JAUA
Journal of Academic Union Association

FARKLI BİTKİ KAYNAKLI (YONCA, ÇAYIR OTU, MISIR SİLAJI) PRE-FERMENTE SIVI (PFJ) ÖRNEKLERİNDE AKTİF BAKTERİYEL POPÜLASYONUN RNA TEMELLİ 16S RRNA REAL-TİME PCR ANALİZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ahmet ORUÇ[1], Dr. F. Serkan KAPUCUK[2], Dr. S. Serkan AYDIN[3],

Dr. Mehmet Şevki ÇADIRCI[4], Aslı Nur AYDEMİR[5], Ramazan GÜL[6]

1. GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye, Orcid ID: 0000-0003-2139-4929. ahmet.oruc@tarimorman.gov.tr

2. GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye, Orcid ID: 0000-0001-9037-0125. fuatser07@hotmail.com

3. Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Şanlıurfa, Türkiye, Orcid ID: 0000-0002-3252-3944, sadik.aydin@harran.edu.tr

4. Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji , Şanlıurfa, Türkiye Orcid ID: 0000-0002-6311-7578, msevkic@harran edu.tr.

5. Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik, Şanlıurfa, Türkiye, Orcid ID: 0009-0005-4994-6600, aydemirasli15@gmail.com

6. Harran Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye, Orcid ID: 0009-0000-6077-388X, Ramazangul.2076.08@gmail.com

ÖZET

Pre-fermente sıvılar (PFJ), silaj fermantasyonunu optimize etmek amacıyla yaygın biçimde kullanılan doğal biyolojik inokulantlardır. Bu çalışmada, yonca, çayır otu ve mısır silajından üretilen PFJ örneklerindeki aktif bakteriyel popülasyonlar, hücresel metabolik aktiviteyi doğrudan yansıtan RNA temelli 16S rRNA Real-Time PCR (RT-qPCR) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında hazırlanan bitki ekstrelerine fermantasyonun uyarılması için melas ve glikoz ilave edilerek, karışımlar 30 °C'de 5 gün boyunca anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. TRIzol reaktifi ve bead-beating tekniğiyle gerçekleştirilen RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezlenmiş ve SYBR Green tabanlı RT-qPCR analizleri yürütülmüştür. Elde edilen moleküler bulgular, tüm PFJ varyantlarında sigmoid karakterli amplifikasyon eğrileri ve hedef genin özgüllüğünü doğrulayan tekil erime (melting curve) pikleri oluştuğunu göstermiştir. Substrat kompozisyonlarına göre değişkenlik sergileyen eşik döngüsü (Ct) verileri incelendiğinde; özellikle zengin fermente edilebilir karbonhidrat profiline sahip mısır silajından üretilen PFJ örneklerinde laktik asit bakterileri kaynaklı en güçlü mikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Yoncadan elde edilen sıvılarda gözlemlenen nispeten

yüksek Ct değerleri ise ilgili materyalin doğal hücresel tamponlama kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, inaktif veya ölü hücrelerden kaynaklanabilecek analitik yanılgıları bertaraf eden RNA hedefli bu yaklaşımın, fermentatif sistemlerdeki fonksiyonel mikrobiyatanın karakterizasyonunda son derece özgül, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pre-fermente sıvı, RNA, 16S rRNA, aktif mikrobiyota, silaj fermantasyonu, RT-qPCR.

EVALUATION OF THE ACTIVE BACTERIAL POPULATION IN DIFFERENT PLANT-BASED (CLOVER, TIMOTHY GRASS, CORN SILAGE) PRE-FERMENTED LIQUID (PFJ) SAMPLES USING RNA-BASED 16S RRNA REAL-TIME PCR ANALYSIS

