



Formik Asitin *In Vitro* Rumen Fermentasyonu ve Metan Üretimine Etkisi[#]

Kanber Kara^{1*}, Eray Aktuğ¹, Alper Çağrı², Berrin Kocaoğlu Güçlü¹, Erol Baytok¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 38039 Kayseri, Türkiye

²Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Kırşehir İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 40100 Kırşehir, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

[#]Bu çalışmanın özeti 8. Asya Buffalo Kongresi'nde (21-25 Nisan 2015, İstanbul/Türkiye) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Geliş 09 Temmuz 2015
Kabul 29 Ağustos 2015
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:

Formik asit
In vitro gaz üretimi
Metan
Rumen fermentasyonu
Yonca

* Sorumlu Yazar:

E-mail: karakanber@hotmail.com

Ö Z E T

Bu araştırmanın amacı, *in vitro* gaz üretim tekniği ile yonca kuru otunun rumen fermentasyonu ve metan üretimine formik asitin etkisini belirlemektir. Çalışmada rumen sıvısı inokulumuna 0,0 (kontrol grubu, YF0), 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 ml/L (deneme grupları, sırasıyla YF1, YF2, YF3, YF4 ve YF5) düzeylerinde formik asit (Amasil85-liquid) ilavesinin yonca kuru otunun toplam gaz üretimi (TGÜ), metabolik enerji (ME), organik madde sindirimine (OMS), pH ve metan üretimine etkisi belirlenmiştir. Rumen sıvısına artan düzeylerde formik asit katılması yonca kuru otunun *in vitro* TGÜ, ME ve OMS'ni linear, quadratik ve kübik kontrastta, metan üretimini ise linear kontrastta (yaklaşık %17'den % 20'e kadar) farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Formik asitin çalışılan parametrelere etkisi kullanılan dozuna göre farklılık göstermiştir. Formik asitin düşük dozları (0,1 ml/L ve 0,2 ml/L) *in vitro* TGÜ, ME ve OMS'ni önemli düzeyde azaltırken, yüksek dozu (0,5 ml/L) bu parametreleri önemli oranda arttırmıştır. Öte yandan orta dozlarının (0,3 ml/L ve 0,4 ml/L) yonca kuru otunun *in vitro* TGÜ, ME ve OMS'ne önemli bir etkisi görülmedi. Ruminal pH değeri formik asit ilavesiyle değişmemiştir. Antibakteriyel, lezzet verici ve silajda fermentasyonu artırıcı niteliğinden dolayı güvenli bir yem katkısı olarak nitelendirilen formik asitin çalışmada kullanılan tüm dozlarının *in vitro* metan üretimini artırdığı belirlenmiştir. Yüksek dozlarının yonca kuru otunun ME ve OMS'ne olumlu etkisi olsa da sera gazlarını artıran olumsuz etkisinden dolayı yemlerde sınırlı düzeyde kullanılması gerekir. Daha sonraki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, tüm çiftlik hayvanlarının yem ham maddeleri ve rasyonlarına formik asit ilavesinin sindirim sistemi parametreleri ve küresel ısınma üzerine etkisinin araştırılması faydalı olacaktır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(11): 856-860, 2015

Effect of Formic Acid on *In Vitro* Ruminal Fermentation and Methane Emission

ARTICLE INFO

Article history:

Received 09 July 2015
Accepted 29 August 2015
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:

Formic acid
In vitro gas production
Methane
Ruminal fermentation
Alfalfa

* Corresponding Author:

