



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**SODYUM BENZOATIN *LİSTERİA*
MONOCYTOGENES İLE KONTAMİNE
EDİLEN MISIR SİLAJI KALİTESİNE
ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERDEM TÜZEL

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 10102.02



BALIKESİR

2024

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM BENZOATIN *LİSTERİA MONOCYTOGENES* İLE
KONTAMİNE EDİLEN MISIR SİLAJI KALİTESİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERDEM TÜZEL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. RAHİM AYDIN

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 10102.02

BALIKESİR

2024



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans
Programı
çerçevesinde **Erdem TÜZEL** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“Sodyum Benzoatın *Listeria Monocytogenes* ile Kontamine Edilen Mısır Silajı
Kalitesine Etkileri”**

başlıklı tez çalışması,
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06 /06 / 2024

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Ergün DEMİR
Balıkesir Üniversitesi
(Başkan)

Prof.Dr. Rahim AYDIN
Balıkesir Üniversitesi
Üye (Danışman)

Doç.Dr. Osman Sabri KESBİÇ
Kastamonu Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 05/07/2024 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

05/07/2024

İmza

ERDEM TÜZEL

TEŐEKKÜR

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesi, araştırılması ve yürütülmesi sırasında olduğu kadar lisansüstü eğitimimde de desteklerini esirgemeyen, mesleki bilgi ve deneyimlerinin yanı sıra hayat tecrübeleri ile her daim yoluma ışık tutan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rahim AYDIN'a, her zaman bana desteklerini esirgemeyen meslektaşım babam Tahsin TÜZEL ve annem Semra TÜZEL'e, hayatın zorluklarını beraber karşıladığımız eşim Bilge Nur TÜZEL'e

Lisansüstü eğitimimde bana her daim bilimsel katkılarını sunan Sayın Prof. Dr. Ergün DEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Mukadderat GÖKMEN'e, Sayın Doç. Dr. Hasan ATALAY'a, tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, Sayın Doç. Dr. Osman Sabri KESBİÇ'e, Sayın Doç. Dr. Işıl KESBİÇ'e, Arř. Gör. Dr. Muhittin ZENGİN'e, doktora ėrencisi Ezgi TEGN'e, Veteriner Hekimi Buėra REN'e ve Veteriner Hekimi Hüseyin ÖZTÜRK'e teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| İÇİNDEKİLER | i |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| TABLolar DİZİNİ | vii |
| | |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Silolamanın Tarihi | 3 |
| 2.2. Silolama İşlemi ve Evreleri | 3 |
| 2.2.1.Aerobik Faz..... | 4 |
| 2.2.2. Anaerobik Faz..... | 4 |
| 2.2.3. Silajda Stabil Dönem..... | 5 |
| 2.2.4. Silonun Açılması (Yedirme Aşaması)..... | 6 |
| 2.3. Silaj Mikrobiyolojisi..... | 7 |
| 2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> | 9 |
| 2.5. Sodyum benzoat..... | 10 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 12 |
| 3.1. Gereç..... | 12 |
| 3.1.1. Bitki Materyali..... | 12 |
| 3.1.2. Bakteriyel İnokulant ve Silaj Katkı Materyali | 12 |
| 3.2. Yöntem..... | 12 |
| 3.2.1. Silajların Hazırlanması ve Deneme Planı..... | 12 |
| 3.2.2. Kimyasal Analizler..... | 14 |
| 3.2.2.1. Silajlarda pH'nın Belirlenmesi..... | 14 |
| 3.2.2.2. SÇK İçeriğinin Belirlenmesi..... | 14 |
| 3.2.2.3. Silajlardaki Laktik Asitin Belirlenmesi | 15 |
| 3.2.2.4. Silajların Organik Asitler ve Etanol İçeriğinin Belirlenmesi..... | 16 |
| 3.2.2.5. Amonyak Azotu Analizi..... | 16 |
| 3.2.2.6. Silaj Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2.7. Silajların Aerobik Stabilitesinin Belirlenmesi | 18 |
| 3.2.3. İstatistiksel Analizler..... | 19 |
| 4.BULGULAR..... | 20 |
| 4.1. Mısır Silajlarının Besin Madde İçerikleri..... | 20 |
| 4.2. Silajların Fermentasyon Özellikleri..... | 21 |
| 4.3. Silajların Aerobik Stabilite Özellikleri..... | 23 |
| 4.4. Silajların Mikrobiyolojik Özellikleri..... | 24 |
| 5. TARTIŞMA..... | 27 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 31 |
| KAYNAKLAR..... | 32 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 35 |



ÖZET

SODYUM BENZOATIN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İLE KONTAMİNE EDİLEN MISIR SİLAJI KALİTESİNE ETKİLERİ

Bu çalışma *Listeria monocytogenes* ile kontamine edilen mısır bitki materyaline ilave edilen sodyum benzoatın *Listeria monocytogenes* ve silaj kalitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Silaj materyalini oluşturan mısır bitkisi süt olum döneminde hasat edilerek 1,5-2,0 cm uzunluğunda kesildikten sonra 1,5 litrelik plastik bidonlara el ile sıkıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 60 gün süre ile bekletilmiştir. Çalışma kontrol (A grubu), *L. monocytogenes* pozitif grup (B grubu), *L. monocytogenes*+sodyum benzoat grubu (C grubu) ve sodyum benzoat grubu (D grubu) olmak üzere 4 gruptan oluşmuştur. *L. monocytogenes* B ve C gruplarına 10^5 kob/g düzeyinde, sodyum benzoat ise C ve D gruplarına % 0,1 oranında uygulanmıştır. Kontrol grubundaki silajlara *L. monocytogenes* ve sodyum benzoat uygulanmamıştır. Silolamanın 60. gününde açılarak alınan silaj örneklerinde kimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca; silajlar açıldıktan sonra 5 gün süreyle aerobik stabilite testine tabi tutulmuştur. Sodyum benzoatın *L. monocytogenes* ile kontamine silajlarda katkı maddesi olarak kullanımı sonucu (C grubu), silajların ham kül ve ham yağ oranları artarken, organik madde oranı ise azalmıştır. Sodyum benzoat, silajların suda çözünebilir karbonhidrat içeriğini arttırırken, bütirik asit, etanol ve amonyak azotu konsantrasyonunu azaltmıştır ($p<0,001$). Aerobik stabilite testi sonrası silajlardan elde edilen bulgularda kontrol grubuna kıyasla D grubunda pH ve CO₂ düzeyi ile maya ve küf sayısı önemli şekilde düşük bulunmuştur. Yapılan mikrobiyolojik analizlerde silajlarda *L. monocytogenes* koloni gelişimi gözlenmemiştir. Sonuç olarak; sodyum benzoatın *L. monocytogenes* gelişimini inhibe ettiği ve silajların kalitesini olumlu yönde etkileyebileceği gözlenmiştir.

AnahtarKelimeler: Aerobik stabilite, *L. monocytogenes*, silaj, sodyum benzoat.

ABSTRACT

EFFECTS OF SODIUM BENZOATE ON THE QUALITY OF CORN SILAGE CONTAMINATED WITH *LISTERIA MONOCYTOGENES*

This study was conducted to investigate the effect of sodium benzoate added to corn plant material contaminated with *Listeria monocytogenes* on *L. monocytogenes* and silage quality. The maize plant material was harvested at milking period, cut into 1.5-2.0 cm lengths, hand pressed into 1.5 liter plastic drums and kept at room temperature for 60 days. The study included 4 groups as control (Group A), *L. monocytogenes* positive group (Group B), *L. monocytogenes*+sodium benzoate group (Group C) and sodium benzoate group (Group D). *L. monocytogenes* was applied to groups B and C at a level of 10^5 cfu/g and sodium benzoate was applied to groups C and D at a rate of 0.1%. No additive was applied to the silages in the control group. The silages were opened on the 60th day of ensiling and chemical and microbiological analyzes were performed on the samples taken. In addition, the silages were subjected to aerobic stability test for 5 days after opening. As a result of the use of sodium benzoate as an additive in *L. monocytogenes* contaminated silages, the crude ash and crude fat ratios of the silages increased while the organic matter ratio decreased. Sodium benzoate increased the water soluble carbohydrate content of silages, while butyric acid, ethanol and ammonia nitrogen concentrations decreased ($p < 0,001$). In the findings obtained from the silages after aerobic stability test, pH and CO₂ levels and yeast and mold counts were significantly lower in group D compared to the control group. There was not any *L. monocytogenes* colony growth observed in the silages in microbiological analysis. In conclusion; sodium benzoate supplementation significantly improved the fermentation quality and aerobic stability of silages.

Keywords: Aerobic stability, *L. monocytogenes*, silage, sodium benzoate.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| SÇK | : Suda çözünebilir karbonhidrat |
| LAB | : Laktik asit bakterileri |
| LA | : Laktik asit |
| AA | : Asetik asit |
| PA | : Propiyonik asit |
| BA | : Bütirik asit |
| H ₂ SO ₄ | : Sülfirik asit |
| OA | : Organik asit |
| CO ₂ | : Karbondioksit |
| O ₂ | : Oksijen |
| NH ₃ | : Amonyak |
| NH ₃ -N | : Amonyak azotu |
| KM | : Kuru madde |
| HP | : Ham protein |
| HK | : Ham kül |
| HY | : Ham yağ |
| ADF | : Asit deterjan fiber |
| NDF | : Nötral deterjan fiber |
| ADL | : Asit deterjan lignini |
| HCl | : Hidroklorik asit |
| KOH | : Potasyum hidroksit |
| nm | : Nanometre |
| ml | : Mililitre |
| g | : Gram |
| µg | : Mikrogram |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Şekil 1. Laktik Asit Bakterilerinin Glukoz Fermentasyonu..... | 9 |
| Şekil 2. Sodyum Benzoatın Molekül Yapısı | 10 |
| Şekil 3. Silaj Materyalinin Hasat Edilmesi..... | 13 |
| Şekil 4. Silajların Hazırlanması..... | 13 |
| Şekil 5. Silaj Örneklerinin Mikrobiyolojik Ekim İçin Hazırlanması..... | 17 |
| Şekil 6. Silaj Örneklerinden <i>L. monocytogenes</i> Ekimi..... | 17 |
| Şekil 7. B ve C Gruplarındaki Silajlara Ait <i>L. monocytogenes</i> Ekim Sonuçları..... | 25 |
| Şekil 8. B Grubu Silajda Elektron Mikroskobu Altında <i>L. monocytogenes</i> Görünümü..... | 25 |
| Şekil 9. Elektron Mikroskobu Altında C Grubu Silajda <i>L. monocytogenes</i> ve Sodyum Benzoat Kristallerinin Görünümü..... | 26 |

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Kaliteli Bir Silajda İstenilen Organik Asit Oranları..... | 6 |
| Tablo 2. Silolama Öncesi Bitkilerde Bulunan Bakteri ve Mantar Popülasyonları..... | 8 |
| Tablo 3. Silajlara Ait Kuru Madde, Ham Kül, Ham Protein, Ham Yağ ve Organik Madde İçerikleri..... | 20 |
| Tablo 4. Silajlara Ait ADF, NDF, ADL, Selüloz, Hemiselüloz ve SÇK Değerleri... | 21 |
| Tablo 5. Silajlara Ait pH, Etanol ve Amonyak Azotu Değerleri..... | 22 |
| Tablo 6. Silajların Laktik Asit, Asetik Asit, Propiyonik Asit ve Bütirik Asit Değerleri..... | 23 |
| Tablo 7. Silajların pH, CO ₂ , Maya ve Küf Değerleri..... | 24 |
| Tablo 8. Silajlarda Bulunan LAB ve <i>L. monocytogenes</i> Populasyonları..... | 24 |

1. GİRİŞ

Silaj, genellikle %30-40 kuru madde içeriğine sahip bir mahsulün, yemin veya tarımsal yan ürünün fermentasyonu ile üretilen yem maddesidir. Silajın tarihi çok eski yıllara (M.Ö. 2000 yılı) dayanmasına rağmen modern çağda silaj yapımı, Fransa'daki bir çiftçi olan A. Goffart'ın 1877'de kendi silaj deneyimlerine dayanan bir kitap yayınlamasıyla birlikte başlamıştır. Dünya genelinde 1950'lerden bu yana, yapılan silaj miktarı istikrarlı bir şekilde artış göstermiştir (Bolsen ve ark., 1996).