ABSTRACT

Pre-fermented juices (PFJs) are natural biological inoculants widely utilized to optimize silage fermentation processes. In this study, the active bacterial populations within PFJ samples produced from alfalfa, meadow grass, and corn silage were evaluated using RNA-based 16S rRNA Real-Time PCR (RT-qPCR) methodology, which directly reflects cellular metabolic activity. To stimulate fermentation, molasses and glucose were added to the prepared plant extracts, and the mixtures were subjected to anaerobic incubation at 30 °C for 5 days. Following total RNA isolation using TRIzol reagent with bead-beating homogenization, cDNA was synthesized and SYBR Green-based RT-qPCR analyses were conducted. The molecular findings demonstrated the generation of sigmoid amplification curves and singular melting curve peaks confirming target gene specificity across all examined PFJ variants. Upon analyzing the cycle threshold (Ct) data, which varied according to substrate compositions, the most intense microbial activity was detected in PFJ samples produced from corn silage due to its highly fermentable carbohydrate profile. Conversely, the relatively higher Ct values observed in alfalfa-derived samples were attributed to the inherent cellular buffering capacity of the material. Consequently, it was demonstrated that this RNA-targeted approach, which eliminates analytical biases caused by inactive or dead cells, serves as a highly specific, sensitive, and reliable method for the functional characterization of the microbiota in fermentative systems.

Keywords: Pre-fermented juice, RNA, 16S rRNA, active microbiota, silage fermentation, RT-qPCR.

1. GİRİŞ

Kaba yem tedariğinin güvence altına alınması ve ruminant beslemesinin yıl boyu kesintisiz sürdürülebilmesinde temel bir strateji olan silaj fermantasyonunun kalitesini maksimize etmek amacıyla, biyolojik inokulantların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Kiraz & Kutlu, 2016; Koç et al., 2019). Bu bağlamda, taze bitki materyallerinden elde edilen özsuyun kısa süreli anaerobik fermantasyona tabi tutulmasıyla hazırlanan pre-fermente sıvılar (PFJ), içerdikleri yüksek orandaki epifitik laktik asit bakterisi (LAB) sayesinde fermantasyon süreçlerinde etkin bir rol üstlenirler (Muck et al., 2018). Silaj fermantasyonu esnasında ortama ilave edilen bu aktif LAB florasının hızlıca çoğalması ve ortam pH'sını ani bir şekilde düşürmesi; bozulmaya yol açan istenmeyen mikroorganizmaların baskılanması ile besin madde kayıplarının azaltılması açısından kritik bir öneme sahiptir (Oruç & Avcı, 2024a, 2024b; Filya, 2003; Kung et al., 2018). Nitekim silaj yapım aşamasında uygulanan PFJ'nin, içerdiği LAB popülasyonu sayesinde laktik asit üretimini artırdığı, anaerobik stabiliteyi geliştirdiği ve fermantasyon kalitesini olumlu yönde etkilediği pek çok çalışmada bildirilmiştir (Denek et al., 2012; Muck et al., 2018).

Bununla birlikte, pre-fermente sıvıların mikrobiyal kompozisyonu tek tip bir profil çizmez; aksine, hammadde olarak kullanılan bitkisel materyale göre önemli biyokimyasal farklılıklar gösterir. Ruminant beslenmesinde yaygın olarak tercih edilen yonca, çayır otu ve mısır silajı gibi kaliteli kaba yem kaynakları; içerdikleri suda çözünebilir karbonhidrat (SÇK) oranları, doğal epifitik mikrofloraları ve tamponlama kapasiteleri bakımından birbirlerinden belirgin şekilde ayrılırlar (Jones, 1991; Pahlow et al., 2003). Söz gelimi, mısır silajı zengin SÇK muhteviyatı sayesinde laktik asit bakterileri için son derece kolay fermente edilebilir bir substrat oluştururken; yüksek protein içeriğine ve güçlü bir hücresel tamponlama kapasitesine sahip olan yonca gibi yem bitkileri, ideal fermantasyon ortamının sağlanması açısından oldukça zor materyaller arasında sınıflandırılmaktadır (Kung et al., 2018; Muck et al., 2018).