E-mail: karakanber@hotmail.com

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effects of formic acid on the *in vitro* methane production and *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa hay. Effect of 0.0 (control group: YF0), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 ml/L (experimental groups: YF1, YF2, YF3, YF4, and YF5 respectively) formic acid (Amasil85-liquid) addition to rumen fluid on ruminal fermentation parameters of alfalfa hay were determined by using *in vitro* gas production techniques. Methane production of *in vitro* incubation increased (to about 20%) with addition of linearly increased formic acid. Linearly increased levels of formic acid addition to rumen fluid has significantly changed the production of *in vitro* total gas production, metabolic energy (ME) and organic matter digestibility (OMD) at linear, quadratic and cubic. The addition of 0.1 ml/L and 0.2 ml/L formic acid to rumen fluid significantly decreased *in vitro* total gas production, ME and OMD however addition of 0.3 ml/L and 0.4 ml/L formic acid was not changed *in vitro* gas production, ME and OMD levels and 0.5 ml/L formic acid was significantly increased all these parameters. Ruminal pH was not changed by addition of formic acid. Formic acid is a safe feed additive because of its properties antibacterial and flavorings and also is used as a fermentation promoter in silage. In this study it has been observed that all doses of formic acid increased *in vitro* enteric methane production and low doses decreased *in vitro* total gas production, ME and OMD and high doses have increased all these parameters. High doses have a positive effect on ME and OMD; however formic acid should be used at limited levels in diets due to the negative effect of increasing greenhouse gases. The effect of formic acid addition to the feed raw matter and rations of all livestock would be beneficial to investigate in terms of digestive system parameters and global warming, further *in vitro* and *in vivo* studies.

Giriş

Birleşmiş Milletler tarafından yapılan Uluslararası İklim Değişikliği Paneli'ne (IPCC: The Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007) göre insanların çeşitli etkilerle (tarım-hayvancılık ve sanayideki gelişmelerle) salınımında artışa neden olduğu sera gazları, son 50 yılda küresel ısınmayı önemli derecede arttırmıştır. Sera gazları arasında en önemlileri karbondioksit (CO₂), metan (CH₄) ve nitroz oksit (N₂O)'tir (Monteny ve ark., 2006). Metanın küresel ısınma üzerine etkisi karbondioksitten 23-25 kat fazla olması ve atmosferde kalma süresinin yaklaşık 12 yıl olması gibi nedenlerle sera gazları içinde CO₂'ten sonra ikinci sırada öneme sahip olduğu bildirilmektedir (Hook ve ark., 2010; Broucek, 2014). Küresel metan salınımının % 50-60'ını tarım ve hayvancılık sektöründen (özellikle ruminant yetiştiriciliği) ileri gelmektedir (Ellis ve ark., 2007). Çiftlik hayvancılığının artmasıyla metan salınımı da küresel ölçekte artış göstermiş olup, insan kaynaklı metan üretiminin % 17-37 kadarını ruminantların enterik metan üretimi oluşturmuştur (Broucek, 2014). Evcil ruminantların (özellikle sığır, koyun ve keçi) tükettikleri yemlerin rumendeki normal fermentasyonu sonucu oluşan metandan atmosfere bırakılan yıllık metan düzeyi 86 milyon ton (mt) dolayındadır. Bu düzeyin 18,9 mt'u süt sığırcılığı, 55,9 mt'u besi sığırcılığı ve 9,5 mt ise koyun-keçi yetiştiriciliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir (McMichael ve ark., 2007). Kanatlı ve domuz yetiştiriciliği sonucu oluşan sera gazları miktarı ise çok daha düşük düzeydedir. Ruminantların ürettiği enterik metanın yaklaşık %87'si rumende, geriye kalan yaklaşık %13'lük kısmı da kalın bağırsaklarda üretilmektedir (Lockyer ve Jarvis 1995; Lasey ve ark., 1997). Ruminantlarda metan salınımı hayvanın türü ve ırkı, rumen sıvısı pH'sı, asetik asit: propiyonik asit oranı ve metanojen popülasyonu ile rasyondaki konsantrasyon yem düzeyi ve rasyonun bileşimi gibi faktörle bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Johnson ve Johnson, 1995; Charmley ve ark., 2008).