Silaj üretmekteki temel amaç, taze kaba yemlerin bulunmadığı mevsimlerde kullanılmak üzere, yemleri muhafaza etmektir. Bu yöntemde laktik asit bakterileri (LAB) bitki materyalinde bulunansuda çözünebilir karbonhidratları (SÇK), anaerobik ortamda başta laktik asit (LA) olmak üzere organik asitlere fermente ederek silaj pH'sının istenilen değer aralığına düşmesini sağlar. Böylece silo ortamında istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin önüne geçilerek silaj kalitesinin artırılması amaçlanır (Tegün ve Aydın, 2023).

Silaj özellikle ruminant beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yem maddesidir. Bundan dolayı kaliteli bir silaj yapımı işletme ekonomisi açısından da önemlidir. Kaliteli bir silaj eldesinde birbiriyle ilişkili üç etken önem taşır. Bunlar silajlık yem materyali, silaj yapım aşamaları ve fermentasyon işlemidir (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002).

Silajı yapılacak bitkinin kuru madde (KM) içeriği, bünyesinde bulunun epifitik mikroorganizmalar, bu mikroorganizmaların tür ve sayıları, bitki materyalindeki SÇK oranı ve tampon kapasitesi gibi faktörler başta olmak üzere birçok faktör silajın kalitesinin belirlenmesinde rol oynar (Kung, 2001; Filya, 2001). Silo içerisinde LAB'nin baskın halde olması istenirken *Listeria*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* gibi bakteri grupları ile *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* türü mayalar ve *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* türü küf mantarlarının bulunmaması arzu edilmektedir (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002; Çayiroğlu ve ark., 2016). Silo ortamında kontrolsüz fermentasyon oluşması durumunda ise bu istenmeyen mikroorganizmaların sayısında artış gözlenmekte ve silaj kalitesi

olumsuz etkilenmektedir. Özellikle patojen özelliğe sahip *Listeria* türleri silaj kalitesini olumsuz yönde etkilerken hayvan ve insan sağlığını da tehdit etmektedir. Silaj içerisinde birçok *Listeria* türü tanımlanmasına rağmen bunlar arasında en yaygın tür *Listeria monocytogenes*'dir. Bu bakteri hayvanların beyin dokusunda iltihaplanma ve felçlere neden olurken, kontamine olan süt ve süt ürünlerini tüketen insanları da enfekte edebilme potansiyeline sahiptir (Driehuis ve Oude Elferink, 2000).

Sodyum benzoat, antimikrobiyal özellikleri sayesinde gıda sektöründe koruyucu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Küçükkaraca Yıldırım, 2014). Silaj yapımında ise pH düzeyini azaltarak silaj kalitesi üzerine olumlu etkiler gösterebileceği ifade edilmektedir (Büyükkılıç Beyzi ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasının amacı; *Listeria monocytogenes* ile kontamine edilen mısır bitki materyaline antimikrobiyal özelliğe sahip sodyum benzoatın ilave edilmesiyle *Listeria monocytogenes* bakterisinin inhibe edilip edilemeyeceği ve silaj kalitesi ile aerobik stabilitesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Silolamanın Tarihi

Silaj yapımının 3000 yıldan daha eskiye dayandığı tahmin edilmektedir. Eski Mısırlılar ve Yunanlılar'ın tahılları veya bütün yem bitkilerini silolarda depolayarak muhafaza ettikleri ifade edilmektedir (Avila ve Carvalho, 2020). Kartaca harabelerinde siloların bulunduğu ve M.Ö 1200 civarında yemlerin orada silolandığı ifade edilmiştir. Yaklaşık olarak M.S 100 ile 18. yüzyıl arasında silaj yapımı hakkında kısıtlı bilgi bulunmakla birlikte İtalya'da 13. yüzyılda ot silolandığı, Kuzey Alpler'de, İsveç'te ve Baltık bölgesinde 18. yüzyılın başlarında silolama işleminin uygulandığı ve zamanla birçok Avrupa ülkesine yayıldığı bildirilmektedir (Wilkinson ve ark., 2003).

Türkiye'de ise silaj ilk kez 1931 yılında Atatürk Orman Çiftliği'nde yapılmıştır. Ancak; o yıllarda silaj hakkında üreticilere yeterli bilgi aktarımının olmaması, işletmelerde bulunan hayvan sayısının az olması, üreticilerin yeni teknolojiye mesafeli olması gibi nedenlerden dolayı silajın hayvan beslemedeki kullanımı başlangıçta yaygın olmayıp zamanla hayvancılığın da hızla gelişmesine bağlı olarak ülke geneline yayılmıştır (Şahin ve Zaman, 2010).

2.2. Silolama İşlemi ve Evreleri

Silolama aşaması, yem materyalinin steril olmamasından dolayı kontaminasyona açık bir süreçtir. Bu nedenle; tüm sürecin kontrol altına alınması gerekmektedir. Silaj yapımında silo ortamının bir an önce anaerobik hale getirilmesiyle fermentasyonun olabildiğince çabuk gerçekleşerek istenilen pH düzeyinin oluşturulması önem arz etmektedir (Avila ve Carvalho, 2020).

Silolama işlemiyle birlikte bitki materyalinde bazı değişiklikler oluşmaya başlamaktadır. Bu değişikliklerin olduğu aşamalar sırasıyla; aerobik, anaerobik,

stabil ve silajın açılma döneminden oluşur (Bolsen ve ark., 1996).

2.2.1. Aerobik Faz

Aerobik faz, bitkinin siloya yerleştirildiği andan itibaren başlar. Bu aşamada sıkıştırma işlemi vasıtasıyla, oksijen (O₂) konsantrasyonunun mümkün olduğu kadar azaltılması amaçlanır. Ancak sıkıştırma işlemi ne kadar iyi olsa da silo içerisinde belirli miktarda O₂ kalmaktadır (Muck, 2010). Aerobik faz ortamdaki O₂ miktarına bağlı olarak birkaç saat ile 1 gün kadar sürebilir. Bu süreçte ortamdaki O₂ miktarı azalırken CO₂ miktarı artmaya başlar ve silo içerisinde anaerobik ortam oluşur. Silo içerisindeki O₂ hızla tükenirken aerobik mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu bitki materyalinde bulunan SÇK'lar parçalanarak CO₂, su ve ısı açığa çıkar (Driehuis ve Oude Elferink, 2000).

Bu aşamada sıkıştırma işlemi iyi yapılmışsa silo ortamında O₂ miktarı az olacağından dolayı aşırı ısı artışının önüne geçilmiş olur. Aynı zamanda aerobik fazın başarılı bir sıkıştırma işlemi yapılan ve iyi kapatılan silolarda, iyi kapatılamayan ve sıkıştırma işleminin başarısız olduğu silolara kıyasla daha kısa süreceği ifade edilmektedir. Aerobik fazın minimuma indirilmesiyle, silo içerisindeki bitki materyalinin SÇK içeriği olabildiğince korunarak anaerobik dönemdeki fermentasyon için laktik asit bakterilerine daha fazla besin maddesi sağlanır (Oude Elferink ve ark., 2001). Aerobik fazın uzaması bitki bünyesinde bulunan SÇK miktarını azaltacağından dolayı anaerobik fazda üretilecek laktik asit miktarının da azalmasına neden olur. Bu dönemin uzaması aynı zamanda silo içerisinde ısıyı arttıracığı için bitki materyalinde Maillard reaksiyonunun oluşmasına ve küf gelişimine yol açar. Maillard reaksiyonu selüloz ve proteinlerin sindirim oranlarında azalmaya sebep olur. Bu olumsuzlukları önlemek aerobik fazın olabildiğince kısa sürede tamamlanmasıyla mümkün olur (Muck, 2010).

2.2.2. Anaerobik Faz

Fermentasyon fazı olarak da adlandırılan bu faz silo ortamında O₂ kalmadıktan sonra başlar. Laktik asit bakterileri silo ortamında bulunması istenen bakterilerdir. Bu fazda, mayalar, *Enterobactericea* ve *Clostridia* türü bakteriler gibi silo içerisinde istenmeyen mikroorganizmalar siloda baskın hale geçebilmek için

LAB ile rekabet içerisinde (Pahlow ve ark., 2003). LAB, SÇK'ları kullanarak başlıca laktik asit olmak üzere yüksek miktarda organik asit üreterek ortam pH'sını düşürür ve silo içerisindeki zararlı mikroorganizmaların gelişimini önler (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Ortam pH'sı istenilen aralığa inmezse istenmeyen mikroorganizmalar silo içerisinde gelişmeye başlar. Özellikle silodaki en zararlı anaerob bakteri türü olan *Clostridia*'ların gelişmesi durumunda silo ortamında pH yükselir, bitki bünyesinde bulunan aminoasitler parçalanarak yemin kalitesi ve enerjisi düşer (Basmacıoğlu & Ergül, 2002). Bu mikroorganizmalar tarafından oluşturulan fermentasyona "ikincil" veya "clostridial" fermentasyon denir (Filya, 2001). Silo ortamında istenmeyen bir diğer grup *Enterobactericea* olarak adlandırılan bakteri grubudur. Bu bakterilerin SÇK'ları fermente etmesiyle asetik asit, CO₂ ve etanol açığa çıkar. Bu bakterilerce oluşturulan fermentasyon sonucu silajın KM'si azalır ve enerji kaybı oluşur. Her iki bakteri grubu da asidik koşullara duyarlı olduğundan dolayı pH seviyesinin 5'in altında tutulmasıyla gelişimleri önlenmektedir (Keleş ve Yazgan, 2005).

