

OZET

SİLAJ AŞILARININ STABİLİTESİ VE SİLAJIN AEROBİK STABİLİTESİNİ ARTTIRMAK İÇİN USULLER

5 Bu açıklama silaja ilişkindir. Daha spesifik olarak silaj aşılarna (inokülan) ve silaj aşılarnı, silajın aerobik stabilitesini arttırmak için kullanma usullerine ilişkindir.

İSTEMLER

1. *Lactobacillus hilgardii*'nin silaj korumak için etkili bir miktarını içeren bir silaj aşısı.
2. İstem 1'e uygun silaj aşısı olup, burada *Lactobacillus hilgardii*, 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL51 ve 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL52
5 veya bunların genetik eşdeğerlerinin en az biridir.
3. Silajı işlemiden geçirmek için bir usul olup, silaja *Lactobacillus hilgardii*'nin silajı korumak için etkili bir miktarını içeren bir silaj aşısının ilave edilmesini içerir, silaj aşısı aerobik bozulmayı önlemek veya azaltmak için etkilidir.
4. İstem 3'e uygun usul olup, burada *Lactobacillus hilgardii*, 26 Haziran 2013'te kayda
10 geçirilen CNCM I-4784 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL51 ve 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL52 veya bunların genetik eşdeğerlerinin en az biridir.
5. İstem 3 veya 4'e uygun usul olup, burada silaj geleneksel ot, mısır, yonca, solmuş ot, tahıl ürünü veya şeker kamışı silajıdır.
- 15 6. İstem 3 ila 5'in herhangi birine uygun usul olup, burada silaj, bir balya, bir torba, bir sandık, bir çubuk silo veya bir silo halindedir.
7. *Lactobacillus hilgardii*'nin silaj korumak için etkili bir miktarını içeren bir silaj.
8. İstem 7'nin silajı olup, burada *Lactobacillus hilgardii*, 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL51 ve 26 Haziran 2013'te
20 kayda geçirilen CNCM I-4785 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL52 veya bunların genetik eşdeğerlerinin en az biridir.
9. 26 Haziran 2013'te CNCM I-4784 erişim numarasıyla kayda geçirilen, izole edilmiş bir *Lactobacillus hilgardii* suşu olan suş SIL 51 veya bunun genetik eşdeğerleri.
10. 26 Haziran 2013'te CNCM I-4785 erişim numarasıyla kayda geçirilen, izole edilmiş bir
25 *Lactobacillus hilgardii* suşu olan suş SIL 52 veya bunun genetik eşdeğerleri.

TARİFNAME

SİLAJ AŞILARININ STABİLİTESİ VE SİLAJIN AEROBİK STABİLİTESİNİ ARTTIRMAK İÇİN USULLER

5 Bu açıklama silaja ilişkindir. Daha spesifik olarak silaj aşılarna (inokülant) ve silaj aşılarını, silajın aerobik stabilitesini arttırmak için kullanma usullerine ilişkindir.

Silaj, geniş getirenlere, örneğin sığır ve koyun gibi, besinleri çiğneyen hayvanlara verilen mayalanmış, yüksek nem içerikli yemdir. Silaj mayalanır ve silolama denilen bir işlemle bir depolama silosunda depolanır. Silaj çoğu kez karaçayır, adi yonca, çayır otu, mısır veya süpürge darısı da dâhil olmak üzere ot veya tahıl ürünlerinden yapılır. Silaj bitkinin 10 tamamından veya bir kısmından yapılır. Silaj şeker kamışı da dâhil olmak üzere birçok başka tarla ürününden de yapılabilir ve bu durumda bazen yulaf için “oatlage”, adi yonca için haylaj gibi başka adlar kullanılır. Bazen yulaf ve bezelye karışımı gibi bir karışım kullanılır.

Silaj üretimi ve ilişkili ürün yetiştiriciliği son yıllarda birçok farklı işlemin tanımlanabileceği bir derecede gelişti. Bunlar (i) kuru madde oranı özellikle düşük, örneğin %25’in altında olan 15 genç otun silolanması; (ii) yüksek kuru madde içerikli, daha olgun otların silolanması veya soldurma yoluyla elde edilen, yüksek kuru madde içerikli, ama genç otun silolanması; ve (iii) yaklaşık %35 kuru madde konsantrasyonunda, sap ve koçan da dâhil olmak üzere tam mısırın ve %45-50 kuru madde içeriğine sahip tam tahıl ürünlerinin, örneğin buğdayın silolanmasıdır.