Tüketilen yem rumendeki bakteri, protozoa ve mantarlar tarafından fermente edilerek uçucu yağ asitleri (UYA) ve mikrobiyal protein yanı sıra yan ürün olarak bazı gazlara (karbondioksit ve hidrojen) dönüştürülürler. Polisakkaritleri fermente eden ve hidrojen üreten mikroorganizmalar ile karbondioksiti azaltmak için hidrojen kullanıp metan üreten metanojenler arasında simbiyoz bir ilişki vardır. Bu süreç sonucunda rasyonun kalite ve kantitesine bağlı olarak brüt enerjisinde metan salınımı yoluyla %2-12 arasında bir kayıp gerçekleşir (Johnson ve Johnson, 1995). Polisakkaritlerin fermentasyonu ile rumen ortamında oluşan UYA'lerden propiyonik asit oranındaki artış ortamdaki hidrojenin azalmasına ve böylelikle hidrojenin metana dönüşüm düzeyinin azalmasına neden olur. Metan salınımını azaltmak için çoğu araştırmacılar propiyonik asit prekürsörü olan bazı organik asitlerin (malik asit, fumarik asit ve pirüvik asit) bu yönden etkilerini araştırmışlardır. Bu organik asitlerden malik asit ve fumarik asitin metan üretimini azaltıcı etkisi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konulmuştur (Lopez ve ark., 1999; Tejido ve ark., 2005; Ok ve ark., 2012).

Formik asit de bir organik asit olup, Avrupa Birliği Yem Katkıları Listesi'nde E-236 kodu ile çiftlik hayvanlarının yemlerine koruyucu (prezervatif) ve aroma verici yem katkıları olarak (10 g formik asit/kg rasyon) yer almaktadır (EFSA, 2014). Formik asitin yemlere enerji kaynağı olarak katılması yanında mikrobiyal bozulmalara karşı korumak, sindirilebilirliği arttırmak ve silaj fermentasyonunu sağlamak için katkı maddesi olarak kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Yem hammaddeleri ve içme sularındaki bakteri (*Salmonella*) üremesini inhibe ettiği için yem katkıları olarak veya silaj katkıları olarak önerilmektedir (Vale ve ark., 2004; Rowghani ve Zamiri, 2009; EFSA, 2014). Djordjevic ve ark (2005) yonca yeşil otuna %0,5 ve 0,7 oranında formik asit ilave edilerek yapılan silajda laktik asit düzeyinin arttığını saptamışlardır. Nagel ve Broderick (1992) ise formaldehit veya formik asit ilave edilerek yapılan yonca silajının laktasyondaki süt sığırları tarafından daha iyi sindirildiğini ve besin madde kullanımının olumlu etkilendiğini bildirmişlerdir. Formik asitin yem katkıları olarak kullanımına ilişkin beklenen olumlu etkileri yanında metan emisyonunu arttırıcı potansiyeli de vardır. Yemle alınan formik asit rumen sıvısındaki mikroorganizmalar için önemli bir fermentasyon ürünüdür (Hungate ve ark., 1970). Rumene ulaşan formik asit burada asetik asit üretiminde rol alması yanında metanojen mikroorganizmalar için iyi bir substrat olarak kullanılır ve çok hızlı şekilde hidrojen ile karbondioksit dönüşür (Hook ve ark., 2010). Johnson ve Johnson (1995) rumendeki asetat oranında artışın metanojenlerin metan üretimi için gerekli olan metil gruplarının düzeyinde artışa ve sonuçta metan salınımında artışa neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmalarda (Baytok ve ark., 2005; Djordjevic ve ark., 2005; Lorenzo ve O'Kiely, 2008) formik asitin antimikrobiyal ve silaj katkı maddesi olarak kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak katkı maddesi olarak kaba ve konsantrasyon yemlere ilave edilen formik asitin son yıllarda önemi artan sera gazları salınımına olabilecek etkisinin araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Daha önceki çalışmalarda kaba yemlerin konservasyonu sırasında formik asitin kullanımının *in vitro* toplam gaz üretimi, organik madde sindirimi ve metabolik enerji düzeyini arttırdığı ispatlanmıştır (Hetta ve ark., 2003; Rowghani ve ark., 2008). Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan yonca kuru otunun sindirilebilirliğini muhtemel arttırabilen ancak metan emisyonunu olumsuz etkilemeyen formik asit dozlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Formik asit

