonuçlarımıza benzer şekilde ruminal pH ve toplam UYA miktarını değiştirmemiş, asetat ve bütirat miktarı ile asetatın propiyonata oranını azaltmış, propiyonat miktarını ise artırmıştır. Aynı şekilde O'Grady ve ark. (2006), biberiye ekstraktının kısa süreli inkubasyon sisteminde asetatın propiyonata oranını belirgin bir şekilde azalttığını ve bu etkinin monensinin etkisine benzer olduğunu bildirmişlerdir. Zira iyonofor grubu bir antibiyotik olan ve antibiyotiklerin yasaklanmasından önce yaygın bir şekilde kullanılan monensin rumendeki bakteriyel flora üzerinde seçici bir etkinlik göstererek gram pozitif bakterileri baskılamakta, bu yolla asetat ve bütirat üretimlerini azaltıp, propiyonat üretimini artırmaktadır (Martinez ve ark., 2006). Bizim araştırmamızda da toplam UYA miktarı değişmeksizin asetatın propiyonata oranının düşmesi, biberiye ve adaçayı eterik yağlarının etki mekanizmasının monensine benzediğini düşündürmektedir.

Kuru madde sindirilebilirliğinde her iki bitki ekstraktı eklenen grupta da istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Yapılan literatür taramalarında biberiye ve adaçayının yem maddelerinin sindirilebilirliğine etkileri ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak Martinez ve ark. (2006), kekik eterik yağının rumende kuru madde sindirilebilirliğini azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu etkiyi ilgili eterik yağın rumen mikroorganizmaları üzerine seçici olmayan kuvvetli antimikrobiyal etkisine bağlamışlardır.

Rumende amonyak üreten bakterilerin baskılanarak proteinlerin deaminasyonu sonucu şekillenen azot kaybının önüne geçilmesi, ruminal azot değerlendirilebilirliği açısından önem taşımaktadır (Leng ve Nolan, 1984). Sunulan araştırmada, NH₃-N konsantrasyonu her iki bitki ekstraktı eklenen grupta istatistiksel olarak değişmemiş olmakla birlikte, adaçayı ekstraktı eklenen grupta azalma eğilimi

göstermiştir. Bu bulgu etkileri araştırılan her iki bitki ekstraktının da proteolitik mikroorganizmalar üzerine olan baskılayıcı etkisinin sınırlı düzeyde olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, Hristov ve ark. (2008) yaptıkları kısa süreli *in vitro* inkübasyon denemesinde, biberiye ve adaçayı eterik yağlarının 10 ve 100 mg/l dozlarının ruminal NH₃-N konsantrasyonuna istatistiksel bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Rumende protozoonlar da tıpkı gram pozitif bakteriler gibi fazla miktarda hidrojen ve amonyak üretmekte, rumendeki bakterileri yutarak bakteriyel proteinlerin intestinal emilimini kısıtlamakta ve metanojenik bakterilerle simbiyotik ilişki kurarak metan üretimini artırmaktadırlar. Birçok faydalı etkiye de sahip olmalarına rağmen yapılan çalışmalar protozoon sayısının azalmasının ruminant verimliliğini olumlu yönde etkileyebileceğini göstermiştir (Sio, 1997). Sunulan çalışmada, biberiye ve adaçayı ekstraktları protozoon sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Rasmussem ve ark. (2005) 19 eterik yağın protozoonlar üzerine etkilerini araştırmışlar, bunlar arasında bulunan biberiye eterik yağının 100 mg/l dozunun herhangi bir antiprotozoal etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Ancak 1000, 10000, 40000 mg/l dozlarında sırasıyla % 50, % 90 ve % 90 oranında antiprotozoal etki gözlemlenmişler, fakat bu miktarların pratikte uygulanabilirliğinin zor olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, biberiye ve adaçayı ekstraktlarının ruminal fermantasyonun bazı parametreleri üzerinde olumlu etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca araştırma sonuçlarının kısa süreli inkübasyon teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla paralellik göstermesi rumen mikroorganizmalarının biberiye ve adaçayı ekstraktlarına karşı adaptasyon geliştiremediklerini, dolayısıyla gözlenen etkilerin kalıcı olabileceğini düşündürmektedir. Biberiye ve adaçayı ekstraktlarının özellikle asetat üretimini baskılayarak asetatın propiyonata oranını düşürmesi iyonofor grubu bir antibiyotik olan monensinin ruminal etkilerine de benzemek-

