

Yeni Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Farklı Kuru Madde İçeriğine Sahip Yonca (*Medicago sativa* L.) Silajında Mikrobiyel İnokulant Olarak Kullanılma Olanakları*

Mustafa KIZILŞİMŞEK^{1*}, Kübra KEKLİK², Tuğba GÜNAYDIN³

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş, ^{2,3}Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri ABD, Kahramanmaraş, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-0295-0603>, ²<https://orcid.org/0000-0002-9527-288X>, ³<https://orcid.org/0000-0002-4458-1287>,

✉: mkizil@ksu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, ülkemiz florasından izole edilen *L. bifermentans* ve *L. brevis* bakterilerinin, KM içeriği %23.92 olan ve soldurularak %32.97 seviyesine çıkarılan yonca materyallerine aşılmasının silaj kalitesine olan etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda, soldurmanın fermentasyon profili üzerine önemli etkilerinin olduğu, pH seviyesini düşürdüğü ve kuru madde kayıplarını azalttığı belirlenmiştir. Bakteri aşılmasının ise pH, asetik asit, propiyonik asit ve bütrik asit içeriğini düşürdüğü, laktik asit üretimini artırdığı belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, ham protein içeriği ve laktik asit değerleri dikkate alındığında, yonca silajında soldurma ve *L. brevis* izolatı ile aşılamanın başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 20.02.2020

Kabul Tarihi : 30.04.2020

Anahtar Kelimeler

Yonca.

İnokulasyon.

Soldurma.

Laktik asit bakterisi

Using Possibilities of New Lactic Acid Bacteria Isolates as Microbial Inoculant on Different Dry Matter Containing Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Silage

ABSTRACT

In this study, inoculation effects of two lactic acid bacteria, *L. bifermentans* and *L. brevis*, isolated from flora of Turkey, on alfalfa silage containing 23.92% DM (unwilted), and 32.97% DM (wilted) were investigated. Result of the research indicated that wilting effected the fermentation profile significantly by decreasing the pH level and increasing dry matter preservation. Bacterial inoculation decreased the pH level, increased the production of lactic acid, whereas decreased the acetic acid, propionic acid and butyric acid in silage content. *L. brevis* strain as well as wilting can be used successfully in alfalfa silage production when crude protein and lactic acid production in silage were taken into consideration.

Research Article

Article History

Received : 20.02.2020

Accepted : 30.04.2020

Keywords

Alfalfa

Inoculation

Wilting

Lactic acid bacteria

To Cite : Kızılşimşek M, Keklik K, Günaydın T 2020. Yeni laktik asit bakteri izolatlarının farklı kuru madde içeriğine sahip yonca (*Medicago sativa* L.) silajında mikrobiyel inokulant olarak kullanılma olanakları. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 23 (5): 1331-1339. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.691853.

GİRİŞ

Silaj, birçok ülkede ruminant rasyonlarının temel bileşenlerinden biri konumuna gelmiştir. Günümüzde, dünyanın en büyük ve geniş fermentasyon prosesinin silaj yapımı olduğu ve yalnızca Avrupa Birliği içerisinde yılda yaklaşık 300 milyon ton silaj üretildiği bildirilmiştir (Jatkauskas ve Vrotniakiene. 2016).

Yonca bitkisi yüksek protein oranı ile bilinen bir yem bitkisidir. Ülkemizde genellikle kuru otu elde edilmekte ve hayvanlara kuru otu veya samanı yedirilmektedir. Ekim alanı ise 2011-2015 döneminde yaklaşık %20 oranında artarak 6.4 milyon dekaraya ulaşmıştır (TUIK, 2019). Yonca bitkisinden kuru ot elde edilmesinde, biçimden sonra doğal kurumunun sağlanması ve nem içeriğinin en azından %20'nin altına düşürülmesi için tarla yüzeyinde uzun süre

bekletilmekte, balyalama ve taşıma sırasında önemli mekanik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Daha da önemlisi, yoncunun özellikle ilk ve son biçimlerinin yağışlı havalara rastlaması durumunda, kurutma gecikmekte, yem kalitesi bozulmaktadır. Ayrıca yonca namlularının altında kalan bitkiler zarar görmekte ve çok önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Böyle durumlarda yoncunun silaj yapılma olanağı değerlendirilmelidir. Silaj yapımında tamamen kurutma yerine kısa süreli soldurma uygulamaları yaygındır. Soldurma ve silaj yapma işlemi biçilen yonca tarla üzerinde uzun süre bekletilmediğinden, yağışlardan korunma olasılığı artar ve ayrıca kalite kayıpları önemli oranda azalır.

Yoncunun silolanmasını önemli ölçüde zorlaştıran başlıca faktörler yüksek protein içeriği, düşük suda

çözünebilir karbonhidrat (SÇK) düzeyi (<%1.5), düşük kuru madde içeriği ve yüksek tamponlanma kapasitesi (Tk) olarak sıralanabilir (Dordevic ve ark., 2016). Yonca silajlarında yeterli laktik asit (LA) üretimi olmamakta ve bunun yerine asetik asit (AA), etanol ve CO₂ üretimi veya clostridyal fermentasyon sonucu bütrik asit (BA) oluşumu gerçekleşmektedir. Bu durum kaliteli yonca silajı yapımını güçleştirmekte ve LA üretebilecek mikrobiyel inokulantların önemini de bir kat daha artırmaktadır.

Dünyada silaj yapımı ile ilgili çalışmalar özellikle son 25 yıl içerisinde büyük bir ivme kazanmış ancak yonca silajlarında pH seviyelerini 4.5-4.7 aralığına veya daha da altına indirebilecek pratik, etkin ve ekonomik bir uygulama henüz bulunmamaktadır. Yonca silajlarında pH seviyesini düşürebilmek için genel olarak SÇK kaynağı olarak tahıl kırmaları, melas veya peynir altı suyu gibi katkıları (Canbolat ve ark., 2019), yemin kuru maddesini (KM) artırmak için soldurma uygulaması (Tao ve ark., 2017) veya kuru pancar talaşı ve buğday kepeği gibi katkıları kullanılmaktadır. Ayrıca, son yıllarda yonca silajında da bakteri inokulasyonu ve enzim uygulamaları yaygınlaşmıştır (Koç ve ark., 2020; Tyrolova ve Vyborna. 2011; Schmidt ve ark., 2009; Jatkauskas ve Vrotniakiene, 2016).