Farklı substrat tiplerinin PFJ sistemlerinin fonksiyonel dinamikleri üzerindeki etkilerini tam olarak kavrayabilmek, bu sıvıların barındırdığı mikrobiyal toplulukların doğru bir şekilde tanımlanmasına bağlıdır. Günümüzde çevresel mikrobiyal popülasyonların karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kültür temelli yöntemler, mikroorganizmaların yalnızca belirli bir kısmını tespit edebilmekte ve canlı ile ölü hücre ayrımını sağlamada büyük oranda yetersiz kalmaktadır (Abdulamir et al., 2010). Bu durum, araştırmacıları yüksek duyarlılık ve özgüllük sunarak mikroorganizmaların hızlı bir şekilde teşhis edilmesine olanak tanıyan gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) gibi kültürden bağımsız moleküler tekniklere yöneltmiştir (Herbel et al., 2013). Ne var ki, standart DNA temelli analizlerde hücre ölümü sonrasında bile varlığını koruyabilen DNA moleküllerinin amplifiye olabilmesi, canlı mikroorganizma popülasyonunun gerçek yapısının değerlendirilmesinde ciddi bilimsel sınırlılıklar yaratmaktadır (Dias et al., 2020).

Söz konusu analitik kısıtlamaları aşmanın en güvenilir yolu, hücresel metabolik aktivite ile doğrudan korelasyon gösteren RNA temelli yöntemlerin kullanılmasıdır (Marshall et al., 2021). Ribozomal RNA'nın (rRNA) hedef alındığı analizler, yalnızca metabolik olarak canlı ve aktif mikroorganizmaların saptanmasına imkan tanır(Herbel et al., 2013). Ribozomal RNA'nın DNA'ya göre daha az stabil olması, inaktif veya ölü hücrelerden kaynaklanabilecek yanıltıcı sinyalleri azaltma potansiyeline sahiptir(Marshall et al., 2021). Fermentatif ekosistemlerde *Lactobacillus* spp. gibi bakteriyel topluluklar, fermantasyon kalitesinin ve biyolojik etkinliğin

değerlendirilmesinde önemli bir unsurdur(Daliu et al., 2025). Buna paralel olarak, RNA temelli 16S rRNA RT-qPCR yöntemleri yalnızca mikrobiyal mevcudiyeti değil, aynı zamanda aktif mikrobiyal fraksiyonu da ortaya koyarak fonksiyonel yapının netleştirilmesine katkı sunar (Herbel et al., 2013; Nyanzi et al., 2020; Anwar et. al., 2025).

Güncel literatürdeki bu gereksinimler ışığında kurgulanan bu çalışmada; yonca, çayır otu ve mısır silajından elde edilen farklı PFJ örneklerindeki aktif bakteriyel popülasyonun RNA temelli 16S rRNA Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, farklı bitkisel substratların aktif mikrobiyal yapı üzerindeki doğrudan etkilerinin incelenmesi ve RNA temelli moleküler analizlerin PFJ sistemlerinin fonksiyonel mikrobiyal karakterizasyonundaki analitik etkinliğinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. PFJ (Pre-Fermente Sıvı) Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pre-fermente sıvılar (Pre-Fermented Juice; PFJ), Çalışmada bitki materyali olarak çayır otu, yonca (Medicago sativa L.) ve mısır silajı kullanılmıştır. Her bir bitki materyalinden 1000 g alınarak 1000 mL steril saf su ile karıştırılmış ve steril blender yardımıyla yaklaşık 2 dakika homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası elde edilen karışımlar steril tülbentten süzülerek steril falkon tüplerine aktarılmıştır.

Çayır otu ve mısır silajından elde edilen sıvılara %3 oranında melas, yonca örneklerine ise %3 oranında glikoz ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımlar anaerobik koşullarda 30 °C'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen PFJ örnekleri analiz aşamasına kadar 0–4 °C'de muhafaza edilmiştir (Denek et al., 2012; Muck et al., 2018; Ohshima et al., 1997). Her bitki materyali için iki tekrar hazırlanmış ve toplam altı PFJ örneği moleküler analizlerde kullanılmıştır.