Bu işlemler genellikle iyi bir verime yol açmakla birlikte, problemleri de vardır. Özellikle (ii) 20 ve (iii)’te, önemli bir problem düzenli olarak ortaya çıkar. Bu aerobik bozulma olarak bilinen olgudur. Aerobik bozulma süreci silo açıldığında, malzeme havaya maruz kaldığı zaman oluşur. Spesifik evrelere ayrılabilir. İlk olarak, mayaların ve bazen asetik asit bakterilerinin koruyucu organik asitleri solumaya başlayıp, silaj pH’sini yükselttiği ve sıcaklığın artmaya başladığı bir başlangıç evresi vardır. pH’deki bir ilk yükselişin ardından, basil aktivitesinin 25 görünür olduğu ve artan sıcaklıkla ilişkili olduğu ikinci bir evre gelir. Başka bir evre mantarlar da dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların aktivitesini içerir.

Kuru madde içeriği fazla, yani %30’un üzerinde olan silajlarda, bozulma problemi özellikle vahimdir. Bir silaj kelepçesi açılır ve silaj havaya maruz kalır kalmaz bozulma az ya da çok görülür.

30 Bakteriyel aşılarda gibi biyolojik katkı maddeleri silaj işlemini geliştirmek, öncelikle laktik asit üretim seviyesini ve hızını arttırmak ve aerobik bozulmaya karşı koruma sağlamak için

yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Mann ve diğerlerine verilen ABD Patenti No. 6,326,037’de bu durumu iyileştirmek için usuller ve bileşimler sunulmaktadır. Özellikle, aerobik bozulma sürecinin teşhisinin en azından kısmen, hava girişine maruziyet üzerine kelepçedeki ısımayla çok ilişkili olduğu açıklanmaktadır. Bu silajların daha sonra incelenmesi basiller, mayalar ve küfler de dâhil olmak üzere termofilik Gram-pozitif bakterilerin yüksek konsantrasyonunu gösterdi. Bu görünüşe göre, gübreleşmeye benzer ikincil bir mayalanmanın (birincil mayalanma silolanma süreci olmak üzere) başladığını ortaya koyar. Bu mayalanma evresinde, maya ve küfler baskındır. Bozulmayı önlemek için, öldürülmesi veya baskılanması gereken organizmaların üç ana kategorisinin spor oluşturuvcu bakteriler, mayalar ve mantarlar olduğu anlaşılmaktadır. Tek bir kategorinin elimine edilmesi geri kalan kategorilerin çoğalmasına yol açabilir, dolayısıyla bozulma önlenmez.

Dolayısıyla Mann, en azından ilk başta aerobik bozulmayı başlatan mikroorganizmaları, özellikle silajın yüzeyinde mayaları ve mantarları inhibe eden organizmaları kullanarak bozulmanın önlenmesini açıklamaktadır. Bunu yapabilen bir organizma bozulmaya yol açan başka mikroorganizmaların gelişimini de inhibe edebilir ve taramayla teşhis edilebilir. Bu koşulu karşılayan türde bir organizma olan *Lactobacillus buchneri* 13 Şubat 1996’da Sanayi ve Deniz Bakterileri Ulusal Koleksiyonuna tevdi edilmiştir. Erişim numarası 40788’dir.

Lactobacillus buchneri’nin kullanıldığı işlemler silajda bozulmayı azaltmakla birlikte bunu sadece sınırlı bir düzeyde yapmaktadır. Dolayısıyla, geliştirilmiş bir silaj işlemine, özellikle geri kazanılan kuru madde miktarını arttırırken silajın aerobik stabilitesini geliştirmek için bir işleme hâlâ ihtiyaç vardır.

AÇIKLAMANIN ÖZETİ

Bir yönde silajı işlemenden geçirmek için bir usul sunulmaktadır. Usul silaja *Lactobacillus hilgardii*’nin koruma için etkili bir miktarını içeren bir silaj aşısı ilave edilmesini içerir. Silaj aşısı aerobik bozulmayı önlemek veya azaltmak için etkilidir.