Bu çalışmada, daha önce bir TUBITAK projesi kapsamında ülkemiz doğal kaynaklarından izole edilen ve 695 bakteri izolatı içerisinde fermentasyon ve aerobik stabilite özellikleri dikkate alınarak seçilen 2 adet LAB izolatının (LS65-2-1 *Lactobacillus bifermentans* ve LS55-2-2 *Lactobacillus brevis*) farklı KM içeriğine sahip yonca silajının kalitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak üretici tarlasında yetiştirilen ve 3. yılında bulunan Elçi yonca

çeşidi kullanılmıştır. Yonca bitkisi Türkoğlu ilçesine bağlı Araplar mahallesinde, sulu şartlarda yetiştirilmiştir. Yabancı ot sorununu en aza indirmek amacıyla ilk biçim yonca kullanılmamış olup. 2. biçiminden elde edilen bitkisel materyal kullanılmıştır. Biçilen yonca içerisindeki yabancı otlar silaj yapımı öncesi ayıklanmıştır.

Mikroorganizma materyali olarak, bir TUBITAK projesi kapsamında. ülkemiz florasından izole edilmiş ve yüksek miktarda LA üretme yeteneğine göre 695 izolat arasından seçilmiş 2 adet LAB izolatı (*L. bifermentans* ve *L. brevis*) kullanılmıştır. LAB materyali olarak kullanılan izolatların her ikisi de basil koloni tipine sahip olup, bunlardan LS-65-2-1 kod numaralı *Lactobacillus bifermentans* izolatı homofermentatif. LS-55-2-2 kod numaralı *Lactobacillus brevis* izolatı ise heterofermentatif fizyolojik karakterlere sahiptir.

Metot

Araştırmada kullanılan bakteriyel inokulantların hangi KM seviyesinde daha etkin olduğunu belirlemek amacı ile yonca bitkisinde soldurma işlemi yapılmıştır. İnokulasyonlar hem soldurulmuş hem de soldurulmamış yonca bitkisine uygulanmıştır. Ayrıca hem soldurulan ve hem de soldurulmayan yonca bitkisine kontrol uygulaması olarak inokulasyon yapılmadan da silolama yapılmıştır. Soldurma işlemi biçimden sonra ve doğrayıcıda parçalanmadan önce, gölgede ve açık havada yapılmıştır. Bitkilerden her yarım saatte bir örnek alınarak mikrodalga fırında KM değişimi takip edilmiş ve KM içeriği %32-33 aralığına geldiğinde doğrama ve silolama işlemleri yapılmıştır. Biçimden sonra doğrama aşamasına kadar bitkiler 3 saat süre ile soldurulmuştur. Çalışmada araştırmaya konu olan inokulasyon uygulamaları ve yonca KM içerikleri Çizelge 1'de verilmiştir. Araştırma tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre planlanmış ve yürütülmüştür.

Çizelge 1. Soldurulmamış ve soldurulmuş yonca otunda KM içerikleri

Table 1. DM contents of unwilted and wilted alfalfa

Uygulama No	Soldurma ve İnokulasyon Uygulamaları	KM (%)
1	Soldurulmamış. İnokulasyon yok	23.81
2	Soldurulmamış <i>L.bifermentans</i> inokule edilmiş	23.50
3	Soldurulmamış <i>L.brevis</i> inokule edilmiş	24.45
4	Soldurulmuş İnokulasyon yok	32.71
5	Soldurulmuş <i>L.bifermentans</i> inokule edilmiş	33.06
6	Soldurulmuş <i>L. brevis</i> inokule edilmiş	33.14

Bitki materyali doğrayıcı makinede teorik olarak 2-3 cm uzunlukta parçalandıktan sonra, daha önceden MRS broth besi yerinde geliştirilmiş olan LAB ile 10⁵ cfu/g yoğunlukta inoküle edilmiştir. Her bir inokulasyonda bakteriler 10 ml Ringer solüsyonunda seyreltilerek ve el pülverizatörü ile püskürtülerek

uygulama yapılmıştır. Kontrol grubuna diğer muamele gruplarına eşdeğer 10 ml Ringer solüsyonu ilave edilmiştir. İnokulasyondan sonra her bir uygulama kendi içinde ve steril eldivenler giyilerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra her silaj örneği 400 g (±20 g) yeşil materyal içerecek

şekilde özel plastik torbalara konulmuş, vakum makinası ile vakumlanarak içerisindeki O₂ %99.9 seviyesinde alınmış ve ağızları otomatik olarak yapılandırılmıştır. Her uygulama için silaj yapımından sonraki 0, 12, 24, 36 ve 48. saatlerde (sırasıyla; T₀, T₁₂, T₂₄, T₃₆ ve T₄₈) fermentasyonun 60. günü (T_{60g}) olmak üzere toplam 6 adet açım zamanı belirlenmiştir. Her bir açım zamanı için 3 tekrerrür olmak üzere toplam 18 paket silaj yapılmıştır.

Araştırmada silaj yapılmadan önceki yeşil materyalde (T₀) ve T₁₂, T₂₄, T₃₆ ve T₄₈ saatlerdeki ve fermentasyonun 60 gününde açılan (T_{60g}) silajlarda örnekler 1/10 oranında Ringer solusyonu ile seyreltilmiş, blender ile yüksek devirde 1 dakika karıştırıldıktan sonra Whatman 54 filtre kağıdından süzölmüştür. Açılan silaj örnekleri, pH ölçümünden sonra, organik asit ve SÇK analizleri için -20°C'de saklanmıştır.