Silo ortamında oluşan amonyak (NH₃), etanol ve bütirik asit gibi ürünler silaj kalitesini olumsuz yönde etkiler. Dolayısıyla silajların bu ürünleri yüksek miktarda içermesi arzu edilmez (Kung ve ark., 2018).

2.2.3. Silajda Stabil Dönem

LAB'nin aktif olarak gelişimini takiben silodaki bitkisel materyal stabil döneme girer. Bu dönem silaj açılana kadar sürer. Silo ortamındaki pH istenilen düzeye indiğinde ve silo içerisine su veya O₂ girişi olmadığı durumda silaj materyali stabil halde kalmaya devam eder. Eğer silo içerisine hava girerse silaj materyalinde maya ve küf sayısı artar. Silajda KM kayıpları oluşur ve silaj ısınmaya başlar. KM değeri düşük olan ve silo ortamına fazla miktarda O₂ giren silajlarda *Listeria monocytogenes* gibi patojen bakteriler gelişebilmektedir. Bu patojenlerin hayvan sağlığına oldukça zararlı olduğu ifade edilmektedir (Bolsen ve ark., 1996).

Kaliteli bir silajda olması istenen organik asitler ve oranları Tablo 1'de gösterilmiştir (Mahanna, 1993).

Tablo1. Kaliteli bir silajda istenilen organik asit oranları (Mahanna, 1993).

| Organikasitler | Kurumadde(%) |
|-----------------------|---------------------|
| Laktikasit | 3-6 |
| Bütirik asit | <0.1 |
| Asetik asit | <2 |
| Propiyonik asit | 0-1 |

2.2.4. SilonunAçılması (Yedirme Aşaması)

Silajın hayvanları beslemek için açıldığı ve O₂ ile temasın olduğu dönemdir. Silodaki anaerob ortam bozulur. Bu aşamada, aktif formda veya gelişmesi yalnızca O₂ varlığına bağlı olan, spor formunda hayatta kalan mikroorganizmalar yeniden gelişir. Bu mikroorganizmalar arasında genellikle ilk gelişimi mayalar başlatır çünkü bu mikroorganizmalar fakültatif anaeroblardır ve birçoğu asitliğe toleranslıdır (Avila ve Carvalho, 2020). Bu faz boyunca, şekerler ile fermentasyon ürünleri olan laktik asit ve asetik asidin aerobik mikroorganizmalar tarafından tüketilmesi sonucu silajda KM ve besin madde kayıpları oluşabilmektedir. Silo içerisinde su ve CO₂ açığa çıkarken sıcaklık yükselebilir. Maya ve küfler silajlardaki aerobik bozulmadan sorumlu başlıca mikroorganizmalardır (Kung, 2010). Bu aşamada önemli bir nokta aerobik stabilitenin uzunluğudur.

Aerobik stabilite silajın havayla teması sonrası silo içi sıcaklığın düşük kaldığı ve silajın bozulmadan kaldığı sürenin uzunluğunu ifade eder. Bu sürenin uzun olması istenir. Çünkü bu silajın minimum miktarda maya ve küf içerdiğini göstermektedir (Wilkinson ve Davies, 2013). Silajın aerobik olarak bozulmasından sorumlu ana etkenlerin *Saccharomyces*, *Candida* ve *Pichia* gibi maya türleri olduğu ifade edilmektedir (Pahlow ve ark., 2003). Küfler genellikle mayalara göre asitlere daha az toleranslıdır, bu nedenle büyümeleri maya büyümesinden sonra gözlemlenir. Bu mikroorganizmalar sporlar halinde hayatta kalırlar ve çoğalmaları için gereken süre daha fazladır. Küf ve maya gibi aerobik solunum yapanlar başta olmak üzere mikroorganizmaların çoğalması silajfa kitlesel ısınmaya neden olur. Sıcaklık artışı aerobik bozulmanın bir göstergesidir (Avila ve Carvalho, 2020).

Birçok faktör, aerobik bozulmanın hızını etkiler. Bunlar arasında, maya popülasyonu veya diğer aerobik mikroorganizmalar, O₂ konsantrasyonu, silaj oluşumu sırasında üretilen metabolitler, pH, kalan karbonhidratlar, sıcaklık, nem koşulları ve tamponlama kapasitesi en önemli olanıdır (Pitt ve ark., 1991).

2.3. Silaj Mikrobiyolojisi

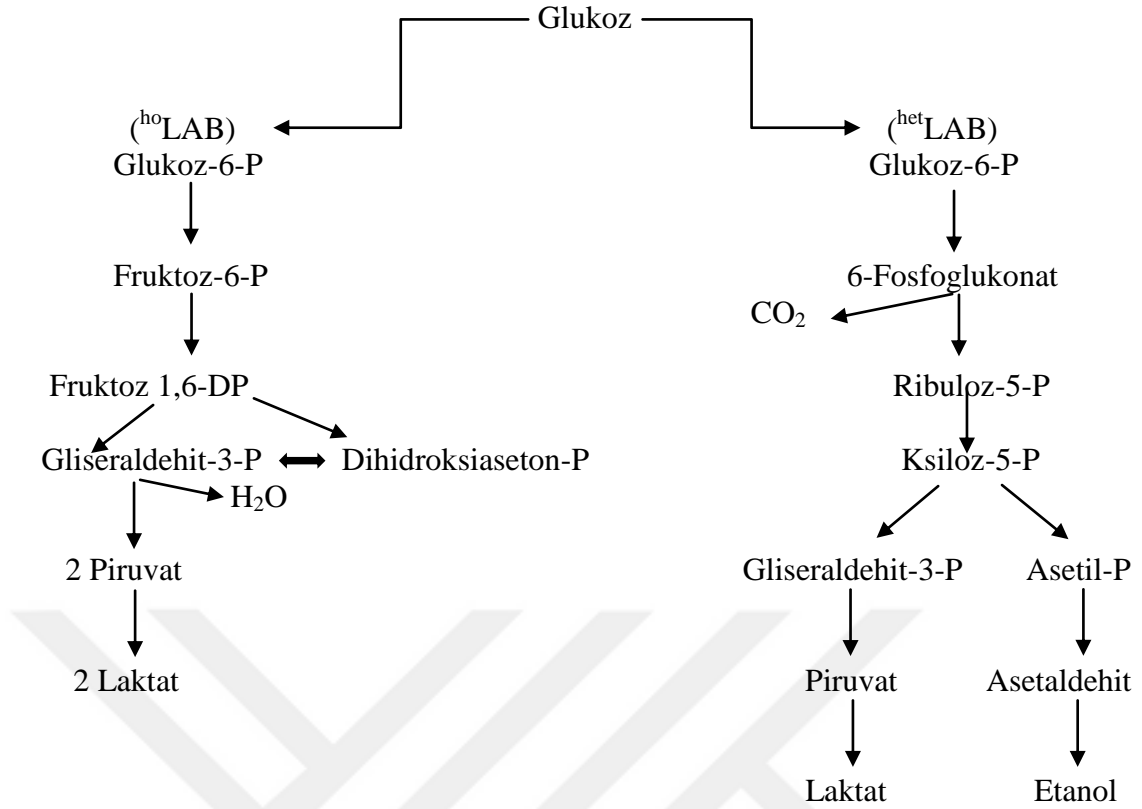
Silaj yapımında bitki materyali sterilize edilemez, dolayısıyla fermentasyonu başlatan mikrobiyota, yem bitkisinin doğal mikrobiyotasından ve dışarıdan eklenebilecek inokulantlardan oluşur. Mikrobiyata fermentasyon esnasında, yem bitkisinin özelliklerine ve kullanılan silolama tekniklerine göre, çevre koşullarının da etkisiyle değişime uğrar (Avila ve Carvalho, 2020). Silolama öncesi bitki materyalinde bulunan epifitik (doğal) mikroorganizmalar Tablo 2’de listelenmiştir. Bunlar arasından silolama esnasında tercih edilen bakteri grupları laktik asit ve propiyonik asit bakterileri iken istenmeyen türler ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteriler, asetik asit bakterileri, *Clostridium* ve *Bacillus* türleri gibi spor oluşturan bakteriler ve *Listeria* yer almaktadır (Pahlow ve ark., 2003). Bunlar dışında çeşitli küf ve maya türleri de silo ortamında istenmeyen mikroorganizmalardır (McDonald ve ark., 1991).

Tablo 2. Silolama öncesi bitkilerde bulunan bakteri ve mantar popülasyonları (Pahlow ve ark., 2003).

| Mikroorganizmalar | Popülasyon (kob/gr) |
|----------------------------------|----------------------------|
| Total aerob bakteriler | >10,000,000 |
| Laktik asit bakterileri | 10-1,000,000 |
| Asetik asit bakterileri | 100-1,000 |
| Propiyonik asit bakterileri | 100-1,000 |
| <i>Enterobacteria</i> | 1000-1,000,000 |
| Bacilli (endosporları) | 100-1,000 |
| <i>Clostridia</i> (endosporları) | 100-1,000 |
| Küfler | 1000-10,000 |
| Maya vb.mantalar | 1000-100,000 |

LAB, yem bitkilerinin epifitik mikrobiyotasının bir parçasıdır ve silolama süreci boyunca baskın olması istenir. Bu gruptaki bakterilerin tümü, SÇK'ları fermente etmeleri sonucu laktik asit üretir. Silajda en sık bulunan LAB cinsleri *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* türlerine ait olup, silolama işlemi sırasında farklı türleri bulunabilmektedir (Avila ve Carvalho, 2020). LAB'nin en önemli özelliği, asit ortamlara karşı direnç göstermesidir. Bu sayede silajın pH seviyesini 4 veya daha aşağı değerlere indirebilirler.

LAB bitki şekerlerinin fermentasyonundan tek veya ana ürün olarak LA üretir (Holzapfel ve Wood 2014). Tek ürün olarak LA üreten LAB homofermentatifler olarak adlandırılırken, laktik asidin yanında CO₂, etanol veya asetik asit üretenler heterofermentatif LAB olarak adlandırılır. Homofermentatif LAB, şekerleri glikoliz yoluyla piruvata katabolize eder ve oradan homofermentatif metabolizmada laktik asite indirgenir. Heterofermentatif yolda ise şeker dönüşümü fosfoketolaz yoluyla gerçekleşir ve laktik asit, etanol veya asetik asit üretilir (Driehuis ve Oude Elferink, 2000; Muck ve ark., 2020). LAB'nin glukozu fermente etme yolları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin glukoz fermentasyonu (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

2.4. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, Gram pozitif, sporsuz, çomak şeklinde bir bakteri olup bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlarda ve insanlarda menenjit, ensefalit, sepsisemi, gastroenterit, mastitis ve geç dönem abortlar dahil olmak üzere yüksek ölüm oranına ve çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Wesley, 2007).