Başka bir yönde, silajı korumak için etkili bir miktarda *Lactobacillus hilgardii* içeren bir silaj aşısı sunulmaktadır.

Silaj aşısının bir yönünde, silaj aşısı ayrıca bir taşıyıcı içerir.

Başka bir yönde, silajı korumak için etkili bir miktarda *Lactobacillus hilgardii* içeren bir silaj sunulmaktadır.

Usulün bir yönünde, silaj aşısı ve silajda, *Lactobacillus hilgardii* 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii*, suş SIL51 ve 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen I-4785 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL52 veya bunların genetik eşdeğerlerinin en az biridir. Sözü edilen suşlar Lallemend SAS 19 rue des Biquettiers, 31702 Blagnac Cedex, Fransa'ya tevdi edilmiştir.

Usulün bir yönünde, silaj aşısı ayrıca bir taşıyıcı içerir.

Yine başka bir yönde, 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen I-4784 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL 51'in veya bunun genetik eşdeğerlerinin izole edilmiş bir suşu sunulmaktadır.

10 Başka bir yönde, 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen I-4785 erişim numaralı *Lactobacillus hilgardii* suşu SIL 52'nin veya bunun genetik eşdeğerlerinin izole edilmiş bir suşu sunulmaktadır.

AYRINTILI AÇIKLAMA

15 Bu açıklamaya göre, silolanmış yemin aerobik stabilitesini arttıran laktik asit bakterileri izole edildi ve saflaştırıldı. Daha spesifik olarak *Lactobacillus hilgardii*'nin silajın aerobik stabilitesini arttırdığı gösterildi. Ayrıca, silaja aşılandığında, *Lactobacillus hilgardii* suşları, iyi korunmuş ve aerobik bozulma ve ısınmayla ilişkili ikincil mayalanmanın başlamasının azaltıldığı veya önlendiği bir silaj üretmektedir.

20 Bu açıklamanın suşları şeker kamışı (*Saccharum türü*) silajından izole edildi. Suşların saflaştırılmasının ve izolasyonunun ardından, suşları teşhis etmek için taksonomik çalışmalar yapıldı. Bunların ikisi *Lactobacillus hilgardii* olarak tanımlandı ve prototip numarası SIL51 ve SIL52 verildi.

Dolayısıyla bu açıklama silajın aerobik stabilitesini arttırmak için silaj aşısı ve silaj aşısını kullanma usulünü sunmaktadır.

25 Burada "silajı korumak için etkili miktar" teriminin, en azından silajı korumak için yeterli olan bir miktarı belirtmek için kullanıldığı takdir edilecektir. Dolayısıyla miktar en azından silajın stabilitesini arttırmak için yeterlidir, ama tercihen geri kazanılan kuru madde miktarını arttırırken silajın stabilitesini arttırmak için yeterli bir miktardır.

30 Burada "aerobik stabilite" terimi kullanıldığında, silajın sıcaklığının çevre sıcaklığının 2°C'den fazla üzerine çıkmadan önce sabit kaldığı saat sayısını belirttiği takdir edilecektir.

Şimdi burada açıklanan düzenlemelere referansta bulunulacaktır. Bununla, açıklamanın çerçevesine herhangi bir sınırlama getirilmesinin amaçlanmadığı anlaşılmalıdır. Ayrıca bu açıklamanın, sunulan düzenlemelerdeki değişiklikleri ve modifikasyonları içerdiği ve açıklamanın ilgili olduğu alanda uzman olanların normal olarak takdir edeceği gibi

5 açıklamanın ilkelerinin başka uygulamalarını içerdiği anlaşılmalıdır.

Bir düzenlemede, silajı işlemekten geçirmek için bir usul sunulmaktadır. Usul silaja, *Lactobacillus hilgardii*'nin silajı korumak için etkili bir miktarını içeren bir silaj aşısının ilave edilmesi aşamasını içerir. Silaj aşısı aerobik bozulmayı önlemek veya azaltmak için etkilidir.