Açılan silajlarda LA, AA, BA ve PA analizleri Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır (Quiros ve ark., 2009). Hazırlanan örnekler, örnek temizleme prosedüründen sonra HPLC'de 42 °C'de 0.6 ml/dk akış hızında ve RID dedektör kullanılarak tespit edilmiştir. SÇK analizi Deriaz (1961)'in bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Silaj öncesi (T₀) başlangıç materyalinin KM içeriği ve 60 günlük silolama sonrasındaki (T_{60g}) KM içeriği belirlenmiş (78 °C'de 48 saat etüvde) ve kuru madde kayıpları ortaya konulmuştur. T₀ ve T₁₂, T₂₄, T₃₆ ve T₄₈ dönemlerinde açılan her silajın asitlik derecesini belirlemek için pH

ölçümleri yapılmış ve silolamanın başlangıcından itibaren pH değişimi ve düşüş hızı belirlenmiştir. Ayrıca T₆₀ silajlarında da pH ölçümleri yapılmıştır.

Açılan tüm silajlardan KM içeriğini belirlemek amacı ile 50±5 g örnek 78 °C'de 48 saat kurutulduktan sonra tartılmıştır. Aynı örnekler öğütüldükten sonra HP, ADF ve NDF analizleri için kullanılmıştır. T_{60g} silajlarında azot içeriği Kjeldahl metodu ile belirlenmiş ve protein oranları hesaplanmış (AOAC, 1990), yemlerin hücre duvarı bileşenlerini oluşturan ADF ve NDF analizleri Ankom Fiber Analiz cihazından (Fiber Analyser, ANKOM marka, A220 model) yararlanılarak yapılmıştır (Van Soest ve ark., 1991).

İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerden istatistiksel analize ihtiyaç duyulanları için, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseninde varyans analizi yapılmış, uygulamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde Statistical Analysis Software programı kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Silajların pH değerleri

Farklı KM içeriğine sahip kontrol ve farklı bakterilerle inokule edilmiş silajların farklı açım zamanlarındaki pH değerlerine ait ortalamalar ve oluşan gruplar Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Farklı KM içeriğine sahip inokule edilmiş ve edilmemiş silajların farklı açım zamanlarındaki pH değerleri

Table 2. pH values in different opening times of alfalfa silages inoculated or non-inoculated

		Açım Zamanları (Opening Periods)					
Bakteri Aşılması (Bacterial Inoculation)		T ₀	T ₁₂	T ₂₄	T ₃₆	T ₄₈	T _{60g}
DM Durumu (Unwilted)	Kontrol	6.22	5.86	5.87 a	5.75	5.60 a	5.18 b
	<i>L. bifermentans</i>	6.21	5.51	5.44 b	5.49	5.45 b	5.41 a
	<i>L. brevis</i>	6.19	5.50	5.73 a	5.64	5.61 a	5.48 a
	Ort	6.21	5.62 A	5.68A	5.63A	5.55A	5.36A
KM Durumu (Wilted)	Kontrol	6.19	5.47	5.85 a	5.49	5.43 b	5.23 b
	<i>L. bifermentans</i>	6.22	5.32	5.12 c	4.94	4.92 c	4.87 c
	<i>L. brevis</i>	6.22	5.18	5.07 c	4.98	4.96 c	4.89 c
	Ort	6.21	5.33 B	5.35B	5.14B	5.11B	5.00B
Bakteri Ortalaması (Mean of Bacteria)	Kontrol	6.21	5.67 a	5.86 a	5.62 a	5.52 a	5.21
	<i>L. bifermentans</i>	6.22	5.41 b	5.28 b	5.21 b	5.20 b	5.14
	<i>L. brevis</i>	6.20	5.34 b	5.40 b	5.31 b	5.29 b	5.19
Genel Ort.		6.21	5.475	5.515	5.385	5.33	5.18
LSD Değerleri		T12: KM:0.129. Bakteri:0.158 -T24 KM:0.138 Bakteri:0.169 KM*B:0.195 -T36 KM:0.173. Bakteri:0.21 - T48: KM:0.13 Bakteri:0.16 KM*B:0.334 -T60:KM:0.088 KM*B:0.122					

Farklı KM içeriğine sahip ve farklı bakteri izolatları ile aşılanaan yonca silajlarının, silolama öncesindeki (T₀) pH seviyeleri incelendiğinde, pH değerlerinin 6.19 ve 6.22 gibi dar bir aralıkta kaldığı, değerler arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı, KM içeriğinin veya inokulasyonun başlangıç

materyalinin pH düzeyini etkilemediği görülmektedir. Bununla birlikte, anaerob şartların sağlanmasını izleyen ilk 12 saat içerisinde (T₁₂) pH seviyesinin hem soldurma hem de bakteri aşılması uygulamalarından önemli derecede etkilendiği ve bu durumun ilk 48 saat boyunca devam ettiği belirlenmiştir. Anaerob şartların

sağlanmasını izleyen ilk açım zamanında (T_{12}), KM içeriği düşük olan silajların pH değeri 5.62 olarak ölçülürken, KM içeriği yüksek olan soldurulmuş silajlarda bu değer 5.33 olarak ölçülmüştür. Bu açım zamanındaki bakteri aşılması yapılmamış ve inoküle edilmiş silajların pH değerleri incelendiğinde, bakteri aşılması yapılan silajlarda kontrole göre daha düşük pH değerlerine ulaşıldığı izlenmektedir. Benzer durum T_{24} , T_{36} ve T_{48} açım zamanlarında da izlenmiş, bu açım zamanlarında da soldurulmuş silajların pH değerleri soldurulmamış olanlardan daha düşük, aşılama yapılmış olan silajlarda da aşılama yapılmamış olanlara göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Silajların T_{48} açım zamanına kadar olan pH değerleri incelendiğinde, en hızlı pH düşüşünün T_{12} açım zamanında gerçekleştiği, bundan sonra T_{36} açım zamanına kadar pH seviyesindeki düşüşün sınırlı kaldığı, ancak T_{48} açım zamanında da bir önceki açım zamanına göre fark edilir düzeyde bir pH düşüşü olduğu açıkça görülmektedir. T_{48} açım zamanındaki pH seviyeleri incelendiğine, silolamanın erken dönemlerinde hem KM içeriğinin ve hem de bakteri aşılmasının pH'nın düşüş seyri üzerine önemli etkilerde bulunduğu açıkça görülmektedir. Nitekim KM içeriği yüksek olan soldurulmuş silajlarda T_{48} açım zamanında pH değeri 5.11 olarak ölçülürken, soldurulmamış ve KM içeriği düşük silajlarda bu değer 5.55 olarak ölçülmüştür.