tedir. Dolayısıyla bu maddelerin ruminant rasyonlarına ilavesi yine benzer etkiler meydana getirdiği takdirde hayvan verimliliğinde olumlu değişiklikler oluşturabilir. Bu amaçla yapılacak *in vivo* araştırmalar konunun netleşmesi açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coronea, V., Cabras, P., 2004.** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3530-3535.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J., Chouinard, P.Y., 2007.** Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science 90, 886-897.
- Biljana, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E., 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 7879-7885.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., Fandino, I., 2007.** The use of essential oils in ruminants as modifiers of rumen microbial fermentation. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop, November 13-14, Grantville PA, 87-100.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004.** Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. Journal of Animal Science 82, 3230-3236.
- Castillegos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J., Wijlen, H.T., 2008.** *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. Animal Feed Science and Technology 145, 259-270.
- Chaney, A.L., Marbaeh, E.P., 1962.** Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clinical Chemistry 8, 130-132.
- Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., 1977.** Design and development of a long-term rumen

- simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 38, 371-384.
- Faixová, Z., Faix, Š., 2008.** Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil (A Review). *Folia Veterinaria* 52, 135-139.
- Harmayer, J., 1965.** Zur Methodik experimenteller Untersuchungen an Pansenprotozoen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 12(9), 841-880.
- Hernández, F., Madrid, J., García, V., Orengo, J., Megios, D., 2004.** Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility and digestive organ size. *Poultry Science* 83, 169-174.
- Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Koroda, T., Tsuchiya, T., 2007.** Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30, 1147-1149.
- Hristov, A.N., Ropp, J.K., Zaman, S., Melgar, A., 2008.** Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. *Animal Feed Science and Technology* 144, 55-64.
- Jouany, J.P., Morgavi, D.P., 2007.** Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1, 1443-1446.
- Kaçar, D., 2008.** Screening of some plant species for their total antioxidant and antimicrobial activities. Master thesis, İzmir Institute of Technology, İzmir.
- Leng, R.A., Nolan, J. V., 1984.** Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 67, 1072-1089.
- Marcin, A., Laukova, A., Mati, R., 2006.** Comparison of the effects of *Enterococcus faecium* and aromatic oils from sage and oregano on growth performance and diarrhoeal diseases of weaned pigs. *Biologia (Bratislava)* 61, 789-795.
- Martinez, S., Madrid, J., Hernández, F., Megias, M.D., Sotomayer, J.A., Jordan, M.J., 2006.** Effect of thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6598-6602.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Wallace, R.J., 1998.** Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Canadian Journal of Animal Science* 78, 241-244.
- Oeztuerk, H., Emre, B., Sagmanligil, V., Pıksin, İ., Fidancı, U.R., Pekcan, M., 2010.** Effects of nisin and propolis on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 2752-2758.
- O'Grady, M.N., Maher, M., Troy, D.J., Moloney, A.P., Kerry, J.P., 2006.** An assesment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science* 73, 132-143.
- Ørskov, E.R., Hovell, F.D.B., Mould, F., 1980.** The use of the nylon bag technique for the evaluation of feed stuffs. *Tropical Animal Health and Production* 5, 195-213.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J., 2002.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 15-19.
- Rasmussem, M., Franklin, S., McNeff, C., Carlson, S., 2005.** Control of pathogens using defaunation. In: *Proceedings of the Third International Conference on Enteric Diseases: Strategies in the Prevention of Enteric Disease and Dissemination of Food-Bourne Pathogens*, Rapid City, South Dakota, USA.
- Rios, J.L., Recio, M.C., 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 80-84.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., 1989.** Minireview: Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1-6.
- Sio, C.C., 1997.** *In vitro* studies on the adhesion of fibrobacter succinogenes strain D3 to microcry stalline cellulose. Master Thesis, Institute of Bioscience, Malaysia.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010.** Review: Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199-1218.
- Thornton, J.H., Owens, F.N., 1981.** Monensin supplementation and *in vitro* methane production by steers. *Journal of Animal Science* 52, 628-634.
- Yang, M.G., Monoharan, K., Mickelsen, O., 1970.** Nutritional contribution of volatile fatty acids from the cecum of rats. *Journal of Nutrition* 100, 545-550.
- Yost, W.M., Young, J.W., Schmidt, S.P., McGilliarg, A.D., 1977.** Gluconeogenesis in ruminants: Propionic acid production from a high-grain diet fed to cattle. *Journal of Nutrition* 107, 2036-2043.