Ayrıca en az bir *Lactobacillus hilgardii* suşu içeren bir silaj aşısı sunulmaktadır. Daha

10 spesifik olarak, silaj aşısı *Lactobacillus hilgardii* türünün silajı korumak için etkili bir miktarını içerir.

Yukarıda açıklanan usulün ve silaj aşılarının bir düzenlemesinde, *Lactobacillus hilgardii* suşu 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen izole edilmiş *Lactobacillus hilgardii* suşu CNCM I-4784 (SIL51), 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen izole edilmiş *Lactobacillus hilgardii* suşu

15 CNCM I-4785 (SIL52) veya bunların genetik eşdeğerleri olabilir. 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784 suşu (SIL51) ve 26 Ocak 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785 suşunun (SIL52), burada açıklandığı gibi yemin aerobik stabilitesini arttırmaya yönelik işlevsel aktivitesini koruyan mutantlarının veya genetik eşdeğerlerinin de düşünüldüğü takdir edilecektir.

20 Mutasyonların veya genetik eşdeğerlerin oluşturulma biçiminden bağımsız olarak, kritik mesele ana tür ve/veya suş için açıklandığı gibi silajın aerobik stabilitesini artırma işlevini yerine getirmeleridir. Başka bir deyişle, bu açıklama küçük taksonomik değişiklikler gibi küçük değişikliklerle sonuçlanan mutasyonları kapsamaktadır.

Bu açıklamaya uygun silaj aşıları sıvı veya katı formda olabilir ve başka bakteri suşları

25 içerebilir. Bu açıklamaya uygun silaj aşıları uygun bir taşıyıcı içerebilir veya olduğu gibi kullanılabilir. Katı formda silaj aşısı katı taşıyıcı içerebilir. Uygun taşıyıcı sulu veya susuz sıvı formunda veya katı formda olabilir. Sulu veya susuz sıvı formda taşıyıcı örnekleri arasında su, yağlar ve parafinler yer alır. Katı formdaki taşıyıcı örnekleri arasında örneğin maltodekstrin, nişastalar, kalsiyum karbonat, selüloz, peynir altı suyu, öğütülmüş mısır koçanları ve silikon

30 dioksit gibi organik veya inorganik taşıyıcılar yer alır. Katı bileşim yeme doğrudan ince toz halinde serpilerek uygulanabilir veya bir sıvı taşıyıcı içinde dağıtılırsa yem üzerine başarıyla

püskürtülebilir. Bu açıklamanın amaçları için uygun herhangi bir başka taşıyıcının kullanılabileceği takdir edilecektir.

İnhibitör maddenin ikincil bir metabolit olabileceği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla silajda kullanıldığında, silaj çok erken açılırsa tam etkisi görülmeyebilir. Silaj tercihen en az 30 gün ve daha tercihen en az 45 gün kapalı tutulur. Optimum süreler diğer şeylerin yanı sıra silaj kütlesinin büyüklüğüne ve silolanan malzemenin yapısına bağlı olabilir.

Bu açıklamaya göre silolama için uygun olan malzemeler aerobik bozulmaya yatkın olanlardır. Malzemeler genellikle ağırlıkça en az %20 kuru madde içerir. Bu malzemeler arasında örneğin çavdar veya geleneksel ot, mısır, örneğin yüksek nem içerikli mısır, tam mısır bitkisi, yonca, solmuş ot, buğday, baklagiller, süpürge darısı, ayçiçeği, arpa, başka tam tahıl ürünleri ve şeker kamışı gibi başka tarla ürünleri yer alır. Silaj balyalar (aerobik bozulmaya özellikle açık bir form), oksijen sınırlayıcı torbalar, sandıklar, dik çubuk silolar, oksijen sınırlayıcı silolar, torbalar, öbekler halinde veya aerobik bozulmaya açık olabilen herhangi bir başka uygun depolama formunda olabilir. Bir düzenlemede, bu açıklamanın silaj aşısı, domuzlar, kümes hayvanları veya geviş getirenler gibi hayvanları besleme amacıyla, katı veya sıvı, herhangi bir uygun hayvan yeminde kullanılabilir.