Silajların T_{24} açım zamanlarındaki KM x Bakteri aşılması interaksyonunun önemli bulunduğu, inoküle edilmemiş silajlarda pH değerlerinin birbirine yakın olduğu, aşılama yapılmasının pH değerlerinde azalmalara neden olduğu, ancak bu azalmanın hem uygulanan bakteri türüne hem de silajın KM içeriğine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Soldurulmamış silajlarda *L. bifementans* ile yapılan aşılama 5.44 pH değeri elde edilirken, bu silajlarda *L. brevis* kültürü ile yapılan aşılama pH değeri 5.73 olarak elde edilmiştir. Kuru madde içeriği yüksek olan soldurulmuş silajlarda ise, *L. bifementans* kültürü ile yapılan aşılama pH değeri 5.12 olarak ölçülürken, *L. brevis* ile yapılan aşılama pH değeri 5.02 olarak gerçekleşmiştir. Soldurulmamış silajlarda *L. bifementans* bakterisi, *L. brevis* izolatına kıyasla daha asidik bir silaj üretirken, soldurulmuş silajlarda *L. brevis* kültürü pH seviyesini düşürmede daha etkili olmuştur. Diğer bir ifade ile, farklı bakteri kültürleri ile yapılan aşılama, KM içeriğine bağlı olarak, birbirinden farklı pH değerleri elde edilmiş ve bu durum bir interaksyona neden olmuştur. Benzer sonuçlar T_{48} açım zamanında da kendini göstermiştir. *L. bifementans* aşılması ile hem soldurulmamış hem de soldurulmuş silajlardaki pH seviyesi aşılama yapılmamış silajlara göre daha düşük bulunmuş ancak soldurulmuş silajlardaki pH düşüşünün daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Nitekim, soldurulmamış silajlarda *L. bifementans* ve *L. brevis* ile yapılan

aşılamalardan elde edilen pH değerleri sırasıyla 5.45 ve 5.61 olarak gerçekleşmiş ve bu değerler istatistiksel olarak farklı guruplara yerleşmiştir (Çizelge 2). Ancak, soldurulmuş silajlarda yapılan aşılama her iki bakteri kültüründen elde edilen pH değerleri aynı grup içerisinde yer almıştır. Bununla birlikte, *L. brevis* izolatı soldurulmamış materyalde pH düzeyini kontrole göre önemli derecede etkilemezken, soldurulmuş silajlarda kontrole göre önemli derecede düşürmüş ve bir interaksyonun oluşmasına neden olmuştur.

Elde edilen verilerden, yonca silajı yapımında KM içeriğinin pH seviyesini etkileyen önemli bir faktör olduğu açıkça söylenebilir. Nitekim Agarussi ve ark., (2019), yonca silajında soldurma ile silolamanın 56. günündeki pH seviyesinin 4.95 olarak tespit edildiğini, soldurulmamış silajlar için bu değer 5.10 olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Dumlu Gül ve ark., (2015), yonca bitkisinde hasat zamanını geciktirerek KM içeriğinin yükselmesini sağladıkları çalışmalarında, yüksek KM içeren yonca silajlarında pH değerinin 4.80 olarak tespit edildiğini, soldurulmamış silajlarda ise 5.60 olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Cavalların ve ark., (2005), KM miktarının artmasıyla birlikte, baklagillerde pH düşüşüne engel olan Tk'nın azaldığını, bu nedenle pH düşüşünün kolaylaştığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Tao ve ark., (2017), yonca silajında KM içeriğinin %20.04 seviyesinden soldurma ile %34.15 seviyesine çıkardıklarında, silaj pH seviyesinin de sırasıyla %4.72'den %4.10'a kadar gerilediğini bildirmişlerdir.

Bununla birlikte, T_{48} açım zamanında bakteri inokulasyonu yapılmayan silajlarda pH seviyesi 5.52 olarak gerçekleşirken, *L. bifementans* izolatı ile aşılama silajlarda pH değeri 5.20 ve *L. brevis* ile aşılama silajlarda da 5.29 değerlerine ulaşılmıştır. Bu durum yonca silajında bakteri aşılmasının pH seviyesini düşürmede önemli bir uygulama olduğunu açıklamaktadır. Özellikle silaj fermentasyonunun ilk dönemlerinde pH seviyesini hızlı bir şekilde düşmesini sağlamak, fermentasyon kalitesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Jatkauskas ve Vrotniakiene (2016), bakteri aşılması yapılmış ve aşılama yapılmamış yonca silajında, silolamanın ilk üç günü içerisinde pH değişimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, bakteri aşılmasının silolamanın erken dönemlerinde pH düşüşünü önemli derecede etkilediğini, pH seviyesinin hızlı bir şekilde düşmesinin proteolisis olayını azalttığını, aynı zamanda 97 gün sonra açılan silajlarda da bakteri uygulaması ile daha düşük pH değerlerine ulaşıldığını bildirmişlerdir. Kızılsimşek ve ark., (2007), LAB aşılmasının, silo içerisindeki mikrobiyel rekabeti LAB lehine çevirdiğini ve pH düşüş hızını artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Lui ve ark., (2016), yonca materyaline *L. casei*, *L. plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* izolatları ile aşılama yaptıkları çalışmada, silaj pH seviyesini

sırasıyla 5.00, 5.01 ve 4.96 olarak belirlemişler ve kontrol silajlarında bu değer 5.08 olduğunu, bakteri aşılmasının kontrol parseline göre pH seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu bakımdan hem soldurmanın hem de bakteri aşılmasının bu sürece katkı sağlayabilecek iki uygulama olduğu görülmektedir.