Çalışmada formik asit yem katkı maddesi olarak ticari bir ürün olan Amasil85 liquid (BASF The Chemical Company) kullanıldı. Amasil85, en az %85 formik asit (Ürün kodu: 10001972, molekül formülü HCOOH, molekül ağırlığı 46,03 g) içeren renksiz sıvı formda suda kolay çözünen ticari bir üründür. Bu katkı maddesinin özgül ağırlığı 1,190 g/cm³ (20°C'de) ve pH değeri 2,2 (10 g/l H₂O'de)'dir.

Yonca kuru otu ve yem analizi

Çalışmada kullanılan yonca kuru otu çiçeklenme başlangıcında biçilen yoncanın kurutulması ile elde edilmiştir. Yonca kuru otu kimyasal analizler ve in vitro gaz üretiminde kullanılmak üzere yaklaşık 1,0 mm elek çapındaki IKA-A10 laboratuvar tipi değirmende (IKA-Werke, Almanya) öğütülmüştür. Yoncanın kuru madde (KM), ham protein (HP), ham yağ (HY) ve ham selüloz (HS) düzeyi AOAC (1995)'a göre saptanmıştır. Nötr deterjan çözeltilisinde çözünmeyen lifli bileşikler (NDF), asit deterjan çözeltilisinde çözünmeyen lifli bileşikler (ADF) ve asit deterjan lignin (ADL) düzeyi Van Soest ve ark. (1991) tarafından bildirilen metotlar doğrultusunda yapılmıştır. Yoncada NDF analizi yapılırken sodyum sülfür (Merck) ve ısıya dayanıklı alfa-amilaz (Ankom) kullanılmıştır. Bulunan NDF, ADF ve ADL % değerleri kül kalıntısı içermemektedir.

İn vitro gaz üretim tekniği

Rumen sıvısı yaklaşık %80 konsantre (%55 arpa, %15 pamuk tohumu küspesi, %5 buğday kepeği, %4 ayçiçeği küspesi ve %1 vitamin+mineral karışımı) + %20 kaba yem (%10 mısır silajı, %5 yonca kuru otu, %5 buğday samanı) ile beslenen besi sığırlarından alındı. Rumen sıvısı yaklaşık 39±1°C'deki ağız vidalı kapaklı cam şişe (Isolab, Almanya) içine koyulup, içinde yaklaşık 39±1°C'de su bulunan kapaklı termos konteynir ile laboratuvara getirilmiştir. Rumen sıvısı CO₂ gazı altında anaerobik ortam sağlanarak 6 kat tülbentten süzülükten sonra in vitro gaz üretiminde kullanılmıştır.

Çalışmada rumen sıvısına 0,0 ml/L (kontrol grubu) ve 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 ml/L (deneme grupları) olmak üzere beş farklı dozda Amasil85-liquid ilave edilmiştir. İn vitro gaz üretimi Menke ve Steingass (1988)'nin yöntemi doğrultusunda kullanılan 100 ml'lik cam şırıngalar (Model Fortuna, Haberle Labortechnik, Almanya) içinde 200±10 mg kurutulmuş yonca ile buffer +makromineral +mikromineral +indirgenme+resazurin çözeltileri karışımı (20 ml) ve rumen sıvısı (10 ml) karışımı inkübe edilmiştir. İnkübasyon 24 saat boyunca 39°C'lik ısıda su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cam malzemeler bir termostatik kabinde (Lovibond, Avustralya), çözeltiler ise kontak termometreli dijital manyetik karıştırıcıda (Wise Stir MSH-D, Witeg, Almanya) ön ısıtmaya tabi tutulduktan sonra in vitro gaz üretiminde kullanılmıştır. Çözeltiler+rumen sıvısı karışımı her bir fermenter içine otomatik dispansır (Isolab, Almanya) ile enjekte edildi. Şırıngalar tek yönlü polietilen klipsler kullanılarak kapatıldı. Çalışmada in vitro deneme her grup için üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Üç adet şırınga da toplam gaz üretimini hesaplamak için kör (yonca içermeyen, sadece buffer ve çözeltiler ile rumen sıvısı içeren) olarak kullanılmıştır.