Aşağıdaki örnekler buluşu daha ayrıntılı olarak açıklamaya ve tanımlamaya yönelik olup buluşu herhangi bir şekilde sınırlandırmayı amaçlamamaktadır.

ORNEKLER

Ornek 1:

Silaj yaklaşık olarak 12 aylık bitkilerden taze kesilen şeker kamışıyla yapıldı. Şeker kamışı elle toplandı ve laboratuvar tipi bir kıyıcı (Pinheiro, model: PP-47) kullanılarak yaklaşık olarak 30 mm uzunluğunda kıyıldı. 3 kg kıyılmış malzeme aşılarla karıştırıldı ve gazı serbest bırakmak için Bunsen valfleri içeren sıkı kapaklarla kapatılmış PVA plastik kaplarda (mini silolar, 10 cm çap ve 60 cm uzunluk) koşullandırıldı. Silodaki malzeme yaklaşık 630 ± 19.9 kg m⁻³ yoğunluğunda sıkıştırıldı. Mini silolar oda sıcaklığında saklandı ve 61 gün depolamadan sonra analiz edildi ve her silo için üç kopya hazırlandı.

Silaj, aşılar olarak *Lactobacillus plantarum* SIL 34 (*L. plantarum* silaj aşısı olarak yaygın bir şekilde kullanılır) ve *Lactobacillus hilgardii* suşları SIL 51 (26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784) ve SIL 52 (26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785) kullanılarak üretildi. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus hilgardii* suşları şeker kamışı

silajından izole edildi ve %98 dizi özdeşliği belirlendi. Herhangi bir aşı içermeyen silaj bir kontrol olarak kullanıldı. Aşılar Avila ve diğerlerine (Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage, Grass Forage Sci 6:384-394, 2009) göre kültürlendi. Nihai kültürün ardından, hücre sayısı De Man Rogosa

- 5 Sharpe agar (Oxoid CM361, Basingstoke, Hampshire, İngiltere) üzerinde sayıldı ve kültürün konsantrasyonu 9 log cfu ml⁻¹'e ayarlandı. Kültür 80 mL steril damıtılmış suyla karıştırıldı ve kıyılmış şeker kamışı üzerine 6 log cfu g⁻¹ ot nihai konsantrasyonunda püskürtüldü. Kontrole herhangi bir bakteri içermeyen aynı miktarda su verildi. Çapraz kontaminasyonu önlemek için her işlem için ayrı bir püskürtücü kullanıldı.
- 10 Boş ve dolu siloların ağırlıkları kaydedildi. Kapatıldıktan sonra, silolar oda sıcaklığında (ortalama 25°C) tutuldu ve güneş ışığı ve yağmurdan korundu. 61 gün silolandıktan sonra, dolu silolar açılmadan önce tartıldı. Kuru madde (DM) kaybı taze yem ve silajın ağırlığı ve DM içeriği kullanılarak hesaplandı.

Lactobacillus plantarum'la (SIL 34) aşılama, diğer suşlarla ve kontrole karşılaştırıldığında

- 15 daha düşük bir DM içeriği, daha yüksek bir DM kaybı ve daha yüksek bir NDF ile sonuçlandı. *Lactobacillus hilgardii* suşları SIL51 ve SIL52'yle aşılamanın silajda, SIL34'le ve kontrole karşılaştırıldığında daha düşük DM kayıpları tespit edildi (Tablo 1). Bu aynı suşlarla aşılama ayrıca daha yüksek bir DM içeriğine ve daha düşük NDF'ye sahip bir silajla sonuçlandı. Aşılar silajın pH değerini ve çözünür karbonhidrat içeriğini etkilemedi.

- 20 **Tablo 1.** Aşılar olmadan ve farklı aşılarla 61 gün silolamanın ardından şeker kamışı silajlarının kimyasal bileşimi

Silaj işlemleri	DM ^b (g kg ⁻¹ FM ^c)	Kayıplar DM (%)	NDFd WSCe	pH	LABf Mayalar
			(g kg ⁻¹ DM)		Log cfu. g ⁻¹
kontrol	246,2b	22,61a	617.9b 25.3	3,60	8,16a 5,38b
SIL 34	241.3b	26.49a	676.9a 24.6	3.64	6.93b 5.08a
SIL 51 26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784	264.8a	14.90b	598.0b 23.4	3.61	8.36a 4.61b

SIL 52	259.6a	15.39b	616.7b	3.66	8.40a
26 Haziran			21.1		4.83b
2013'te kayda					
geçirilen					
CNCM I-4785					

b: Kuru madde içeriği; c: Taze madde; d: nötr deterjan lifi; e: suda çözünür karbonhidratlar; f: laktik asit bakterileri.