2.2. PFJ Örneklerinden RNA İzolasyonu

PFJ örnekleri analiz öncesinde vortex yardımıyla homojenize edilmiş ve her örnekten steril RNase-free tüplere 5 mL aktarılmıştır. Toplam RNA izolasyonu, üretici firma protokolüne uygun olarak TRIzol reaktifi (Nucleogene Tri-Reagent, NGE-023) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 mL PFJ örneği üzerine 1 mL lizis solüsyonu (400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, %1 SDS ve 20 µL proteinaz K) eklenmiştir. Örnekler bead-beating yöntemi ile homojenize edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

Homojenizasyon sonrası örnekler santrifüj edilerek oluşan pelet ayrılmış ve pelet üzerine 1 mL TRIzol reaktifi eklenmiştir. Daha sonra örneklere 200 µL kloroform ilave edilerek tekrar homojenizasyon uygulanmış ve örnekler 12.000 × g'de, 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst sulu faz yeni tüplere aktarılmış ve RNA çöktürme işlemi için eşit hacimde izopropanol kullanılmıştır. RNA peletleri %75 etanol ile yıkanmış, ardından DNase uygulaması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri RNase-free su içerisinde çözündürülmüş ve kalite-konsantrasyon ölçümleri NanoDrop spektrofotometresi ile değerlendirilmiştir.

2.3. cDNA Sentezi ve Realtime PCR Analizi

İzole edilen toplam RNA örneklerinden cDNA sentezi, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 4 µL 5× RT Buffer, 1 µL dNTP karışımı, 1 µL random hexamer primer, 2 ng toplam RNA, 1 µL enzim karışımı ve nükleaz içermeyen su ile toplam 20 µL hacme tamamlanmıştır. Reaksiyonlar termal döngü cihazında sırasıyla 55 °C'de 15 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de bekletme koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri analiz aşamasına kadar −20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Bakteriyel aktif popülasyonun belirlenmesi amacıyla 16S rRNA gen bölgesine yönelik SYBR Green tabanlı Real-Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları toplam 20 µL hacimde hazırlanmış olup reaksiyon karışımı; 10 µL SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Germany), 2 µL cDNA, 1'er µL ileri ve geri primer ile nükleaz içermeyen su içermiştir. Amplifikasyon işlemleri Rotor-Gene Q Real-Time PCR cihazında (Qiagen, USA) yürütülmüştür.

PCR protokolü başlangıç denatürasyonu için 95 °C'de 10 dakika uygulanmış, ardından 40 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde sürdürülmüştür. Amplifikasyon sonunda melting curve analizi gerçekleştirilerek ürün özgüllüğü değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen saf su kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan primer dizileri tabloda verilmiştir.

Tablo1. Realtime PCR primer nükleotid dizisi (Wasfi, vd. 2018)

Hedef Gen	**Primer Dizisi (5'-3')**
16S rRNA	F: CCTACGGGAGGCAGCAGTAG
16S rRNA	R: CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA

2.4.İstatistiksel Değerlendirme

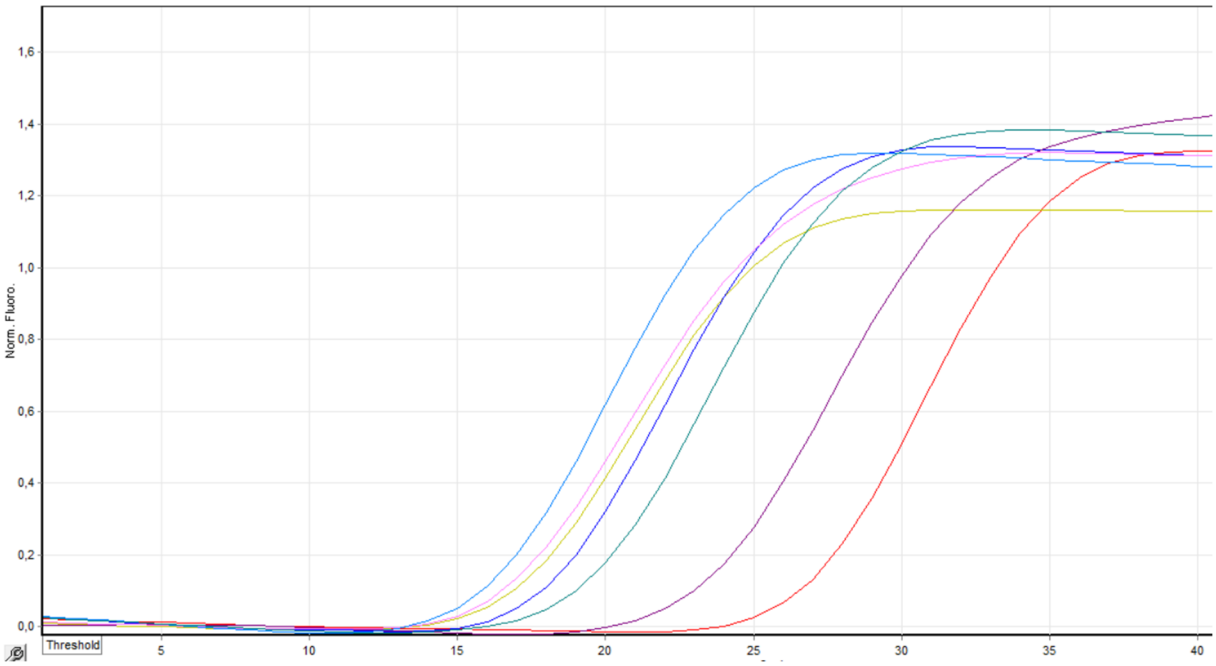
Bu çalışma, PFJ örneklerinde aktif bakteriyel varlığın RNA temelli moleküler yöntemlerle kalitatif olarak belirlenmesine yönelik yürütülmüş olup elde edilen veriler tanımlayıcı olarak değerlendirilmiştir. Amplifikasyon eğrileri, Ct değerleri ve melting curve analizleri cihaz yazılımı aracılığıyla yorumlanmıştır.

3. BULGULAR

Bu çalışmada farklı bitki kaynaklarından hazırlanan pre-fermente sıvı (PFJ) örneklerinde aktif bakteriyel popülasyonun belirlenmesi amacıyla RNA temelli 16S rRNA Real-Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PFJ örneklerinden izole edilen toplam RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar

kullanılarak yapılan SYBR Green tabanlı amplifikasyon analizlerinde tüm örneklerde bakteriyel 16S rRNA gen bölgesine ait pozitif amplifikasyon sinyalleri elde edilmiştir. Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğü melting curve analizleri ile değerlendirilmiş ve elde edilen RNA/cDNA örneklerinin miktarları NanoDrop spektrofotometrik analizleri ile belirlenmiştir.

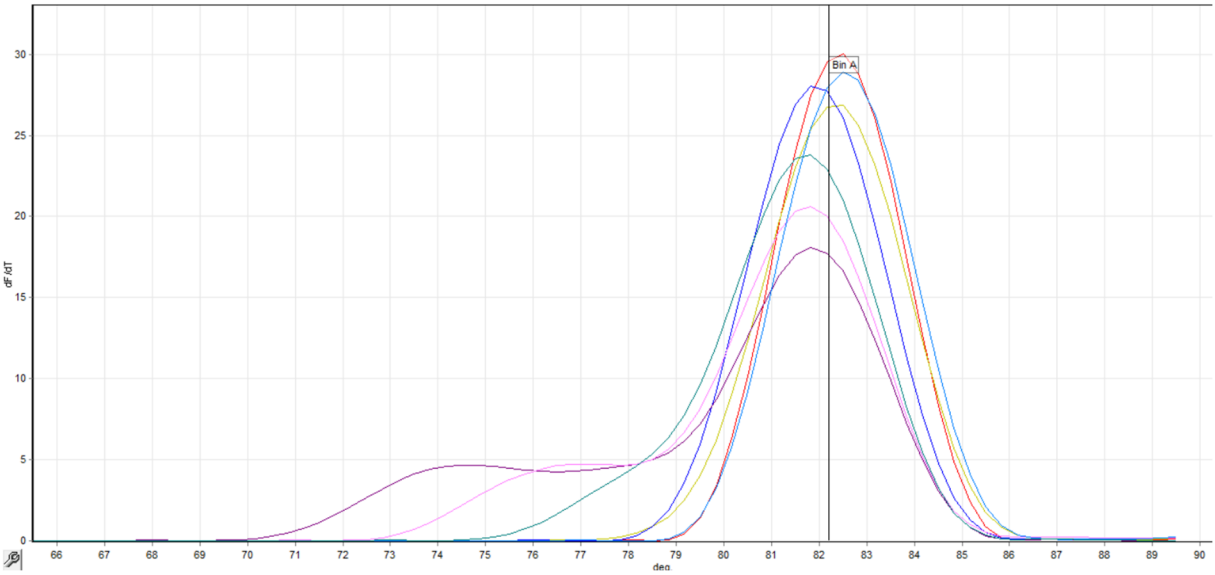
Resim 1-2. Realtime PCR Latobasillius spp. Amplifikasyon Sonuçları