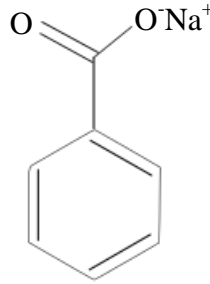
L. monocytogenes'in optimal gelişim sıcaklığı genel olarak 35-37⁰ C aralığındadır. Ancak 1-45⁰ C gibi geniş sıcaklık değerlerinde de gelişim gösterebilirler. Ayrıca, 4.1-9.6 gibi geniş bir pH aralığında çoğalabilen bu bakterinin optimal gelişim gösterdiği pH aralığı ise 6.0-8.0 değerleri arasındadır (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010). *L. monocytogenes*, ortamda üreyemese dahi uzun süre canlılığını koruyabilir. Sığır, koyun ve keçilerde salgınlar ve sporadik listeriosis vakaları, *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş silajla beslenme ile ilişkilendirilmiştir. *L. monocytogenes*'in dışkıyla saçılımından sadece klinik semptom

gösteren hayvanlar sorumlu değildir. Aynı zamanda klinik semptom gözlenmeyen hayvanlar da çevreyi kontamine edebilir (Driehuis, 2013).

Çiğ sütün *L. monocytogenes* tarafından kontaminasyonu, silajda yüksek seviyelerde *L. monocytogenes* oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Farklı çalışmalar, silajlarda ve silajla beslenen ineklerin dışkılarında *L. monocytogenes* suşlarının yüksek çeşitlilikte olduğunu göstermiştir. *L. monocytogenes*'in çiğ süte geçişi, genellikle dışkı ve dışkı ile kontamine olan altlıklar yoluyla gerçekleşir (Tasci ve ark., 2010). Süt ve peynirin tüketilmesi sonucu insanları da enfekte eden bu bakterinin özellikle pastörizasyon işlemi gerçekleştirilmemiş ürünlerde tespit edildiği ifade edilmektedir (Driehuis ve Oude Elferink, 2000).

2.5. Sodyum Benzoat

Molekül yapısı Şekil 2’de gösterilen sodyum benzoat ($C_7H_5NaO_2$) organik asit tuzu olup etkili bir antimikrobiyal özellik gösterir. Enterobakteri ve mayaların büyümesinin engellenmesinde etkili olabileceği ve silajların yemleme dönemini uzatabileceği bildirilmiştir (Koç ve ark., 2020).



Şekil 2. Sodyum benzoatın molekül yapısı (Piper ve Piper, 2017).

Sodyum benzoat, gıda endüstrisinde bakteri, mantar ve mayaya karşı önemli bir koruyucu olarak kullanılan, doğal pH'sı 4.5 olan bir benzoik asit tuzudur. Ayrıca; bu madde ilaç ve kozmetik sanayisinde de güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıda ürünlerinde kullanılmasına izin verilen ilk koruyucu olduğu ifade edilen sodyum benzoatın, antimikrobiyal aktivitesinin pH ile ilişkili olduğu ve düşük pH'da antimikrobiyal etkisinin daha güçlü olabileceği bildirilmiştir (Shahmohammadi ve ark., 2016).

Türkiye’de gıdaların muhafaza edilmesinde Türk gıda kodeksine göre maksimum % 0,1 düzeyinde sodyum benzoat kullanımına izin verilmektedir.

Sodyum benzoatın pH derecesini önemli derecede azaltmak suretiyle silaj kalitesini olumlu yönde etkileyebileceği bildirilmektedir (Büyükkılıç Beyzi ve ark., 2016). Sodyum nitrit, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın 5 ml/kg oranında kullanıldığı bir çalışmada istenmeyen mikroorganizmaları azalttığı ve silaj kalitesini iyileştirdiği ifade edilmiştir. Aynı çalışmada kullanılan bu karışımın maya ve küf gelişimini engellediği ve aerobik stabilitenin de artışına sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Knicky ve Spörndly, 2015). Bir başka çalışmada sodyum benzoatın % 0,2 oranında kullanıldığı sorgum silajlarında maya ve küf oranı ile etanol düzeyinin önemli derecede azaldığı, sütçü ineklerin performansını etkilemeksizin silo ve rumen fermentasyon profilini önemli bir şekilde değiştirdiği bildirilmiştir (Santos ve ark., 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bitki Materyali

Silaj bitkisi olarak Balıkesir şehrinde yetiştirilen mısır (*Zea mays* L.) kullanılmıştır. Kullanılan mısır bitkisi, süt olum döneminde hasat edilerek (Şekil 3), 1.5-2 cm uzunluğunda parçalanmıştır. Bitki materyaline antimikrobiyal özelliğe sahip sodyum benzoat ilavesiyle hazırlanan silajlar, BAÜN Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.B.D.'nda oda sıcaklığında 60 gün süreyle bekletilmiştir.

3.1.2. Bakteriye İnokulant ve Silaj Katkı Materyali

Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni laboratuvarında eppendorf tüp içerisinde -20°C'de muhafaza edilen *Listeria monocytogenes*, B ve C grubu silajlara 10⁵ kob/gr düzeyinde inokule edilmiştir. Silaj katkı maddesi olarak ise sodyum benzoat steril distile suda çözündürülerek 1 g/kg oranında püskürtme şeklinde uygulanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Silajların Hazırlanması ve Deneme Planı

Çalışma; kontrol (A grubu), *L. monocytogenes* pozitif grup (B grubu), *L.monocytogenes*+sodyum benzoat grubu (C grubu) ve sodyum benzoat grubu (D grubu) olmak üzere her deneysel grupta 4 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Biçilen mısır bitki materyalinin başlangıçta %27 olan KM'si bitki soldurularak %30'a çıkarılıp 1,5 L hacimli deneysel silolara basılmıştır (Şekil 4).



Şekil 3. Silaj materyalinin hasat edilmesi

Bu çalışmada kullanılan mısır bitkisi süt olum döneminde hasat edilerek 1,5-2,0 cm uzunluğunda kesildikten sonra B grubu *L.monocytogenes* ile püskürtme yöntemi kullanılarak kontamine edilmiştir. C grubuna *L.monocytogenes*+sodyum benzoat, D grubuna ise sadece sodyum benzoat ilave edilmiştir. Hazırlanan silaj materyalleri 1-1,5 kg kapasiteli bidonlara doldurularak 60 gün süreyle laboratuvar ortamında oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 4. Silajların hazırlanması

3.2.2. Kimyasal Analizler

Denemede kullanılan mısır bitkisi 60 günlük silolama sonrası açılmıştır. Silajlara ait kimyasal analizler (pH ölçümü, SÇK, laktik asit, organik asitler, etanol ve amonyak azotu) ve aerobik stabilite testi Uludağ Üniversitesi'nde yapılmıştır.

Açılan silajlardan alınan örnekler (her gruptan 2 adet ve her kavanozdan 3 tekrar olacak şekilde toplam 6 analiz yapılmıştır), 60 ° C sıcaklıkta 2 gün süreyle kurutulduktan sonra 1 mm elek çapında öğütülmüştür. Örneklerdeki kuru madde (KM), ham protein (HP) ve ham kül (HK), içerikleri analiz edilmiştir (AOAC, 1990). Silajlara ait ADF ile NDF miktarları Fiber Analyzer cihazıyla (ANKOM 200, USA) belirlenmiştir (Van Soest ve ark.,1991).

3.2.2.1. Silajlarda pH'nın Belirlenmesi

Silajlardan alınan örnekler (40 gram) stomacher torbasına konulduktan sonra distile su (360 mililitre) eklenmiştir. Hazırlanan örnek 3 dakika boyunca stomacher cihazında çalkalandıktan sonra pH metre cihazında (Sartorius, Basic PB-20, Goettingen, Germany) ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. SÇK İçeriğinin Belirlenmesi

Silajlarda SÇK içerikleri, Dubois ve ark. (1956) tarafından belirtilen fenol-sülfirik asit yöntemiyle belirlenmiştir. Numuneler distile suyla (1:9 oranında) seyreltilerek hazırlanan seyrelitden otomatik pipet ile 1'er ml alınarak tüplere aktarılmıştır. Her örneğin üzerine 0.15 ml %80'lik fenol (C₆H₅OH), 1 ml su ve 5 ml H₂SO₄ (%98) ilave edildikten sonra vorteks kullanılarak (30 sn) homojen hale getirilmiştir. Tüpler, 15 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV Mini 1240) ile (490 nm) okunmuştur.

Standart eğri, Excel programı ile oluşturulmuş ve bu eğri kullanılarak silaj örneklerinin SÇK değerleri belirlenmiştir. Elde edilen değerlerin seyreltim katsayısı (10) ile çarpılmasıyla örneklerin SÇK içeriği bulunmuştur. SÇK değerlerinin, örneklerin KM miktarına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla, silaj numunelerine ait KM

bazında SÇK içerikleri (%) hesaplanmıştır.

3.2.2.3. Silajlardaki Laktik Asitin Belirlenmesi

Numunelerin laktik asit içerikleri spektrofotometrik analiz yöntemine göre hesaplanmıştır (Barker ve Summerson, 1941). Örnekler 1:100 oranında distile suyla seyreltilmiştir. Daha sonra otomatik pipet yardımı ile hazırlanmış seyreltiden 1 ml örnek tüplere aktarıldıktan sonra 0,1 ml bakırsülfat (5 gram $\text{CuSO}_4/100$ ml distile su) ile 6 ml H_2SO_4 (%98) asit eklenmiştir. Vorteks ile homojen (30 sn) hale getirilen tüpler, 5 dakika süreyle soğumaya bırakılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra her tüp içerisine 0,1 ml parahidroksibifenil (% 0,5 NaOH/100ml saf su + 2.5g %97'lik $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) ilave edilerek 30 saniye boyunca yeniden vorteksle homojen hale getirilmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler 90 saniye kaynar su içerisine daldırılıp çıkarılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra örnekler spektrofotometre cihazı ile 565 nm dalga boyunda okunmuştur.

Standart eğrinin oluşturulması: 213 mg lityum laktat 500 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra üzerine 0.5ml %98'lik sülfürikasit (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eklenmiştir. Elde edilen çözelti, öncelikle 1:9 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) daha sonra 1:1 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, stok çözelti) oranında distile su ile seyreltilerek, stok çözüldükten 2.5, 5.0, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lityum laktat içerecek şekilde yeni karışımlar elde edilmiştir. Tüplerin içerisine hazırlanan çözüldükten 1 ml aktararak üzerine 0,1 ml bakır sülfat ve 6 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiş, 30 sn vorteks ile homojen hale getirilerek 5 dakika soğuk suda bekletilmiştir. Bu işlemler bittikten sonra tüplere 0,1 ml parahidroksibifenil eklenip, vorteksle homojen hale getirildikten sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında kaynamış su içerisine daldırılan tüpler (90 saniye) soğuduktan sonra değerler spektrofotometre cihazında (565 nm) okunarak standart eğrileri bilgisayarda oluşturulmuştur.