Bir sütunda farklı harflerle belirtilen ortalama değerler anlamlı olarak farklıdır ($p<0.05$)

Analitik prosedürler:

- 5 Açılış günü, her mini silodan iki numune alındı ve mini silonun bütün içeriği homojenize edildi. Numunelerden biri tartıldı ve 96 saat fan destekli bir fırında 55°C'de kurutuldu; başka bir numune pH değerini belirlemek, mikrobiyal popülasyonu değerlendirmek ve mayalanma nihai ürünlerini saptamak için bir su ekstraktı hazırlamak için kullanıldı.

- 10 Kurutulmuş numuneler 30 numaralı elek kullanılarak Willey tipi bir öğütücüde öğütüldü ve etiketlenmiş plastik kaplarda saklandı. Numuneler DM içeriği (AOAC (1990) Official methods of analyses. 15. basım. Washington, DC, ABD: Resmi Analitik Kimyagerler Birliği), fenol usulüyle (Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28:350-356.) suda çözünür karbonhidratlar (WSC) ve bir Ankom Fiber Analizör (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, ABD) kullanılarak Holden (Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten 565 feeds. J Dairy Sci 82:1791-1794; 1999) tarafından açıklandığı gibi nötr deterjan lifi (NDF) açısından analiz edildi ve bir DM temelinde ifade edildi.

- 20 Etanol, 1,2-propandiol ve laktik, asetik, propionik ve bütirik asit seviyeleri Carvalho ve diğerlerine (Effects of propionic acid and Lactobacillus buchneri (SIL72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with or without calcium oxide. Grass Forage Sci doi: 10.1111/j. 1365-2494.2012.00863.x) göre HPLC ile ölçüldü. Asitler, etanol ve 1,2-propandiol alıkonma süreleri, bilinen standartların alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak belirlendi. Tanımlanan bileşiklerin konsantrasyonları dışsal kalibrasyon usulüyle belirlendi. HPLC tertibatı (Shimadzu model LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tokyo, Japonya) bir ultraviyole detektör (UV-VisSPD-10Ai) ve bir kırılma indeksi detektöründen (RID 10A) oluşan ikili bir saptama sistemiyle teçhiz edildi. Kromatografik

ayırma için 50°C’de çalışan Shimadzu’dan bir iyon dışlama kolonu (Shim-pack SCR-101H; 7.9 mm X 30 cm) kullanıldı. Hareketli faz 0.6 mL dakika-1 akış hızıyla 100 mM perklorik asit çözeltisinden oluşuyordu. Asitler UV absorbansı (210 nm) saptandı. Etanol ve 1,2-propandiol kırılma indeksi detektörü kullanılarak belirlendi. pH değerleri bir potansiyometreyle (Expandomatic Beckman SS-2) ölçüldü.

Tablo 2’de gösterildiği gibi, en düşük DM kaybı olan, SIL 51 ve SIL 52 suşlarıyla aşılana silaj, SIL 34 ve kontrolden düşük bir etanol konsantrasyonuna sahipti. En fazla DM kaybı olan silajla sonuçlanan SIL 34 suşu en yüksek miktarda laktik asidi üretti. SIL 51 ve SIL 52 suşlarıyla aşılana silajlarda, SIL 34 ve kontrolle karşılaştırıldığında ayrıca daha yüksek asetik asit ve 1,2-propandiol konsantrasyonları tespit edildi. Propionik asit seviyeleri, SIL 34 ve kontrol silajıyla uyumlu olarak benzer bir şekilde düşüktü.