Toplam gaz ve metan üretiminin saptanması

Çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir şırıngada üretilen toplam gaz miktarı (ml) şırıngalar üzerinden okunarak belirlenmiştir. Toplam gaz üretimi okunduktan sonra bu toplam gaz plastik enjektör içine alındıktan sonra üç yönlü musluk kullanılarak infrared metan ölçüm cihazına (Sensor, Europe GmbH, Erkrath, Almanya) aktarılmıştır. Cihazın metan ölçümü bilgisayar ekranından % değer olarak belirlenmiştir.

Metabolik enerji (ME) ve organik madde sindirim derecesinin (OMS) saptanması

Çalışmada kullanılan yoncanın farklı formik asit düzeylerine bağlı olarak değişen ME ve OMS düzeyi Menke ve ark. (1979) ve Blümmel ve ark. (1997) tarafından bildirilen formüllere göre hesaplanmıştır.

$$ME \text{ (MJ /kg KM)}=2,20+0,136 \times G\ddot{U}+0,057 \times HP$$

$$OMS \text{ (g/kg KM)}=14,88+0,889 \times G\ddot{U}+0,45 \times HP+0,0651 \times K\ddot{u}l$$

$$G\ddot{U}=24 \text{ saatlik net gaz üretimi (ml/200 mg).}$$

$$HP=\text{Ham protein (g/kg KM)}$$

$$K\ddot{u}l=K\ddot{u}l \text{ içeriği (g/kg KM)}$$

İstatistiksel analiz

İstatistik analiz SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel önemlilik Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Çalışmada rumen sıvısına ilave edilen formik asitin artan düzeylerinin etkisini belirlemek için Tek Yönlü ANOVA yapılırken polinomial kontrast açısından linear, quadratik ve kübik etkiler saptanmıştır. Önemlilik belirlendiğinde "Duncan's Multiple Range Test" uygulanmıştır. İstatistiksel önemlilik olarak 0,05 altındaki (P<0,05) değerler alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Çalışmada kullanılan yonca kuru otunun ham besin madde içeriği Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 Yonca kuru otunun ham besin madde içeriği

Ham besin madde	İçerik
KM (%)	94,92
Kül (% KM)	8,57
HP (% KM)	16,50
HY (% KM)	1,51
HS (% KM)	32,11
NDF (% KM)	43,32
ADF (% KM)	39,98
ADL (% KM)	10,90

Avrupa Birliği Yem Katkıları Listesi'nde koruyucu, antimikrobiyal ve aroma verici yem katkıları olarak yer alan formik asitin (E 236) çiftlik hayvanlarının rasyonlarına 10 g/kg düzeyine kadar katılması önerilmektedir (EFSA, 2014). Aynı zamanda hasılların silolanmasında laktik asit fermentasyonunu stimüle edip bütirik asit üretimini inhibe ettiği, silajın protein düzeyine olumlu etki ettiği ve formik asit kullanılarak yapılan silajları tüketen sığırların süt verimlerinin olumlu etkilendiği için hem araştırmalarda hem de sahada yaygın olarak kullanılmaktadır (Baytok ve ark., 2004; Jaakkola ve ark., 2006; Rowghani ve Zamiri, 2009; EFSA, 2014). Formik asit bu olumlu etkileri nedeniyle tercih edilen bir yem katkı maddesi olması yanında rumendeki metanın prekürsörü olarak metan salınımına ve iklim değişikliğine olabilecek olumsuz etkisi göz ardı edilmiştir. Çalışmada ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan bir kaba yem olan yonca kuru otunun in vitro ruminal fermentasyonu üzerine formik asitin artan dozlarına bağlı olarak metan üretiminin de linear olarak önemli oranda arttığı saptanmıştır (P<0,01). Bu bulgu teorik olarak Johnson ve Johnson (1995) formik asitin ruminal asetik asit üretimini artırması yani metan üretimi için metil