Spektrofotometre cihazından alınan veriler, seyreltme katsayısı olan 10 ile çarpıldıktan sonra silaj numunesinin kuru madde miktarına oranlanıp (% KM) laktik asit içeriği, % olarak belirlenmiştir.

3.2.2.4. Silajların Organik Asitler ve Etanol İçeriğinin Belirlenmesi

Hazırlanan numunelerin etanol ve OA içerikleri, GC cihazıyla analiz edilmiştir. Analizi yapılacak örnekler gaz kromatografi cihazında ölçümleri yapılmadan önce, 1ml'lik viole konulan UYA standardı (Spelco™WSFA–2MixSigma-AldrichCo) ve etanol çözeltisi (%96'lık) otomatik örnekleyici bölümüne yerleştirildikten sonra okunmuş ve bilgisayarda çeşitli pikler elde edilmiştir. Hazırlanan sıvı örneklerin organik asit bileşimleri (asetik, propiyonik,bütrik) ve etanol konsantrasyonları standart kromatogramdan alınan piklere göre belirlenmiştir.

3.2.2.5. Amonyak Azotu Analizi

Silaj örneklerine ait amonyak azot (NH₃-N) içeriği Kjeldahl distilasyon cihazıyla (Gerhadth, Bonn, Germany) yapılmıştır. Analiz amacıyla numuneler (40 gram) distile suyla (360 ml) stomacher cihazında 3dk bekletildikten sonra süzölmüştür. Sonrasında süzöntüden örnek (100 mililitre) alınıp distilasyon bölümüne yerleştirilmiştir. Daha sonra 12 dk boyunca distile edilek HCl çözeltisiyle (0.1 N %37) titrasyonu yapılmıştır. Silaj örneklerine ait NH₃-N içerikleri daha evvel bildirilen formüle göre belirlenmiştir (Aydın, 2019).

3.2.2.6. Silaj Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi

Numunelerin mikrobiyolojik analizleri Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Silaj örneklerinin içerdiği laktik asit bakterileri ve *L. monocytogenes* aşağıdaki mikrobiyolojik analiz metodlarına göre tespit edilmiştir.



Şekil 5. Silaj örneklerinin mikrobiyolojik ekim için hazırlanması

L. monocytogenes analizi için her bir silajdan 25 g örnek tartılıp stomacher poşetine alınarak üzerine 225 ml Half Fraser broth eklenmiştir. Hazırlanan karışım stomacher cihazında homojen hale getirildikten sonra (Şekil 5) 10^{-1} 'lik dilüsyondan 0.5 ml alınarak Palcam Listeria Selective Agar içeren petrilere yayma plak yöntemi kullanılarak ekimler yapılmıştır (Şekil 6). Petriler, inkübe edilerek (37°C , 24-48 saat) *L. monocytogenes* koloni varlığı aranmıştır.



Şekil 6. Silaj örneklerinden *L. monocytogenes* ekimi

Lactobacillus spp. analizi için uygun dilüsyondan 1 ml alınarak MRS agar içeren plaklara dökme yöntemi uygulanarak ekim yapılmıştır. Örnekler 30°C 'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra gelişen kolonilerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

Lactococcus spp. analizi için uygun dilüsyondan 1 ml alınarak M17 agar içeren plaklara dökme yöntemi uygulanarak ekim yapılmıştır. Örnekler 30°C 'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra gelişen kolonilerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

Enterococcus spp. analizi için uygun dilusyondan 0.1 ml alınarak Kanamycin Esculin Azide (KEA) agar içeren plaklara yayma yöntemi uygulanarak ekim yapılmıştır. Örnekler 37°C’de 48 saat inkubasyona bırakıldıktan sonra gelişen kolonilerin sayımı yapılmıştır.

3.2.2.7. Silajların Aerobik Stabilitesinin Belirlenmesi

Silajlar iki ayın sonunda açılarak aerobik stabilite testine tabi tutulmuştur. Bu test, daha önce belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (Ashbell ve ark., 1991). Testin 5. gününde numunelere ait pH ve CO₂ değerleri belirlenmiştir. Ek olarak silajların görsel küflenmeleri gözlenerek maya ve küf sayıları belirlenmiştir (Filya ve ark., 2000).

Aerobik stabilite testi yapılması için, gaz sızdırmayan ve aşınmaya karşı dirençli olan 1,5L’lik polietilen şişeler ilk olarak 0,5 ve 1 litre olacak şekilde iki parçaya ayrılmıştır. Şişelerin kapaklarına hava sirkülasyonu sağlamak amacıyla küçük delikler açılarak üzeri telle kapatılmıştır. Sonrasında 0,5 litrelik üst kısma yaklaşık olarak 250-300 g silaj örneği eklenmiş, 1 litrelik alt kısma ise 100 ml KOH (%25) eklenmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonra 120 saat boyunca 25°C’de odadaki havada bulunan oksijene maruz kalması sağlanmıştır. Beş günlük süre boyunca silajda meydana gelen CO₂ gazının çökmesiyle alt zeminde kalması sağlanmıştır. Test sonucunda alt kısımdaki KOH çözeltisinden 10 ml alınarak 1 N % 37’lik HCl ile titrasyon işlemi yapılmıştır. Titrasyon sırasında çözeltinin pH’sı, pH metre ile devamlı ölçülerek, pH’nın 8,1’den 3,6’ya düşmesi için harcanan HCl asit miktarı hesaplanmıştır. Beş gün boyunca havadaki oksijene maruz bırakılan silajlarda üretilen CO₂ miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$CO_2 \text{ (g/kgKM)} = 0.044 \times T \times V / (A \times TM \times KM)$$

T: Titrasyondaharcanan 1NHClmiktarı(ml)

V: %25 KOH çözeltisinin toplam hacmi (ml)

A:Şişenin alt kısmına ilave edilen KOH miktarı (ml)

TM: Kullanılan taze silaj örneğinin ağırlığı (kg)

KM: Taze silajmateryalininkurumaddemiktarı(g/kg)

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmadaki verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 istatistik programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanıp Tukey çoklu karşılaştırma testine ($p < 0,05$) tabi tutulmuştur. Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma olarak sunulmuştur.



4. BULGULAR

4.1. Mısır Silajlarının Besin Madde İçerikleri

Mısır silajının KM, HK, HP, HY ve OM içerikleri (%) Tablo 3'te verilmiştir. Tablo 3 incelendiğinde KM (%) içeriklerinin gruplar arasında benzer olduğu gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Bu çalışmada B ve D gruplarının HK içeriği (%) kontrol grubuna (A grubu) kıyasla önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Ancak kontrol grubu ile C grubu silajlarının HK içerikleri benzer bulunmuştur. Silajların HP (%) değerleri incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla B ve C grubu silajların benzer olduğu görülmüştür. D grubundaki silajların HP içerikleri kontrol grubu ile benzer olmasına rağmen B ve C gruplarındaki silajlara göre önemli düzeyde azalma görülmüştür ($p<0,001$). Silajların HY (%) içeriği ise kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). OM (%) içerikleri incelendiğinde B grubunun kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür. Ancak C ve D grubu silajlarının OM içeriği kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 3. Silajlara ait kuru madde, ham kül, ham protein, ham yağ ve organik madde içerikleri (%).

| Gruplar | KM | HK | HP | HY | OM |
|----------|------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| A | 28,63±0,44 | 3,25±0,03 ^b | 8,17±0,04 ^{ab} | 3,73±0,02 ^b | 96,75±0,03 ^a |
| B | 29,06±0,24 | 3,35±0,01 ^a | 8,25±0,14 ^a | 3,84±0,05 ^a | 96,74±0,01 ^a |
| C | 28,73±0,53 | 3,26±0,04 ^b | 8,27±0,03 ^a | 3,81±0,0 ^a | 96,65±0,04 ^b |
| D | 28,89±0,14 | 3,37±0,01 ^a | 8,05±0,05 ^b | 3,80±0,02 ^a | 96,62±0,01 ^b |
| P değeri | 0,24 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

*A:Kontrol: (*L. monocytogenes* sodyum benzoat yok); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat; KM: Kuru madde; HK: Ham kül; HP: Ham protein; HY: Ham yağ; OM: Organik madde

^{a,b,c}Aynı sütundaki farklı harflere sahip olan değerler birbirlerinden farklıdır.

Mısır silajlarına ait SÇK, NDF, ADF, ADL, selüloz ve hemiselüloz içerikleri Tablo 4'de verilmiştir. Tablo 4 incelendiğinde NDF (%) içeriklerinin B ve C gruplarında kontrol grubuna benzer, D grubunda ise kontrol grubundan yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Silajların ADF (%) içerikleri incelendiğinde

kontrol grubuna kıyasla B ve D gruplarında ADF'nin önemli düzeyde yüksek olduğu ($p<0,001$), B grubunun C ve D grubuyla benzer olduğu saptanmıştır. Silajların ADL (%) içerikleri incelendiğinde B grubunun ADL içeriği kontrol grubuna göre yüksek olduğu, C ve D gruplarının hem kontrol grubuna hem de B grubuna benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Silajların selüloz(%) içerikleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla B ve D gruplarının daha yüksek olduğu, C grubunun B grubu ve kontrol grubuna benzer olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Silajların hemiselüloz(%) içerikleri incelendiğinde kontrol grubuna göre B grubunun daha düşük, D grubunun ise daha yüksek hemiselüloz içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve C grubunun hemiselüloz içerikleri arasında önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Silajların SÇK(%) içerikleri incelendiğinde diğer gruplara kıyasla en yüksek SÇK içeriğinin D grubunda olduğu ($p<0,001$), B grubunun kontrol ve C grubuna kıyasla önemli düzeyde daha yüksek SÇK içerdiği, kontrol ve C grubunun SÇK içeriğinin ise benzer olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. Silajlara ait ADF, NDF, ADL, selüloz, hemiselüloz ve SÇK değerleri

| Gruplar | NDF(%) | ADF(%) | ADL(%) | Selüloz(%) | Hemiselüloz(%) | SÇK (%) |
|----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| A | 51,22±0,32 ^b | 34,6±0,71 ^c | 5,25±0,03 ^b | 29,35±0,72 ^c | 16,62±0,81 ^{ab} | 3,49±0,08 ^c |
| B | 51,39±0,11 ^b | 36,11±0,27 ^{ab} | 5,31±0,03 ^a | 30,8±0,25 ^{ab} | 15,28±0,32 ^c | 3,79±0,05 ^b |
| C | 51,29±0,21 ^b | 35,19±0,59 ^{bc} | 5,28±0,06 ^{ab} | 29,91±0,65 ^{bc} | 16,1±0,51 ^{bc} | 3,39±0,22 ^c |
| D | 53,88±0,38 ^a | 36,48±0,72 ^a | 5,31±0,03 ^{ab} | 31,17±0,73 ^a | 17,4±0,5 ^a | 4,27±0,15 ^a |
| P değeri | <0,001 | <0,001 | 0,032 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

*A: Kontrol: (*L. monocytogenes* ve sodyum benzoat yok); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harflere sahip olan değerler birbirlerinden farklıdır.