Tablo 2. Aşılar olmadan ve *Lactobacillus hilgardii* aşılılarıyla birlikte silolamanın 61. gününde şeker kamışı silajlarının laktik, asetik, propionik ve bütirik asitleri ve etanol ve 1,2-propanodiolü

Silaj işlemleri	Laktik Asit (g kg-1 DM)	Asetik Asit (g kg-1 DM)	Propionik Asit (g kg-1 DM)	Bütirik Asit (g kg-1 DM)	Etanol (g kg-1 DM)	1,2-propandiol (g kg-1 DM)
kontrol	46.6a	9.7b	3.1b	0.0b	137.0a	1.7b
SIL34	43.7a	3.3c	6.4a	3.5a	185.8a	0.6c
SIL51 26 Haziran 2013’te kayda geçirilen CNCM I-4784	34.6b	19.7a	4.0b	1.2b	39.9c	3.27 ^a
SIL 52 26 Haziran 2013’te kayda geçirilen CNCM I-4785	31.4b	22.5a	4.1b	1.3b	44.4c	3.98 ^a

Mikrobiyolojik analiz

Taze yem ve 61 gün inkübasyondan sonra şeker kamışı silajı numuneleri (70 g) 630 mL %0.1 steril peptonlu suyla karıştırıldı ve bir orbital karıştırıcıyla 20 dakika 120 devir/dakikada karıştırıldı. Daha sonra farklı mikrobiyal grupların niceliğini belirlemek için 10 kat seyreltiler hazırlandı. Anaerobik inkübasyonun ardından (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, BK) laktik asit bakterileri (LAB) % 0.1 sistein HCl (Merck, Darmstadt, Almanya) ve % 0.4 sikloheksimit (%0.4) (Sigma) içeren MRS agar (De Man Rogosa Sharpe, Difco, Detroit, MI, ABD) kullanılarak sayıldı. Plakalar 48 saat 30°C’de inkübe edildi. Plakalar 72 saat 28°C’de inkübe edildikten sonra maya ve ipliksi mantarlar Dikloran Bengal Gülü Kloramfenikol Ortamında (DRBC, Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) sayıldı. Mikroorganizmaların hepsi için, sadece 30 ve 300 arasında cfu içeren plakalar sayıldı.

Silajların aerobik stabilitesinin değerlendirilmesi

90 gün silolandıktan sonra mini silolar açıldı ve her mini silodan yaklaşık 3 kg’lık üç kopya halindeki numuneler alındı ve aerobik stabiliteyi değerlendirmek için 5 kg’lık plastik kaplara konuldu. Silaj kütlesi içine 7 gün durmak üzere 10 cm derinliğe bir termometre sokuldu. Kaplar 26°C (±1.5°C) kontrollü sıcaklıkta bir odada tutuldu. Silaj sıcaklığı her 8 saatte bir kaydedildi. Çevre sıcaklığı kaplara yakın yerleştirilen bir termometre kullanılarak ölçüldü. Aerobik stabilite, silajın çevre sıcaklığının 2°C üzerini aşan sıcaklığa gelmeden önce stabil kaldığı saat sayısı olarak tanımlandı.

Tablo 3. Aşılar içeren şeker kamışı silajlarının aerobik stabilitesi

Silaj işlemleri	Aerobik stabilite (saatler)	Maksimum sıcaklık (°C)	Maksimum sıcaklığa kadar süre (saatler)
kontrol	21.3±4.6	43.7±0.6	45.3±12.2
SIL 34	24.0±0.0	43.7±1.4	37.3±9.2
SIL 51 26 Haziran 2013’te kayda geçirilen CNCM I-4784	26.7±4.6	44.0±1.0	50.7±9.2
SIL 52 26 Haziran 2013’te kayda geçirilen CNCM I-4785	21.3±4.6	44.3±1.5	48.0±16

Tablo 3'te gösterildiği gibi, kontrol silajının sıcaklığı yaklaşık olarak 21.3 saat stabildi, SIL 51 ve SIL 52 suşlarıyla aşılana silaj ise sıcaklık stabilitesini silonun açılmasından sırasıyla 26.7 ve 21.3 saat sonra kaybetti. Maksimum sıcaklığa ulaşmak için gereken süre hem SIL 51 hem SIL 52 suşları için daha uzundu. Dolayısıyla, SIL 51 ve SIL 52 suşları SIL 34'ün ve kontrol silajının sıcaklık stabilitesine göre üstün sıcaklık stabilitesine sahip bir silaj verdi.