Fermentasyonun 60. gününde açılan silajlarda (T_{60g}) pH değerinin özellikle soldurulmamış bakteri aşılması yapılan silajlarda daha yüksek pH değerleri elde edildiği görülmektedir. Özellikle KM içeriği düşük olan baklagil silajlarında, stabil bir fermentasyonun elde edilmesi ve fermentasyon profilinin istenilen kompozisyonda olması çok mümkün değildir. Ancak bakteri aşılması ile bu durumun kısmen düzeltilmesi ve daha düşük bir pH seviyesinin elde edilmesi beklenmektedir. Mevcut çalışmada ise, KM içeriği düşük silajlarda bakteri uygulaması ile pH yönünden herhangi bir avantaj sağlanamadığı gibi, aksine, kontrol gurubuna göre daha yüksek pH değerleri elde edilmiştir. Bu durumun, söz konusu silajlarda düşük KM içeriği nedeniyle özellikle mayaların çok iyi geliştiği ve LAB tarafından üretilen LA'nın bu mayalar tarafından fermente edilerek CO_2 ve etanole parçalandığı, bu nedenle ortam asitliğinin giderildiği söylenebilir. Ayrıca, KM içeriği düşük olan baklagil silajlarında clostridia grubu mikroorganizmaların, LA parçalayarak BA dönüştürdüğü ve H_2 ile birlikte CO_2 ürettiği, böylece pH seviyesinin yükselmesine neden olduğu bilinmektedir (Zheng ve ark., 2017).

Soldurularak KM içeriği artırılan yonca silajlarında pH değeri 5.00 iken, KM'si düşük silajlarda bu değer 5.36 olarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak bu iki değer arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (Çizelge 2). Bu durumda, soldurmanın silajların pH değerini olumlu yönde etkilediği, yonca silajı yapımında KM içeriğinin kaliteyi etkileyen önemli bir

unsur olduğu söylenebilir. Elde edilen veriler, kuru maddenin pH üzerine etkisini açıkça ortaya koymuştur. T_{60g} açım zamanında, LAB aşılması ile, aşılama yapılmayan kontrole göre daha düşük pH seviyelerine ulaşılmış, ancak aradaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ancak bu noktada, yonca silajında SÇK içeriğinin çok düşük olduğu, azotlu bileşik oranının yüksek olduğu ve bu nedenle Tk'nın yüksek olduğu ve silaj içerisinde her bir birim pH düşüşü için gerekli asit miktarının logaritmik olarak arttığı gerçekleri de dikkate alınmalıdır. Yani, SÇK oranı düşük ve HP oranı yüksek olan materyallerden yapılan silajlarda, birim miktarlardaki bir pH azalması, diğer silajlara göre daha fazla miktarda asit üretimi gerektirdiği için, daha fazla önem kazanmaktadır. Bu nedenlerle, T_{60g} açım zamanında bakteri uygulamalarının kontrole göre daha düşük pH seviyeleri üretmesi, istatistiksel olarak önemsiz olsa da, özellikle yonca silajının fermentasyonu sırasında üretilen asit miktarı bakımından bir anlam taşıdığı söylenebilir. Nitekim Liu ve ark., (2016) bakteri uygulaması ile pH değerinin kontrole göre bir miktar azaldığını, ancak aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını, bununla birlikte LA miktarının arttığını, buna karşılık AA, BA ve PA miktarlarında önemli azalmalar olduğunu, dolayısı ile fermentasyon profilinin iyileştiğini bildirmişlerdir. Tao ve ark., (2017), yonca silajına bakteri aşılması yapılmasının pH seviyesini önemli derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Silajların KM içerikleri

Farklı KM içeriğine sahip kontrol ve farklı bakterilerle aşılammış silajların silolama öncesi (T_0) ve silolamanın 60. gününde (T_{60g}) KM içerikleri ile kuru madde kaybı (KMK) değerlerine ait ortalamalar ve oluşan guruplar Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Silajların T_0 ve T_{60g} açım zamanlarındaki ortalama KM içeriği ile KMK
Table 3. Mean values of DM in T_0 and T_{60g} silages and dry matter recovery (DMR)

		Bakteri Aşılması (<i>Bacterial Inoculation</i>)	KM T_0	KM T_{60g}	KMK
KM Durumu (DM)	Soldurulmamış (<i>Unwilted</i>)	Kontrol	23.81	21.33	89.57
		<i>L. bifementans</i>	23.5	21.31	90.70
		<i>L. brevis</i>	24.45	22.05	90.16
		Ort	23.92B	21.57B	90.15B
	Soldurulmuş (<i>Wilted</i>)	Kontrol	32.71	29.87	91.32
		<i>L. bifementans</i>	33.06	31.24	94.44
		<i>L. brevis</i>	33.14	30.46	91.90
		Ort	32.97A	30.52A	92.56A
	Bakteri Ortalaması (<i>Mean of bacteria</i>)	Kontrol	28.26	25.60	90.45 b
		<i>L. bifementans</i>	28.28	26.28	92.58 a
<i>L. brevis</i>		28.80	26.26	91.04 ab	
Genel Ort.		28.44	26.04	91.35	
LSD Değerleri	LSD: KM: T0: KM:0.911- T60: KM:1.063- KMK: KM:1.447				

Çizelge 3'den, T₀ ve T_{60g} açım zamanlarında soldurmanın KM içeriğine önemli derecelerde etkide bulunduğu, soldurulmamış yonca materyalinin T₀ ve T_{60g} açım zamanlarındaki KM içeriğinin sırasıyla %23.92 ve %21.57 olduğu, soldurmanın yapılmasıyla bu değerlerin yine sırasıyla %32.97 ve %30.52 seviyelerine yükseldiği izlenmektedir. Yoncanın soldurma ile KM değerinin yükseltilmesi ve fermentasyon kalitesinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Nitekim, Pitt ve ark., (1985), KM seviyesinin %35-40 arasında olması durumunda LA bakterilerinin gelişim hızlarının arttığını ve silo içerisinde istenmeyen diğer mikroorganizmaları daha etkin şekilde baskı altına aldığını bildirmişlerdir. Kuru madde kayıplarının azaltılması, hem ekonomik hem de silo yemi kalitesi açısından arzu edilen bir durumdur. KM içeriği yüksek olan yonca silajında, KM içeriği düşük olana göre daha iyi bir KMK değeri elde edilmiştir. Bu durum, silo içerisinde istenilen türde fermentasyonun daha fazla miktarda geliştiğinin açık bir göstergesidir.