4.2. Silajların Fermentasyon Özellikleri

Mısır silajının pH, etanol ve amonyak azotu değerleri Tablo 5'te verilmiştir. Tablo 5'te de görüldüğü üzere silajların pH değerleri 3,88 ile 3,93 arasında değişmekte olupen yüksek pH değeri *L. monocytogenes* ile kontamine edilen B grubunda belirlenmiştir. Kontrol grubuyla C ve D grupları arasında pH bakımından farklılık olmadığı, B ve D gruplarının pH değerlerinin ise birbirine benzer olduğu

görülmüştür. Silajların etanol (g/kg KM) değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla B ve D gruplarının daha düşük etanol içeriğine sahip olduğu ($p<0,001$), C grubuyla kontrol grubu arasında ise önemli bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p>0,001$). Silajlardaki amonyak azotu (%) kontrol grubunda en yüksek, sodyum benzoatla muamele edilen D grubunda ise en düşük oranda belirlenmiştir ($p<0,001$).

Tablo 5.Silajlara ait pH, etanol ve amonyak azotu değerleri

| Gruplar | pH | Etanol (g/kg KM) | NH ₃ -N(%) |
|-----------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| A | 3,89±0,02 ^b | 0,91±0,22 ^a | 4,99±0,06 ^a |
| B | 3,93±0,01 ^a | 0,61±0,05 ^b | 3,63±0,43 ^c |
| C | 3,88±0,02 ^b | 0,94±0,08 ^a | 4,43±0,07 ^b |
| D | 3,91±0,02 ^{ab} | 0,66±0,04 ^b | 2,99±0,15 ^d |
| P değeri | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

*A:Kontrol: (*L. monocytogenes* ve sodyum benzoat içermeyen grup); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat

^{a,b,c}Aynı sütundaki farklı harflere sahip olan değerler birbirlerinden farklıdır($p<0,001$).

Silajlara ait organik asit miktarları Tablo 6'da verilmiştir. Silajların laktik asit değerleri incelendiğinde en fazla laktik asit miktarının C grubunda olduğu belirlenmiştir. Çalışmada sodyum benzoat içeren D grubundaki silajların laktik asit miktarı kontrol gurubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Silajların asetik asit değerleri incelendiğinde kontrol gurubu ile C gurubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmazken ($p>0,001$), B ve D gruplarındaki asetik asit oranları kontrol grubu ve C grubuna oranla önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Silajların propiyonik asit değerleri incelendiğinde diğer tüm gruplara kıyasla en yüksek propiyonik asit içeriği D grubunda bulunurken, kontrol grubunda ise en düşük miktarda bulunmuştur. B ve C gruplarının propiyonik asit miktarları arasında ise önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,001$). Silajların bütirik asit değerleri incelendiğinde kontrol gurubu ile B ve C grupları arasında önemli bir farklılık bulunmadığı ($p>0,001$), D grubunun ise kontrol grubuna kıyasla daha düşük bütirik asit içeriğine sahip olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

Tablo 6. Silajların laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit değerleri (g/kg KM)

| Gruplar | LA | AA | PA | BA |
|----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| A | 45,76±0,97 ^b | 16,75±0,39 ^c | 0,95±0,09 ^c | 0,72±0,05 ^a |
| B | 43,16±0,69 ^c | 18,70±0,83 ^b | 1,33±0,04 ^b | 0,72±0,04 ^a |
| C | 47,82±0,76 ^a | 17,31±0,98 ^c | 1,29±0,03 ^b | 0,67±0,05 ^{ab} |
| D | 40,89±0,52 ^d | 21,74±0,5 ^a | 1,87±0,07 ^a | 0,65±0,02 ^b |
| P değeri | <0,001 | <0,001 | <0,001 | P=0,018 |

*A:Kontrol: (*L. monocytogenes* ve sodyum benzoat yok); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat; LA: Laktik asit; AA: Asetik asit; PA: Propiyonik asit; BA: Bütirik asit

^{a,b,c,d}Aynı sütundaki farklı harflere sahip olan değerler birbirlerinden farklıdır.

4.3. Silajların Aerobik Stabilite Özellikleri

Aerobik stabilite testi sonrası belirlenen pH, CO₂, maya ve küf değerleri Tablo 7’de verilmiştir. Silajların hava ile teması sonrası oluşan aerobik koşullarda en yüksek pH değeri kontrol grubunda tespit edilirken, sodyum benzoat ilavesi içeren D grubuna ait silajların pH değerleri diğer gruplara kıyasla daha düşük bulunmuştur (p<0,001). Silajlara ait CO₂ değerleri incelendiğinde en düşük CO₂ oranı D grubunda tespit edilmiştir. B ve C gruplarının CO₂ içeriği kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur (p<0,001). Silajların maya ve küf sayıları karşılaştırıldığında sodyum benzoat katkısının stabiliteyi arttırdığı görülmüştür. Maya ve küf sayıları kontrol grubuyla kıyaslandığında C ve D gruplarında önemli düzeyde düşük bulunmuştur (p<0,001). Tüm gruplar arasında en düşük maya ve küf sayısı sodyum benzoat içeren D grubunda tespit edilmiştir (p<0,001).

Tablo 7. Silajların pH, CO₂, maya ve küf değerleri

| Gruplar | pH | CO ₂ (g/kg) | Maya (cfu/g KM) | Küf (cfu/g KM) |
|----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| A | 4,66±0,03 ^a | 22±4,72 ^a | 14,33±0,36 ^a | 5,07±0,11 ^a |
| B | 4,54±0,03 ^b | 15,29±0,29 ^b | 12,25±0,37 ^b | 4,23±0,46 ^b |
| C | 4,45±0,03 ^c | 15,79±1,03 ^c | 8,77±0,46 ^c | 2,47±0,15 ^c |
| D | 4,25±0,05 ^d | 11,24±0,68 ^c | 6,61±0,31 ^d | 0,66±0,08 ^d |
| P değeri | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

*A:Kontrol: (*L. monocytogenes* ve sodyum benzoat yok); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat

^{a,b,c,d}Aynı sütündeki farklı harflere sahip olan değerler birbirlerinden farklıdır (p<0,001).

4.4. Silajların Mikrobiyolojik Özellikleri

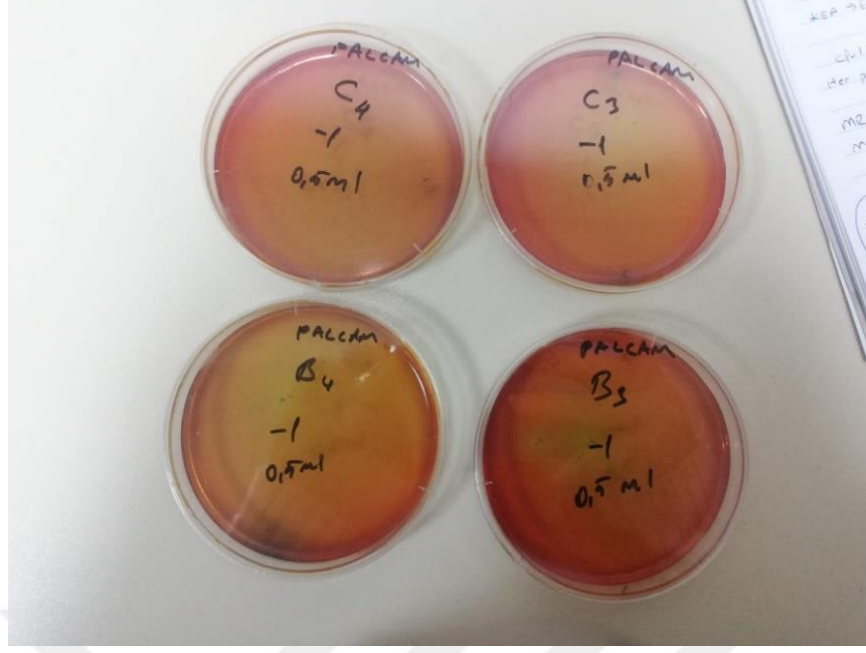
Mikrobiyolojik ekimlerden alınan sonuçlara göre silaj gruplarında bulunan LAB sayıları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Silajlarda bulunan LAB ve *L.monocytogenes* populasyonları (log₁₀kob/gr KM).

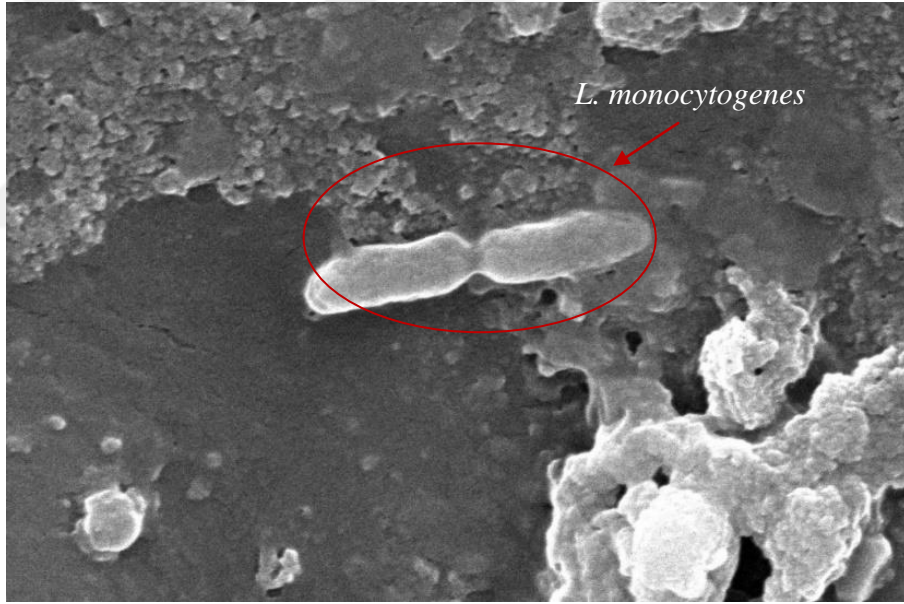
| Gruplar | <i>Lactobacillus</i> spp. | <i>Enterococcus</i> spp. | <i>Lactococcus</i> spp.+ <i>Streptococcus</i> spp. | <i>L. monocytogenes</i> |
|---------|---------------------------|--------------------------|--|-------------------------|
| A | 7.92 | 6.81 | 7.78 | 0 |
| B | 7.70 | 6.79 | 7.00 | 0 |
| C | 7.51 | 6.69 | 6.69 | 0 |
| D | 7.43 | 6.57 | 6.30 | 0 |

*A:Kontrol: (*L. monocytogenes* ve sodyum benzoat yok); B grubu: *L. monocytogenes*; C grubu: *L. monocytogenes*+Sodyum benzoat; D Grubu: Sodyum benzoat