Laktik asit üreten *Lactobacillus plantarum* suşu SIL 34'le aşılana silaj 24 saat sonra sıcaklık stabilitesini kaybetti. Ancak SIL 34 suşu daha yüksek etanol içeriği, daha yüksek maya sayısı ve daha fazla DM kayıpları olan silajla sonuçlandı. SIL 51 ve SIL 52 suşları daha küçük maya popülasyonu, daha düşük etanol içeriği ve daha az DM kayıpları gibi daha iyi silaj özellikleri sağladı.

Örnek 2: Mısır silajlarının aerobik stabilitesi

Mısır silajı Örnek 1'de açıklandığı gibi mikro silolarda, aşılar olarak *Lactobacillus buchneri*, NCIMB 40788 (Mann ve diğerlerine verilen ABD Patenti No. 6,326,037), *Lactobacillus plantarum* SIL 34 ve *Lactobacillus hilgardii* suşları SIL 51 (26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784) ve SIL 52 (26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785) kullanılarak üretildi. Herhangi bir aşı içermeyen silaj bir kontrol olarak kullanıldı. Aşılar Örnek 1'de açıklandığı gibi kültürlendi.

90 gün silolandıktan sonra mini silolar açıldı ve her mini silodan yaklaşık 3 kg'lık numuneler alındı ve aerobik stabiliteyi test etmek için 5 kg'lık plastik kaplara konuldu. Silaj kütlesi içine 7 gün kalmak üzere 10 cm derinliğine bir veri kaydedici sokuldu. Çevre sıcaklığı kaplara yakın yerleştirilen bir veri kaydedici kullanılarak ölçüldü. Silajların aerobik stabilitesine ilişkin veriler Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Aşı içeren mısır silajlarının aerobik stabilitesi

İşlem	Doz cfu/g	Maksimum sıcaklık (°C)		Maksimum sıcaklığa ulaşmak için süre (saat)		Aerobik stabilite (saat)	
		ortalama		ortalama		ortalama	
Kontrol		34.2	34.2	72.3	72.3	42.7	42.7
SIL 34	1	38.0	38	37.2	37.4	21.8	17.4
	2	38.8		37.7		13.0	

SIL 51	1	31.0	30.9	133.1	138.3	73.8	73.0
26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4784	2	30.8		143.5		72.3	5
SIL 52	1	30.8	32.05	132.2	112.3	49.0	53.3
26 Haziran 2013'te kayda geçirilen CNCM I-4785	2	33.3		92.5		57.7	5
NCIMB 40788	1	33.7	33.1	85.5	101.1	42.8	60.5
	2	32.5		116.7		77.7	

Doz 1 = 10^5 cfu/g; 2 = 10^6 cfu/g

Tablo 4'te gösterildiği gibi, kontrol silajının sıcaklığı yaklaşık 42.7 saat stabildi, SIL 51 ve 52 suşlarıyla aşılana silaj ise sıcaklık stabilitesini silonun açılmasından sırasıyla 73.05 ve 53.35 saat sonra kaybetti. SIL 34'le aşılana silaj 17.4 saat stabildi. *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788'le aşılana silaj 60.5 saat stabildi. SIL 51 ve SIL 52 suşları SIL 34'le inoküle edilen silaja ve kontrol silajına göre üstün sıcaklık stabilitesine sahip bir silajla sonuçlandı. SIL 51 ve SIL 52 suşları NCIMB 40788 silajına göre de üstün sıcaklık stabilitesine sahip bir silajla sonuçlanır.

Buluş spesifik düzenlemeleriyle ilişkili olarak açıklanmakla birlikte, başka modifikasyonların da mümkün olduğu ve bu açıklamanın buluşun genel ilkelerine uygun ve buluşun açıklamasından buluşun ilgili olduğu alandaki bilinen veya alışlageldik uygulamalar içine giren ve daha önce açıklanan ve ilişikteki istemlerin çerçevesi içine giren temel özelliklere uygulanabilen ayrılmaları kapsayan çeşitlemeleri, kullanımları veya adaptasyonları içermeye yönelik olduğu takdir edilecektir.