grubu ve hidrojen sağlayıcı olması gibi nedenlerle metan emisyonunu arttırma potansiyeline sahip olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmada formik asitin *in vitro* metan üretimini %17'den %20'e kadar arttırdığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda formik asitin aksine malik ve fumarik asit gibi organik asitler enterik metan üretimini azalttığı belirlenmiştir (Tejido ve ark, 2005; Lopez ve ark, 1999; Ok ve ark, 2012). Malik ve fumarik asit gibi organik asitlerin ruminal metan üretimini azaltıcı etkisi bu asitlerin UYA'lerinden propiyonik asit oranını arttırmasıyla ilişkilendirilmektedir. Ancak formik asit propiyonik asit üretimini arttırıcı etkisi olmayıp, metan prekürsörü olabilen asetik asit oranını arttırdığı bildirilmektedir (Johnson ve Johnson, 1995; Lopez ve ark, 1999; Tejido ve ark, 2005; Ok ve ark, 2012).

Çalışmada formik asitin düşük dozda ilavelerinin (0,1 ve 0,2 ml/L rumen sıvısı) *in vitro* metan üretimini arttırıp toplam gaz üretimini azaltması CO₂ üreten mikroorganizmalar veya bu mikroorganizmaların substratları üzerine olabilecek olumsuz etkisiyle ilişkili olabilir. Formik asitin orta düzeyde ilavelerinin de (0,3 ve 0,4 ml/L rumen sıvısı) metan üretiminin artmasına karşılık (toplam gaz – metan = CO₂ ve az miktarda diğer gazlar) CO₂ üretimi artmaya başlamış ve total gaz üretimi açısından kontrol grubundan farklı olmadığı görülmektedir. Fakat formik asitin yüksek düzeyinin (0,5 ml/L rumen sıvısı) hem *in vitro* metan hem de toplam gaz üretimini arttırdığı görülmektedir. Yoncanın ME ve OMS, *in vitro* toplam gaz üretimindeki değişimlerle paralel

olarak değişmiştir. Çalışmada ME ve OMS, formik asitin dozuna bağlı olarak düşük dozdaki formik asit ile azalmış, buna karşın yüksek dozdaki formik asit ile artmıştır. Sunulan çalışmada formik asitin 0,5 ml/L düzeyinde ilavesi yoncanın *in vitro* OMS'ni olumlu düzeyde arttırması, Nagel ve Broderick (1992)'in yonca silajına formik asit ilave edilerek yapılan *in vivo* süt sığırları çalışma sonuçlarıyla benzerdir. Formik asit gibi organik asit olan disodyum malat ve disodyum fumarat ile yapılan çalışmalarda *in vitro* toplam gaz üretiminin arttığı bildirilmiştir (Carro ve Ranilla, 2003; Tejido ve ark, 2005).