Bakteri aşılması KM kaybı üzerine önemli etkilerde bulunmuş, kontrol silolarında KM'nin %90.45'i korunurken, *L. bifermentans* aşılmasında %92.58'i ve *L. brevis* aşılmasında da %91.04'ü korunmuştur.

Jatkauskas ve Vrotniakiene (2016), yonca silajına farklı bakteri grupları ile yaptıkları aşılama ile KM kaybının önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kontrol gurubunda KMK değerinin %93.21 olduğunu, diğer bir ifade ile KM kaybının %6.79 olarak gerçekleştiğini, buna karşılık *L. lactis* ile yapılan aşılmalarda KM kaybının %96.21 seviyesine yükseldiğini, diğer bir ifade ile KM kaybının %3.79 seviyesine gerilediğini bildirmişlerdir. Jatkauskas ve Vrotniakiene (2016), tüm bakteri aşılması uygulamalarında KM kaybının azaldığını rapor etmişlerdir. Büyük zaman emek ve para harcanarak üretilmiş yonca yeminin siloya konulduktan sonra, silo içerisinde arzu edilmeyen fermentasyon sonucu kaybolan KM, rakamsal olarak küçük değerlerle ifade edilse de, ekonomik açıdan yüksek bir katma değere karşılık gelmektedir. Bu nedenle KMK son derece önemli bir parametredir.

Silajların ADF, NDF, SÇK ve HP içerikleri

Farklı KM içeriğine sahip kontrol ve farklı bakterilerle aşılansız silajların T₀ ve T_{60g} açım zamanlarındaki ADF, NDF, SÇK ve T_{60g} silajlarındaki HP içeriği değerlerine ait ortalamalar ve oluşan gruplar Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Silajların T₀ ve T_{60g} günlerdeki ADF, NDF, SÇK ve T_{60g} günde HP içeriği
Table 4. ADF, NDF and WSC values from T₀ ve T_{60g} silages and CP from T_{60g} silages

KM Durumu (DM)	Bakteri Aşılması (Bacterial Inoculation)	ADF (%)		NDF (%)		SÇK (%)		HP (%)
		T ₀	T _{60g}	T ₀	T _{60g}	T ₀	T _{60g}	T _{60g}
Soldurulmamış (Unwilted)	Kontrol	27.25	32.63	47.21	46.07	3.24	0.51	15.73 b
	<i>L. bifermentans</i>	25.81	31.86	44.96	44.19	3.25	0.39	16.80 b
	<i>L. brevis</i>	28.59	32.16	48.37	44.60	3.25	0.38	17.16 b
	Ort	27.22 A	32.22 A	46.85 A	44.96 A	3.25	0.43	16.54 B
Soldurulmuş (Wilted)	Kontrol	23.39	27.66	42.59	40.35	3.31	0.45	17.03 b
	<i>L. bifermentans</i>	24.01	29.70	45.01	40.19	3.30	0.52	23.83 a
	<i>L. brevis</i>	23.82	29.27	44.89	41.05	3.31	0.85	24.58 a
	Ort	23.74 B	28.88 B	44.17 B	40.53B	3.31	0.61	21.81 A
Bakteri Ortalaması (Mean of Bacteria)	Kontrol	25.32	30.15	44.91	43.21	3.28	0.48	16.39 b
	<i>L. bifermentans</i>	24.91	30.79	44.99	42.20	3.28	0.46	20.31 a
	<i>L. brevis</i>	26.21	30.72	46.63	42.83	3.28	0.62	20.87 a
Genel Ort.		25.48	30.55	45.51	42.74	3.28	0.52	19.17
LSD Değerleri		ADF: T ₀ : KM:1.427- T ₆₀ : KM:1.327 NDF: T ₀ : KM:1.657- T ₆₀ : KM:1.050 HP: KM:1.07 Bakteri:1.31 KMxBakteri:1.85						

Yonca bitkisini soldurarak KM içeriğini %30 seviyesinin üzerine çıkarmanın, hem T₀ hem de T_{60g} açım zamanında, hem ADF hem de NDF değerini önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. Silolamanın başlangıcında ADF ve NDF değerleri soldurulmamış bitkilerde sırasıyla %27.22 ve %46.85 iken, soldurma ile bu değerler yine sırasıyla %23.74 ve %44.17 seviyelerine gerilemiştir. Soldurma ile bu değerlerin bir miktar azalması, aslında yem kalitesini olumlu etkilediği de söylenebilir.

Benzer şekilde T_{60g} açım zamanında da ADF ve NDF

oranları soldurulmamış silajlarda sırasıyla %32.22 ve %44.96 iken. bu değerler soldurulmuş silajlarda yine sırasıyla %28.88 ve %40.53 seviyelerine gerilemiştir. Son yıllarda, yemin ADF içeriğinin bilinmesi hayvanlarda KM sindirimini bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Hayvanların yüksek ADF içeren yemlerle beslenmesi sonucu, yem tüketimine bağlı olarak arzu edilen hayvansal verim ve kalite elde edilemez (Yang ve Beauchemin, 2009). Bu çalışmada elde edilen ADF değerleri, optimum seviyelere yakın bulunmuştur. Bununla birlikte, bir yem örneğinde

NDF oranının %25-32 arasında olması, hayvanların yemden yararlanmasını en üst düzeyde tutacaktır. NDF oranının bu değer aralığından yüksek olması, rumendeki mikroflora kompozisyonunu selülotik mikroorganizmalar lehine çevirir (Khafipour ve ark., 2009). Çizelge 4'den de görüleceği üzere, bu çalışmadan elde edilen ortalama NDF değerleri, arzu edilen NDF içeriğinden yüksek bulunmuştur. Bu durum, hayvanların rumen faaliyetleri bakımından arzu edilen bir durum değildir.

Silaj yapımı sırasındaki SÇK değerleri incelendiğinde, soldurma ve bakteri aşılmasının SÇK oranı üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Benzer şekilde fermantasyonun 60. gününde, SÇK içeriklerinin hem soldurma hem de bakteri aşılması uygulamasından önemli derecede etkilenmediği belirlenmiştir. Elde edilen verilerden, başlangıç materyalinde tüm uygulamalarda SÇK miktarının oldukça düşük olduğu söylenebilir. Yonca bitkisi, bir baklagil olması nedeniyle zaten SÇK içeriği bakımından fakir bir bitkidir. Bununla birlikte, silolama sırasında silo içerisinde bulunan bütün mikroorganizmalar, şekerleri fermente ederek tüketirler. Zaten az miktarda olan SÇK, 60 günlük silolama sonunda neredeyse tükenen miktarlara kadar gerilemiştir (Çizelge 4). Bu, beklenen bir durumdur.