Real-Time PCR analizlerinde tüm PFJ örneklerinde amplifikasyon eğrilerinin eşik çizgisini geçtiği belirlenmiştir. Amplifikasyon eğrilerinin sigmoid karakter göstermesi, hedef 16S rRNA gen bölgesinin başarılı şekilde çoğaltıldığını ortaya koymuştur. Özellikle bazı örneklerde amplifikasyon eğrilerinin erken döngülerde yükselmeye başlaması, başlangıçtaki bakteriyel RNA miktarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Buna karşılık bazı örneklerde Ct değerlerinin daha geç oluşması, bakteriyel yoğunluğun nispeten düşük olabileceğini düşündürmektedir.

PFJ örnekleri arasında amplifikasyon profillerinin farklılık göstermesi, kullanılan bitki materyalinin mikrobiyal kompozisyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çayır otu, yonca ve mısır silajı kaynaklı PFJ örneklerinde pozitif amplifikasyon sinyallerinin elde edilmesi, tüm örneklerde metabolik olarak aktif bakteriyel popülasyonun bulunduğunu ortaya koymuştur.

Resim 3-4. Realtime PCR Latobasillius spp. Melting Eğrileri



Melting curve analizlerinde örneklerin büyük çoğunluğunda tek ve belirgin pik oluşumu gözlenmiştir. Benzer erime sıcaklıklarında meydana gelen bu pikler, amplifiye edilen PCR ürünlerinin özgül olduğunu ve hedef bölgenin başarılı şekilde çoğaltıldığını göstermektedir. Özellikle dominant tek pik oluşumu, primerlerin hedef bölgeye spesifik bağlandığını desteklemektedir.

Bununla birlikte bazı örneklerde düşük sıcaklık bölgelerinde küçük ek piklerin veya genişlemiş eğrilerin oluştuğu belirlenmiştir. Bu durumun primer-dimer oluşumu, düşük düzeyde non-spesifik amplifikasyon veya örnek kaynaklı heterojen bakteriyel popülasyondan kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. Ancak genel melting curve profilleri dikkate alındığında, analiz edilen PFJ örneklerinde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin büyük oranda spesifik olduğu görülmüştür.

PFJ örneklerinden elde edilen toplam RNA ve sentezlenen cDNA örneklerinin NanoDrop analizlerinde yeterli konsantrasyon değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen nükleik asit miktarlarının Real-Time PCR analizleri için uygun düzeyde olduğu görülmüştür. Bazı örneklerde RNA konsantrasyonlarının daha yüksek bulunması, ilgili PFJ örneklerinde daha yoğun mikrobiyal aktivitenin varlığı ile ilişkili olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

NanoDrop analizlerinde elde edilen absorbans değerleri, örneklerin genel olarak moleküler analizler için kullanılabilir kalitede olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte RNA kalitesinin daha ayrıntılı değerlendirilebilmesi için özellikle 260/280 ve 260/230 absorbans oranlarının dikkate alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, farklı bitki kaynaklarından hazırlanan PFJ örneklerinde canlı ve metabolik olarak aktif bakteriyel popülasyonun bulunduğu belirlenmiştir. RNA temelli 16S rRNA Real-Time PCR analizleri, PFJ örneklerinde aktif bakteriyel varlığın başarılı şekilde tespit edilebildiğini göstermiştir. Özellikle amplifikasyon eğrileri ile melting curve analizlerinin birlikte değerlendirilmesi, elde edilen PCR ürünlerinin

büyük ölçüde özgül olduğunu ve PFJ örneklerinin yüksek düzeyde aktif mikrobiyal içerik taşıdığını ortaya koymuştur.