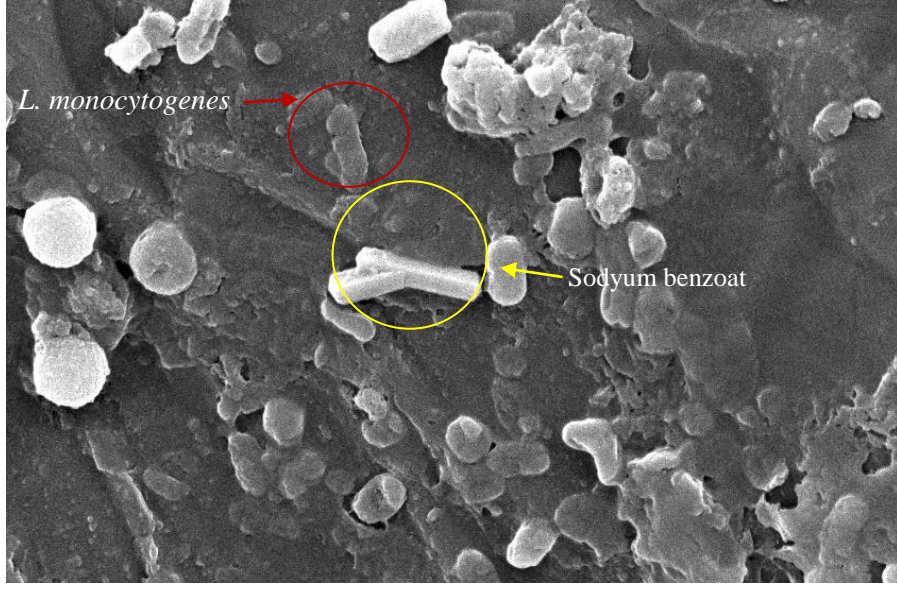
Yapılan mikrobiyolojik analizlerde silaj örneklerinde *L. monocytogenes* kolonisine ait gelişim gözlenmemiştir (Şekil 7). Ancak;silaj örnekleri elektron mikroskobu altında incelendiğinde inaktif halde *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiştir (Şekil 8; Şekil 9).



Şekil 7. B ve C gruplarındaki silajlara ait *L. monocytogenes* ekim sonuçları



Şekil 8. B grubu silajda elektron mikroskobu altında *L. monocytogenes* görünümü



Şekil 9. Elektron mikrosobu altında C grubu silajda *L. monocytogenes* ve sodyum benzoat kristallerinin görünümü

5. TARTIŞMA

Silajda fermentasyon çeşitli faktörlerden etkilenen bir süreçtir. Son yıllarda silaj ve silaj katkı maddeleri üzerine besin değerinin arttırılması ve silolama işlemi sırasında olası risklerin azaltılması amacıyla pek çok araştırma yapılmıştır. Silolama sırasında bitki materyaline eklenen silaj katkı maddeleri, fermentasyon sürecini iyileştirerek besin madde kayıplarını azaltabilmektedir. Silaj katkı maddesi olarak kullanılan organik asitlerin keskin ve rahatsız edici kokularından dolayı kullanımları sınırlanmaktadır. Bu nedenle, alternatif silaj katkı maddeleri olarak daha güvenli olan organik asit tuzları önerilmektedir (Yuan ve ark., 2017). Enterobakteri ve mayaların gelişiminin inhibe edilmesinde etkili olduğu belirlenmiş olan organik asit tuzları Na benzoat ve Na diasetatın etkili birer antimikrobiyal, antifungal ve antiviral ajan oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla silajların yemleme dönemini uzatmak için tuzların bu özelliklerinden yararlanılmaktadır (Yuan ve ark., 2017). Ayrıca; bu tuzlar *Clostridia* türlerinden kaynaklanan ikincil fermentasyonu sınırlandırmakta ve aerobik stabiliteyi geliştirerek kaliteli bir silaj elde edilmesini sağlamaktadır. Yapılan önceki araştırmalarda sodyum benzoatın silaj üretim sürecinde mikrobiyal faaliyet üzerine etkinliği olduğu tespit edilmiştir (Yuan ve ark. 2017; Zhang ve ark., 2020). Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın silaj katkı maddesi olarak kullanıldığı bir çalışmada, sodyum benzoat içeren silajlarda *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis* türlerinde önemli bir artış gözlenirken ($p<0,05$), silo ortamında istenmeyen *Klebsiella* türlerinde ise azalma olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2020).

Yüksek kaliteli silaj üretimindeki önemli sorunlardan biri, soldurma ve silolama sırasında oluşan protein denatürasyona bağlı protein kayıplarıdır. (Krawutschke ve ark., 2013). Yapılan bu tez çalışmasında, kontrol grubuna göre sodyum benzoat içeren silajlarda (Grup D) ham protein oranında azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın sebebinin sodyum benzoatın antimikrobiyal özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Zira silaj ortamındaki mikorganizma varlığının artışı mikrobiyal protein oranını da önemli bir şekilde arttırabilmektedir. Baklagil yemlerinde yoğun proteolizin meydana gelebileceği ve yüksek oranda protein niteliğinde olmayan nitrojen (NPN) oluşturabileceği bunun da silajın besin kalitesinin düşmesine neden olabileceği bildirilmiştir (McDonald ve ark., 1991; Zhang ve ark., 2021). Yapılan önceki çalışmalarda $\text{NH}_3\text{-N}$ istenmeyen

fermentasyonun ana ürünü olarak değerlendirmiş ve silajda proteolizin varlığını ifade etmiştir (Pahlow ve ark., 2003; He ve ark., 2021 Zhang ve ark., 2021). Silo içerisinde yüksek $\text{NH}_3\text{-N}$ birikimi, amino asitlerin mikrobiyal aktivite yoluyla deaminasyonuna bağlanmaktadır (Lv ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2021). Literatürdeki belirtilen araştırmalara benzer olarak yapılan tez çalışmasında silajlara eklenen sodyum benzoat katkısının $\text{NH}_3\text{-N}$ ve bütirik asit oranını önemli şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuca göre sodyum benzoatın silo ortamında istenmeyen fermentasyonu engellediği düşünülebilir. Elde edilen bulgulara benzer olarak yapılan bir çalışmada mısır silajına %0.1 ve %0.2 oranında sodyum benzoat katkısıyla silajlardaki $\text{NH}_3\text{-N}$ ve bütirik asit oranının önemli ölçüde azaldığı ifade edilmiştir (Bernardes ve ark., 2015). Başka bir çalışmada mısır silajında %0.1 oranında kullanılan sodyum benzoatın kontrol grubuna göre $\text{NH}_3\text{-N}$ ve etanol konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı ($p<0,05$) bildirilmiştir (Queiroz ve ark., 2013). Araştırmacı, sodyum benzoat katkılı silajlarda fermentasyonun daha kaliteli ve protein bozulmasının daha az olduğunu ifade etmiştir (Queiroz ve ark., 2013). Ot silajında katkı maddesi olarak sodyum benzoat, sodyum nitrit ve potasyum sorbat kombinasyonunun kullanıldığı bir çalışmada silajlarda $\text{NH}_3\text{-N}$ ve bütirik asit miktarının kontrol grubuna göre önemli düzeyde azaldığı ifade edilmiştir (Knicky ve Spörndly, 2009).

Silajın pH değeri, kalitenin değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biridir. İyi fermente olmuş mısır silajında pH değerlerinin 3,7-4,2 arasında olması istenmektedir (Tegün ve Aydın, 2023). Bu çalışmada silajların pH değerleri 3,89-3,93 arasında olup araştırmada bulunan tüm grupların pH değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Mısır bitkisinin silaj materyali olarak kullanıldığı başka bir çalışmada sodyum benzoat katkısı ilave edilen grup ile kontrol grubu silajların pH değerleri benzer bulunmuştur (Bernardes ve ark., 2015). Yapılan farklı bir çalışmada ise %0,1 oranında sodyum benzoat katkılı mısır silajında pH değerinin (3,67), kontrol grubuna (3,71) göre daha düşük olduğu ($p<0,05$), ancak; değerlerin her iki gruptaki mısır silajları için istenilen aralıkta olduğu ifade edilmiştir (Queiroz ve ark., 2013). Ot silajı kullanılarak yapılan bir çalışmada ise katkı maddesi olarak sodyum benzoat, sodyum nitrit ve potasyum sorbat kombinasyonunun silajlardaki pH düzeyini (4,4) kontrol grubuna (5,3) göre önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Knicky ve Spörndly, 2009).

Laktik asit silo ortamında pH'nın düşmesinden sorumlu başlıca organik asittir. Bu çalışmada D grubu silajlarda LA miktarı diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Bu durumun antibakteriyel etkili sodyum benzoatın LAB'nin üremesini engellemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Şeker kamışı silajı kullanılarak yapılan farklı bir çalışmada da bu sonuçlara benzer olarak sodyum benzoat kullanılan silajlardaki LA miktarı kontrol grubuna göre düşük ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur (Souza ve ark., 2022). Queiroz ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise sodyum benzoat grubu ile kontrol grubu arasındaki laktik asit oranının benzer olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Aerobik stabilitenin kısa olması, iyi fermente edilmiş silajlarda dahi yaygın bir problemdir. Silajlarda aerobik stabilitenin kısa olması istenmeyen maya ve küflerin aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Antifungal etkiye sahip olan sodyum benzoatın silajlarda maya ve küf gelişimini engellediği ifade edilmiştir (Knicky ve Spörndly, 2015). Yapılan tez çalışmasından elde edilen bulgularda aerobik stabilite testi sonrası kontrol grubuna göre sodyum benzoat eklenen silajların (D grubu) silajların CO₂ ve pH değerleriyle küf ve maya sayılarının önemli derecede azalttığı gözlenmiştir ($P<0,001$). Bu bulgular sodyum benzoatın antifungal etkisinin olduğunu destekler niteliktedir. Aynı şekilde yapılan başka bir çalışmada mısır silajında %0,2 oranında kullanılan sodyum benzoatın maya ve küf içeriğini kontrol grubu silajlara göre önemli düzeyde azalttığı ve aerobik stabiliteyi arttırdığı bildirilmiştir (Bernardes ve ark., 2015). Farklı bir çalışmada ise mısır silajında %0,1 oranında sodyum benzoat katkılı grup ile kontrol grubu arasında maya sayısı bakımından istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (Queiroz ve ark., 2013). Ancak araştırmacı sodyum benzoat grubunda mayaların sayısal olarak daha düşük olduğunu ve etanol oranındaki düşüşün bu farklılıktan kaynaklı olabileceğini ifade etmiştir (Queiroz ve ark., 2013).