Silajların HP oranı bakımından, KM içeriği ile bakteri

aşılması arasındaki interaksiyon ilişkisi incelendiğinde, her iki bakteri kültürü uygulamasının da silajların HP içeriğini artırdığı, ancak bu etkinin KM içeriğine bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Nitekim, KM içeriği düşük olan silajlarda aşılama ile ortaya çıkan HP oranı artışı sınırlı miktarda kalır iken, KM içeriği yüksek silajlarda bakteri aşılması ile, kontrol gurubuna göre çok daha yüksek HP değerleri elde edilmiştir. Soldurulmamış silajlarda kontrol uygulamasında %15.73 HP değeri elde edilirken, *L. bifermentans* ve *L. brevis* uygulamalarında sırasıyla %16.80 ve %17.16 HP değerleri elde edilmiş ve bu değerler ile kontrol gurubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşın soldurulmuş silajlarda kontrol gurubunda %17.03 olan HP değeri, *L. bifermentans* ve *L. brevis* aşılama ile sırasıyla %23.83 ve %24.58 değerlerine yükselmiştir. Soldurulmuş silajlarda kontrol gurubu ile bakteri aşılama arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu durum bir interaksiyona neden olmuş olabilir.

Silajların organik asit içerikleri

Farklı KM içeriğine sahip kontrol ve farklı bakterilerle aşılanmış silajların fermantasyonu 60 gününde laktik LA, AA, PA ve BA değerlerine ait ortalamalar ve oluşan guruplar Çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 5. Farklı KM içeriğine sahip inokule edilmiş ve edilmemiş silajların T_{60g} açım zamanındaki LA, AA, PA ve BA değerleri. (%KM)

Table 5. LA, AA, PA and BA values of silages inoculated or wilted (DM%)

		Bakteri Aşılması (<i>Bacterial Inoculation</i>)	LA	AA	PA	BA
KM Durumu (DM)	Soldurulmamış (Unwilted)	Kontrol	0.04	5.60	4.13	2.38
		<i>L. bifermentans</i>	0.08	4.82	4.13	1.78
		<i>L. brevis</i>	0.16	5.27	3.42	1.77
		Ort	0.09 B	5.23 A	3.89 A	1.98
	Soldurulmuş (Wilted)	Kontrol	0.06	3.26	1.23	1.53
		<i>L. bifermentans</i>	0.35	3.51	2.05	1.45
		<i>L. brevis</i>	0.51	3.62	1.12	1.47
		Ort	0.31 A	3.46 B	1.47 B	1.48
	Bakteri Ortalaması (Mean of Bacteria)	Kontrol	0.05 b	4.43	2.68 ab	1.96
<i>L. bifermentans</i>		0.22 ab	4.16	3.09 a	1.62	
<i>L. brevis</i>		0.33 a	4.45	2.27 b	1.62	
Genel Ort.			0.2	4.34	2.68	1.73
LSD Değerleri		LA: KM: 0.15 Bakteri: 0.19 AA: KM:0.73 PA: KM: 0.34 Bakteri:0.41				

Çizelge 5'den, düşük KM içeriğine sahip silajların LA içeriğinin %0.09 (KM'nin yüzdesi) iken, KM içeriği yüksek silajlarda bu değer yaklaşık 3.5 kat artarak %0.31 seviyesine kadar yükseldiği izlenmektedir. KM içeriğinin silajların LA içeriği üzerine önemli etkilerinin olduğu ve KM içeriğinin artmasıyla birlikte silajların fermantasyon ürünü içerisindeki LA payının arttığı söylenebilir. Bu durum, öncelikle KM yüksek silajların SÇK içeriğinin KM düşük silajlara göre daha yüksek olmasından

kaynaklanmaktadır. Nitekim, bu çalışmada KM içeriği her ne kadar soldurma uygulamasından istatistiksel olarak önemli derecede etkilenmemişse de, KM yüksek silajlardaki SÇK içeriği yaklaşık %50 oranında yüksek bulunmuştur. Bu durum, silaj içerisinde LA üretme potansiyelini arttırmıştır. Organik asitler içerisinde pH düşürmede etkili asitlerin başında gelen LA üretiminin yüksek olması, silaj pH değerlerinde de kendini göstermiş ve soldurulmuş silajların pH seviyesi silolamanın

başlangıcından itibaren, soldurulmamış olanlara göre daha düşük bulunmuştur. Agarussi ve ark., (2019), soldurmanın yonca bitkisinde LA üretimini 19 kat artırdığını, buna rağmen bu değerlerin stabil bir silaj elde etmeye yetmediğini bildirmiştir. Bakteri aşılması da LA asit üretimini artıran bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Nitekim *L. bifementans* izolatı ile aşılama LA üretimi kontrol silajlarına göre yaklaşık 4.5 kat artarken. *L. brevis* izolatı ile aşılama kontrol silajlarına göre yaklaşık 6.5 kat daha fazla bir LA üretimi sağlanmıştır. Bu durum, bakteri aşılmasının fermentasyon profili üzerine etkisini açıkça göstermektedir. Bulgularımız, bakteri aşılmasının yonca silajında LA üretimini artırdığını bildiren Ertekin ve Kızılsimşek (2020)'in bulguları ile uyum göstermektedir. Benzer şekilde Jatkauskas ve Vrotniakiene (2016) yonca bitkisine 7 farklı inokulant uygulaması yaptığı çalışmada, bakteri uygulamalarının tamamında elde edilen LA miktarının kontrol silajlarına göre önemli derecede yüksek bulunduğunu bildirmiştir.