Formik asit güvenli bir yem katkı maddesi olarak antibakteriyel, aroma verici ve silajda fermentasyonu arttırıcı niteliğinden dolayı kullanılmaktadır. Rumen sıvısına ilave edilen formik asitin artan düzeyleri yonca kuru otunun *in vitro* toplam gaz, ME ve OMS'ni linear, quadratik ve kübik kontrastta önemli düzeyde değiştirdi (P ≤0,001). Görülmüştür ki, formik asitin ilave edilen tüm dozları yoncanın *in vitro* metan üretimini arttırdığı, düşük (0,1 ml/L ve 0,2 ml/L) dozlarının yonca kuru otunun *in vitro* toplam gaz, ME ve OMS'ni azalttığı, orta dozlarının (0,3 ml/L ve 0,4 ml/L) yonca kuru otunun *in vitro* toplam gaz, ME ve OMS düzeyini değiştirmedığı, yüksek dozunun (0,5 ml/L) ise bu parametreleri önemli düzeyde arttırdığı ortaya konulmuştur. Genel olarak değerlendirme yapıldığında formik asitin yüksek dozlarının sindirilebilirliği olumlu etkilemesine karşın tüm dozların metan salınımı arttırdığı sonucu çıkarılmıştır.

Tablo 2 Yonca kuru otunun rumende 24 saat'lik *in vitro* fermentasyonu üzerine formik asitin etkisi

Gruplar	Toplam gaz üretimi (ml/0,2 g)	Metan üretimi (%)	ME (MJ/kg)	OMS (%)	pH	
YF0	37,37 ^{bc}	17,23 ^b	8,22 ^{bc}	56,08 ^{bc}	6,98	
YF1	24,63 ^e	19,00 ^{ab}	6,49 ^e	44,77 ^e	6,94	
YF2	30,76 ^d	19,80 ^a	7,32 ^d	50,21 ^d	6,99	
YF3	34,96 ^c	19,83 ^a	7,89 ^c	53,94 ^c	7,00	
YF4	39,85 ^b	20,10 ^a	8,56 ^b	58,29 ^b	7,00	
YF5	46,07 ^a	20,66 ^a	9,40 ^a	63,82 ^a	6,99	
SH	1,69	0,34	0,23	1,50	0,01	
Kontrastlar P değerleri	Linear	<0,001***	0,003**	<0,001***	<0,001***	0,356
	Quadratik	<0,001***	0,147	<0,001***	<0,001***	0,827
	Kübik	0,001***	0,252	0,001***	0,001***	0,328

YF0: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,0 ml/L formik asit; YF1: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,1 ml/L formik asit; YF2: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,2 ml/L formik asit; YF3: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,3 ml/L formik asit; YF4: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,4 ml/L formik asit; YF5: Yonca kuru otu + rumen sıvısına 0,5 ml/L formik asit; SH: Ortalamaların standart hatası; **: P <0,01; ***: P ≤0,001

Sonuç

Bu çalışmada ticari yem katkısı olarak kullanılan formik asitin yüksek dozunun *in vitro* şartlarda yonca kuru otunun ME ve OMS'ine olumlu etkisi olsa da sera gazlarını arttıran olumsuz etkisinden dolayı yem katkısı olarak sınırlı düzeyde kullanılmalı ve konsantr yemlerle silaj gibi diğer kaba yemlerde de metan üretimine etkisini ortaya koyan araştırmalar yapılmalıdır. Aynı zamanda metan üretimini azaltan malik ve fumarik asit gibi organik asitlerle birlikte kullanımının ruminal fermentasyona etkisinin *in vivo* çalışmalarda ve saha şartlarında araştırılması önerilmektedir.

Teşekkür

Çalışmamızdaki Amasil85 liquid (BASF The Chemical Company) formik asit yem katkı maddesini sağlayan Cem SOYTÜRK'e (Sinerji Tarım Ltd. Şti/İzmir) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
 Baytok E, Aksu T, Karlı MA, Muruz H. 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. Turk J. Vet. Anim. Sci., 29: 469-474.