L. monocytogenes bakterisinin optimal gelişim gösterdiği pH değerlerinin 6.0-8.0 arasında olduğu bilinmektedir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010). Yapılan literatür incelemesinde silajlarda sodyum benzoatın *L. monocytogenes* üzerine etkilerine dair araştırmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında ise mikrobiyolojik ekimler sonrası silajlara inokule edilen *L. monocytogenes* bakterisine ait koloni

gelişimi gözlenmemiştir. Bunun sebebinin silajların pH değerlerinin 3.8-3.9 arasında olması ve *L. monocytogenes*'in bu pH aralığında gelişimininengellediğinden kaynaklı olabileceği düşünölmektedir.

Gelecek çalışmalarda yonca bitkisinin silajının yapılmasında sodyum benzoatın uygun SÇK içeriğine sahip olan katkı maddeleriyle kullanılmasının yonca silajı kalitesi üzerine etkisinin araştırılması gerektiği düşünölmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *L. monocytogenes* ile kontamine edilen mısır silajında katkı maddesi olarak sodyum benzoat kullanılmıştır. Sodyum benzoatın *L. monocytogenes*'i inhibe edip edemeyeceği, silajların kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine ve aerobik stabiliteye etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan mikrobiyolojik ekimler sonucunda deneme gruplarının hiçbirinde *L. monocytogenes* kolonisi üremediği gözlemlenmiştir. *L. monocytogenes* bakterisi silo içerisinde daha çok alkali koşullarda (pH 6-8) gelişim göstermektedir. Bu çalışmada silajlarda *L. monocytogenes* gelişmemesinin nedeninin pH değerinin istenilen aralıklarda (pH 3.8-3.9) olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan kimyasal analizler sonucu sodyum benzoat kullanılan silajlarda NH₃-N, etanol ve bütirik asit içeriklerinde önemli oranda azalma meydana geldiği saptanmıştır. Bu değerlerdeki azalma kaliteli bir silajda aranan özelliklerdendir. Ayrıca aerobik stabilite testi sonrası sodyum benzoat içeren silajlarda maya ve küf sayısında da önemli şekilde azalma meydana geldiği ve aerobik stabitenin arttığı gözlenmiştir. Bu değerlendirmelere göre sodyum benzoatın silaj kalitesini ve aerobik stabiliteyi olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Gelecek çalışmalarda farklı silaj materyallerinde sodyum benzoatın koruyucu etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmaların artırılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Ashbell, G., Weinberg, Z. G., Azrieli, A., Hen, Y., & Horev, B. (1991). A simple system to study the aerobic determination of silages. *Canadian Agricultural Engineering*, 34, 171-175.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis (AOAC) Official method 923.03. *In Association of Official Analytical Chemists International*.
- Avila, C. L. S., & Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 966-984.
- Aydın, D. (2019). *Silaj ve gıda kaynaklı laktik asit bakterilerinin (LAB) mısır ve yonca silajlarının fermentasyonunda inokulant olarak kullanım potansiyellerinin araştırılması* [Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi].
- Barker, S.B., Summerson, W.H. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry*, 138: 535-554.
- Basmacıoğlu, H., & Ergül, M. (2002). Silaj mikrobiyolojisi. *Hayvansal Üretim*, 43(1), 12-24.
- Bernardes, T. F., De Oliveira, I. L., Lara, M. A. S., Casagrande, D. R., Ávila, C. L. S., & Pereira, O. G. (2015). Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. *Grass and Forage Science*, 70(3), 491-498.
- Bolsen, K. K., Ashbell, G., & Weinberg, Z. G. (1996). Silage fermentation and silage additives-Review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 9(5), 483-493.
- Büyükkılıç Beyzi, S., Konca, Y., Özdüven, M. L., & Okuyucu, B. (2016). Çeşitli Ticari Karışımların Ayçiçeği Silajlarında Kullanılabilme Olanığı, Silaj Kalitesi, İn-Vitro Sindirilebilirlik ve Mikroorganizma Profili Üzerine Etkileri. *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*, 31(2).
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Çayiroğlu, H., Coşkun, İ., & Şahin, A. (2016). Factors affecting the aerobic stability of silage and improvement strategies. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 31(2), 91-97.
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16-34.
- Driehuis, F. and Elferink, S. O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly*, 22(4), 212-216.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebes, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Filya, İ. (2001). Silaj Fermentasyonu. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(1), 87-93.
- Filya, İ., Ashbell, G., Hen, Y., Weinberg, Z.G. (2000). The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Animal Feed Science Technology*, 88: 39-46.
- He, Q., Zhou, W., Chen, X., & Zhang, Q. (2021). Chemical and bacterial composition of *Broussonetia papyrifera* leaves ensiled at two ensiling densities with or without *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Cleaner Production*, 329, 129792.
- Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.

- Keleş, G. ve Yazgan, O. 2005. Bakteriyel inokulantların silaj fermantasyonu ve hayvan performansına etkileri. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 15(1), 26–34.
- Knicky, M., & Spörndly, R. (2009). Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15), 2659-2667.
- Knicky, M., & Spörndly, R. (2015). Use of a mixture of sodium nitrite, sodium benzoate, and potassium sorbate in aerobically challenged silages. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5729-5734.
- Koç, F. (2020). Sodyum diasetat ve sodyum benzoat ilavesinin yüksek nemli mısır silajlarının aerobik stabilite özellikleri üzerine etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 57(2), 289-302.
- Krawutschke, M., Weiher, N., Thaysen, J., Loges, R., Taube, F., & Gierus, M. (2013). The effect of cultivar on the changes in protein quality during wilting and ensiling of red clover (*Trifolium pratense* L.). *The Journal of Agricultural Science*, 151(4), 506-518.
- Kung Jr, L. (2010). Aerobic stability of silage. In *Proc. 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Crop/cereal Conference, Visalia, CA, USA* (Vol. 2).
- Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of dairy Science*, 101(5), 4020-4033.
- Kung Jr., L. (2001). Silage fermentation and additives. Science and technology in the Feed Industry Proceedings of Allteck's 17th Annual Symposium, 145:159.
- Küçükkaraca Yıldırım, D. (2014). *Gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizi ve validasyonu* [Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi].
- Lv, H., Pian, R., Xing, Y., Zhou, W., Yang, F., Chen, X., & Zhang, Q. (2020). Effects of citric acid on fermentation characteristics and bacterial diversity of *Amomum villosum* silage. *Bioresource technology*, 307, 123290.
- Mahanna, B. (1993). Troubleshooting silage problems. In *State Applied Nutrition Conference* (Vol. 4, pp. 1-21).
- McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. Marlow: Chalcombe Publications.
- Muck, R. E., Kung Jr, L. and Collins, M. (2020). Silage production. *Forages: The Science of Grassland Agriculture*, 2, 767-787.
- Muck, R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 183-191. Doi: 10.1590/S1516-35982010001300021
- Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F. & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 125–132. Doi: 10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
- Pahlow, G., Muck, R. E. and Driehuis, F. (2003). Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E.; Harrison, J.H. (Eds.) *Silage science and technology*: Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, p. 31-93
- Piper, J. D., & Piper, P. W. (2017). Benzoate and sorbate salts: a systematic review of the potential hazards of these invaluable preservatives and the expanding spectrum of clinical uses for sodium benzoate. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(5), 868-880.
- Pitt, R. E., Muck, R. E., & Pickering, N. B. (1991). A model of aerobic fungal growth in silage. 2. Aerobic stability. *Grass and Forage Science*, 46(3), 301-312.

- Queiroz, O. C. M., Arriola, K. G., Daniel, J. L. P., & Adesogan, A. T. (2013). Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5836-5843.
- Santos, W. P., Salvati, G. G. S., Arthur, B. A. V., Daniel, J. L. P., & Nussio, L. G. (2019). The effect of sodium benzoate on the nutritive value of rehydrated sorghum grain silage for dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 256, 114267.
- Shahmohammadi, M., Javadi, M., & Nassiri-Asl, M. (2016). An overview on the effects of sodium benzoate as a preservative in food products. *Biotechnology and Health Sciences*, 3(3), 7-11.
- Souza, M. S., de Queiroz, A. C., Bernardes, T. F., Faturi, C., Domingues, F. N., Rodrigues, J. P., ... & do Rêgo, A. C. (2022). Effects of Sodium Benzoate Application, Silage Relocation, and Storage Time on the Preservation Quality of Sugarcane Silage. *Agronomy*, 12(7), 1533.
- Şahin, İ. F., & Zaman, M. (2010). Hayvancılıkta önemli bir yem kaynağı: Silaj. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 15(23), 1-18.
- Tasci, F., Turutoglu, H. and Ogutcu, H. (2010). Investigations of Listeria species in milk and silage produced in Burdur province. The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Kafkas 16 (Suppl-A): S93-S97
- Tegün, E. ve Aydın, R. (2023). Laktik Asit Bakterilerinin Silaj Kalitesine Etkisi. M. Genç (Ed), *Hayvansal Üretimde Yenilikçi Yaklaşımlar I* (s 6-42). BİDGE Yayınları.
- Van Soest P. J., Robertson, J. D., Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- Wesley, I. V. (2007). Listeriosis in Animals. Pages 55–84 in *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3th ed. E. T. Ryser and E. H. Marth, ed. CRC Press, New York, NY.
- Wilkinson, J. M. and Davies, D. R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*, 68(1), 1-19.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., & Lin, C. J. (2003). History of silage. *Silage science and technology*, 42, 1-30.
- Yavuz, M, Korukluoğlu, M. (2010). Listeria monocytogenes' in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1), 1-10.
- Yuan, X., Wen, A., Dong, Z., Desta, S. T., & Shao, T. (2017). Effects of formic acid and potassium diformate on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of alfalfa silage. *Grass and forage science*, 72(4), 833-839.
- Zhang, H., Cheng, X., Elsabagh, M., Lin, B., Wang, H. R., (2021). Effects of formic acid and corn flour supplementation of banana pseudostem silages on nutritional quality of silage, growth, digestion, rumen fermentation and cellulolytic bacterial community of Nubian black goats. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(8), 2214-2226. doi:10.1016/S2095-3119(20)63470-0.
- Zhang, Y., Liu, Y., Meng, Q., Zhou, Z., & Wu, H. (2020). A mixture of potassium sorbate and sodium benzoate improved fermentation quality of whole-plant corn silage by shifting bacterial communities. *Journal of applied microbiology*, 128(5), 1312-1323.
- Zhou, W., Pian, R., Yang, F., Chen, X., & Zhang, Q. (2021). The sustainable mitigation of ruminal methane and carbon dioxide emissions by co-ensiling corn stalk with *Neolamarckia cadamba* leaves for cleaner livestock production. *Journal of Cleaner Production*, 311, 127680.

ÖZGEÇMİŞ

| | |
|-------------------------|--|
| Kişisel Bilgiler | |
| Adı Soyadı | Erdem Tüzel |
| | |
| Lise | Zonguldak Anadolu Öğretmen Lisesi |
| Lisans | Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2005-2010) |
| Yüksek Lisans | Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları (2022-Devam) |



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
<http://www.balikesir.edu.tr>