Silajlarda belirli sınırlar içerisinde bulunması arzu edilen ve özellikle aerobik stabiliteyi artıran, ancak fazla miktarlarda olduğunda yem kalitesini azaltan bir organik asit türü olan AA değerleri incelendiğinde, soldurulmamış silajlarda KM %5.23'ü oranında bir AA üretildiği, soldurma ile bu değerlerin KM %3.46'sı seviyelerine gerilediği görülmektedir. Bu durum silaj kalitesini olumlu etkilemektedir. Bununla birlikte, AA miktarının yine de bir miktar yüksek olduğu söylenebilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde edilen veriler bir bütün olarak incelendiğinde, yonca silajı yapımında hem soldurma uygulamasının hem de LAB aşılmasının, silajın değişik özellikleri üzerine çok önemli olumlu katkıların olduğu, bu nedenle yonca silajı yapımında KM içeriğinin yükseltilmesi yanında bakteri aşılmasının da muhakkak yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Özellikle silajın HP içeriği ve fermentasyon sırasında üretilen LA değerleri birlikte dikkate alındığında, yonca silajında soldurma ile birlikte *L. brevis* izolatı ile aşılamanın başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Daha net sonuçların elde edilmesi için, inokulasyonun farklı yoğunlukları ile, farklı KM içeriğine sahip materyallerde çalışmalar yürütülmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 1002 projeleri kapsamında (1170854) desteklenmiştir.

Çıkar çatışması beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkı Oranları

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağladıklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Agarussi MCN, Pereira OG, da Silva VP, Leonardo ES, Ribeiro KG, Santos AA 2019. Fermentative Profile and Lactic Acid Bacterial Dynamics in Non-Wilted And Wilted Alfalfa Silage in Tropical Conditions. *Molecular Biology Reports*, (46): 451-460.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington. DC.US.
- Canbolat Ö, Akbay KC, Kamalak A 2019. Yem Bezelyesi Silajlarında Karbonhidrat Kaynağı Olarak Melas Kullanılma Olanakları. *KSU Tarım Doğa Derg* 22(1) : 122-130.
- Cavallarin L, Antoniazzi S, Borreani G, Tabacco E 2005. Effects of Wilting and Mechanical Conditioning on Proteolysis in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Wilted Herbage and Silage. *J. Sci. Food Agric* (85): 831- 838.
- Dumlu Gül Z, Tan M, Fayetörbay Kaynar D, Kharazmi K 2015. Effects of Some Additives. Harvest stage and wilting on quality Characteristics of Alfalfa Silage. *Atatürk Üniv J of the Agricultural Faculty* 46 (2): 113-118.
- Deriaz RE (1961). Routine Analysis of Carbohydrates and Lignin in Herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (12): 152-160.
- Dordevic S, Mandic V, Stanojevic D 2016. The Effect Of Bacterial Inoculant on Chemical Composition And Fermentation of Alfalfa Silage. *Biotechnology in Animal Husbandry* 32(4): 431-423.
- Ertekin İ, Kızılsimşek M 2020. Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculation in Pre-Harvesting Period on Fermentation and Feed Quality of Alfalfa Silage. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 33 (2): 245-253.
- Jatkauskas J, Vrotniakiene V 2016. Using Special Inoculants Reduces Dry Matter Losses and Increases Fermentation Parameters of Lucerne Silage. *Animal Husbandry, Scientific Articles* (64): 3-11.
- Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO 2009. Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminant Acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* (75): 7115-7124.
- Kızılsimşek M, Schmidt RJ, Kung L Jr 2007. Effects of A Mixture of Lactic Acid Bacteria Applied as a Freeze-Dried or Fresh Culture on the Fermentation of Alfalfa Silage. *J Dairy Science* 90(12): 5698-5705.
- Koç F, Karapınar B, Okuyucu B, Korucu Erdem D 2020. Kefir İlavesinin Yonca Silajlarının Fermentasyon Özellikleri ve Aerobik Stabilitesi Üzerine Etkileri. *KSU Tarım ve Doğa Derg* 23(2):

- 535-542.
- Liu C, Lai Y, Lu X, Guo P, Luo H 2016. Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculants on Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Silage Quality: Assessment of Degradation (*in situ*) and Gas Production (*in vitro*). *Journal of Integrative Agriculture* 15(12): 2834-2841.
- Pitt RE, Muck RE, Leibensperger RY 1985. A Quantitative Model of The Ensilage Process in Lactate Silages. *Grass Forage Science* (40): 279-303
- Quiros ARB, Yusty MAL, Hernandez JL 2009. HPLC Analysis of Organic Acids Using A Novel Stationary Phase. *Talanta* (78): 643-646.
- Schmidt RJ, Hu W, Mills JA, Kung L Jr 2009. The Development of Lactic Acid Bacteria and *Lactobacillus buchneri* and Their Effects on The Fermentation of Alfalfa Silage. *J Dairy Sci* (92): 5005-5010.
- Tao L, Zhou H, Zang N, Si B, Tu Y, Ma T, Diao Q 2017. Effects of Different Source Additives and Wilt Conditions on The pH Value, Aerobic Stability and Carbohydrate and Protein Fractions of Alfalfa Silage. *Animal Science Journal* (88): 99-106.
- Tyrolova Y, Výborna A 2011. The Effects of Wilting and Biological and Chemical Additives on The Fermentation Process in Field Pea Silage. *Czech J Anim Sci* 56(10): 427-432.
- TUIK 2017. Türkiye İstatistik Kurumu verileri.
- Van Soest PJ, Robertson JD, Lewis BA 1991. Methods for Dietary Fibre, Neutral Detergent Fibre and Non-Starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* (74): 3583-3597.
- Virtanen AI, 1993. The A.I.V. Method of Preserving Fresh Fodder. *Empire Journal of Exp Agric* (1): 143-155.
- Yang WZ, Beauchemin KA 2009. Increasing Physically Effective Fiber Content of Dairy Cow Diets Through Forage Proportion Versus Forage Chop Length: Chewing and Ruminal pH. *Journal of Dairy Science* (92): 1603-1615.
- Zheng M, Niu D, Zuo S, Mao P, Meng L, Xu C 2017. The Effect of Cultivar, Wilting and Storage Period on Fermentation and the Clostridial Community of Alfalfa Silage. *Italian Journal of Animal Science* 17(2): 336-346.