4. TARTIŞMA

Silaj fermantasyonunu optimize etmek amacıyla hazırlanan pre-fermente sıvıların (PFJ) mikrobiyal ekolojisi, günümüze dek genellikle geleneksel kültür yöntemleri veya standart DNA temelli yaklaşımlarla incelenegelmiştir. Ancak bu çalışmada farklı bitki kaynaklarından (yonca, çayır otu, mısır silajı) üretilen PFJ örneklerinin barındırdığı mikrobiyal topluluklar, hücresel metabolik aktiviteyi merkeze alan RNA temelli 16S rRNA Real-Time PCR (RT-qPCR) metodolojisi kullanılarak değerlendirilmiş ve tüm örneklerde fonksiyonel açıdan aktif popülasyonların varlığı kanıtlanmıştır (Cocolin et al., 2013; Wang et al., 2023). Standart DNA moleküler analizlerinin en büyük handikabı, inaktif durumdaki veya hücre ölümü gerçekleşmiş popülasyonlardan arta kalan genetik materyalin de PCR döngülerinde çoğaltılması ve dolayısıyla ortamdaki canlı mikrobiyal dinamiğin fizyolojik gerçeklikten uzak bir şekilde yorumlanmasına yol açmasıdır (Fey et al., 2004; Ji et al., 2018). Ribozomal RNA'nın son derece kısa olan yarı ömrü, elde edilen amplifikasyon sinyallerinin yalnızca hücresel fonksiyonlarını sürdüren aktif mikroorganizmalardan gelmesini garantilemekte olup, fermentatif ekosistemlerin gerçek biyo-potansiyelini yansıtmada eşsiz bir analitik üstünlük sunmaktadır (Miralles et al., 2019).

Moleküler analizler neticesinde örnekler arasında gözlemlenen belirgin Ct (eşik döngüsü) varyasyonları, substrat olarak kullanılan bitki materyalinin biyokimyasal yapısının aktif mikrobiyota gelişimi üzerinde ne derece kilit bir rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır. Özellikle mısır silajından elde edilen PFJ örneklerinde saptanan oldukça düşük Ct değerleri, bu materyalin sahip olduğu zengin fermente edilebilir karbonhidrat profilinin laktik asit bakterileri için son derece elverişli bir çoğalma substratı yarattığını doğrulamaktadır (Mu et al., 2022). Buna karşın, yonca bazlı örneklerde kaydedilen nispeten yüksek Ct değerleri, bu yem bitkisinin doğasında yer alan yüksek hücresel tamponlama kapasitesi ve sınırlı suda çözünebilir karbonhidrat içeriği ile ilişkilendirilebilirken; çayır otunda saptanan orta düzey amplifikasyon profilleri, epifitik mikroflora ve yapısal kompozisyon farklılıklarının beklenen bir sonucu olarak değerlendirilebilir (Nascimento Agarussi et al., 2019).

Fermantasyon kinetiğini ivmelendirmek adına PFJ hazırlık aşamasında ortama dahil edilen melas ve glikoz gibi ek karbonhidrat kaynakları, ortamdaki laktik asit bakterilerinin metabolik yollarını uyararak fermantasyon sürecinin stabilizasyonuna kritik düzeyde katkı sunmuştur (Martínez et al., 2011). İlave olarak, inkübasyon için tercih edilen 30 °C ortam sıcaklığının, mezofilik fermentatif bakterilerin gelişimi açısından ideal bir ekolojik niş oluşturduğu ve spesifik mikrobiyal canlılığı maksimize ettiği gözlemlenmiştir (Ndoye et al., 2011).