- Blümmel M, Makkar HPS, Becker K. 1997. In vitro gas production- a technique revised. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 77: 24-34.
- Broucek J. 2014. Methods of methane measurement in ruminants. *Slovak J. Anim. Sci.*, 47(1): 51-60.
- Carro MD, Ranilla MJ. 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen microorganisms *in vitro*. *Br. J. Nutr.*, 90: 617-623.
- Charmley E, Stephenson ML, Kennedy PM. 2008. Predicting livestock productivity and methane emissions in northern Australia: development of a bio-economic modelling approach. *Aust. J. Exp. Agr.*, 48: 109-113.
- Chen YH, Wang SY, Hsu JC. 2009. *In vivo* methane production from formic and acetic acids in the gastrointestinal tract of *White Roman Geese*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 22(7): 1043-1047.
- Djordjevic N, Grubic G, Popovic Z. 2005. Effects of the use of formic acid in different doses as the conservant in lucerne ensiling. *J. Agr. Sci.*, 50: 123-129.
- Ellis JL, Kebreab E, Odongo NE, McBride BW, Okine EK, France J. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *J. Dairy Sci.*, 90(7): 3456-3467.
- EFSA. 2014. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the safety and efficacy of formic acid when used as a technological additive for all animal species. *EFSA Journal*, 12: 1-16.
- Hetta M, Cone JW, Gustavsson AM, Martinsson K. 2003. The effect of additives in silages of pure timothy and timothy mixed with red clover on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Grass Forage Sci.*, 58: 249-257.
- Hook SE, Wright ADG, McBride BW. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 1-11.
- Hungate RE, Smith W, Bauchop T, Yu I, Rabinowitz JC. 1970. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J. Bacteriol.*, 102: 389-397.
- Jaakkola S, Rinne M, Heikkilä T. 2006. Effects of restriction of silage fermentation with formic acid on milk production. *Agr. Food Sci.*, 15(3): 200-218.
- Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*, 73: 2483-2492.
- Lassey KR, Ulyatt MJ, Martin RJ, Walker CF, Shelton ID. 1997. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmos. Environ.*, 31(18): 2905-2914.
- Lockyer DR, Jarvis SC. 1995. The measurement of methane losses from grazing animals. *Environ. Pollut.*, 90:383-390.
- Lopez, S., Valdes, C., Newbold, C.J., Wallace, R.J., 1999. Influence of sodium fumarate on rumen fermentation *in vitro*. *Br. J. Nutr.*, 81: 59-64.
- Lorenzo BF, O'Kiely P. 2008. Alternatives to formic acid as a grass silage additive under two contrasting ensilability conditions. *Irish J. Agr. Food Res.*, 47: 135-149.
- McMichael AJ, Powles JW, Butler CD, Uauy R. 2007. Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet*, 370: 1253-1263.
- Menke HH, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-55.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agr. Sci.*, 93: 217-222.
- Monteny GJ, Bannink A, Chadwick D. 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 112: 163-170.
- Nagel SA, Broderick GA. 1992. Effect of formic acid or formaldehyde treatment of alfalfa silage on nutrient utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 75(1): 140-154.
- Ok JU, Ha DU, Lee SJ, Kim ET, Lee SS, Oh YK, Kim KH, Lee SS. 2012. Effects of organic acids on *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane emission. *J. Life Sci.*, 22: 1324-1329.
- Rowghani E, Zamiri MJ, Seradj AR. 2008. The chemical composition, rumen degradability, *in vitro* gas production, energy content and digestibility of olive cake ensiled with additives. *Iranian J. Vet. Res.*, 9(3): 213-221.
- Rowghani E, Zamiri MJ. 2009. The effects of a microbial inoculant and formic acid as silage additives on chemical composition, ruminal degradability and nutrient digestibility of corn silage in sheep. *Iranian J. Vet. Res.*, 10(2): 110-118.
- Tejido ML, Ranilla MJ, Garcia-Martinez R, Carro MD. 2005. *In vitro* microbial growth and rumen fermentation of different substrates as affected by the addition of disodium malate. *J. Anim. Sci.*, 81: 31-38.
- Vale MM, Menten JFM, Daroz De Morais SC, Brainer MMA. 2004. Mixture of formic and propionic acid as additives in broiler feeds. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61(4): 371-375.
- Van-Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597.