Teknik ve analitik güvenilirlik bağlamında incelendiğinde; bitkisel dokulardan kaynaklanabilecek yüksek fenolik bileşikler ve karmaşık polisakkaritler gibi potansiyel PCR inhibitörlerine rağmen, uygulanan bead-beating destekli TRIzol ekstraksiyon yönteminin hücresel lizis aşamasında yüksek verim sağladığı ve moleküler çalışmalar için optimum kalitede RNA eldesine imkan tanıdığı kanıtlanmıştır (Jin et al., 2010). Melting curve (erime

eğrisi) analizlerinde elde edilen keskin ve tekil pikler, tasarlanan spesifik primerlerin hedef 16S rRNA dizisine yüksek bir özgüllükle bağlandığının en somut kanıtıdır. Nadiren gözlemlenen düşük yoğunluklu ek pikler ise yöntemin bir zafiyeti olmaktan ziyade, bitki bazlı karmaşık fermentatif matrislerin doğasında barındırdığı mikrobiyal heterojenitenin hücresel boyuttaki bir yansımasıdır (Sohier et al., 2014; Yap et al., 2022).

Araştırma bulguları genel bir çerçevede değerlendirildiğinde; çalışmada kurgulanan RNA hedefli RT-qPCR stratejisinin, PFJ sistemlerindeki rastgele bir mikrobiyal mevcudiyeti raporlamanın ötesine geçerek, bizzat aktif ve işlevsel mikrobiyal fraksiyonu haritalandırdığı görülmektedir. Bu canlı bakteriyel toplulukların moleküler düzeyde yüksek doğrulukla saptanabilmesi; silaj inokulantlarının biyolojik performanslarının öngörülmesi, fermantasyon kalitesinin standardize edilmesi ve probiyotik preparatların sahadaki etkinliklerinin doğru bir perspektifle ölçümlenmesi süreçlerinde bilimsel literatüre derinlikli ve değerli bir metodolojik açılım kazandırmaktadır (Chen et al., 2023; Comtet-Marre et al., 2017; Pega et al., 2017).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, yonca, çayır otu ve mısır silajından hazırlanan pre-fermente sıvı örneklerinde aktif bakteriyel popülasyon RNA temelli 16S rRNA real-time PCR yöntemi ile başarılı şekilde belirlenmiştir. Tüm örneklerde pozitif amplifikasyon sinyallerinin elde edilmesi, PFJ sistemlerinin metabolik olarak aktif bakteriyel topluluklar içerdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca amplifikasyon ve melting curve analizleri birlikte değerlendirildiğinde, kullanılan yöntemin yüksek düzeyde özgüllük ve duyarlılık sağladığı belirlenmiştir.

Farklı bitki materyallerine bağlı olarak gözlenen Ct değişimleri, substrat özelliklerinin aktif mikrobiyal popülasyon üzerinde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle mısır silajı kaynaklı örneklerde daha yüksek mikrobiyal aktivitenin belirlenmesi, fermente olabilir karbonhidrat içeriğinin fermentatif bakterilerin gelişiminde önemli rol oynadığını desteklemektedir.

Elde edilen bulgular, RNA temelli 16S rRNA RT-qPCR yönteminin fermentatif sistemlerde aktif bakteriyel toplulukların belirlenmesinde etkili ve güvenilir bir yaklaşım olduğunu göstermektedir. Bu yöntem, yalnızca mikrobiyal varlığı değil, aynı zamanda canlı ve fonksiyonel bakteriyel fraksiyonu da ortaya koyması nedeniyle PFJ sistemlerinin mikrobiyal karakterizasyonunda önemli avantaj sunmaktadır. Dolayısıyla RNA temelli moleküler analizlerin, fermentasyon biyolojisi, silaj mikrobiyolojisi ve biyolojik inokulant çalışmalarında gelecekte daha yaygın kullanım potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulamir, A. S., Yoke, T. S., Nordin, N., & Bakar, F. A. (2010). Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology*, *9*(10), 1481-1492.

Anwar, S., Lamaudiere, M., Hassall, J., Dehinsilu, J., Bhuller, R. K., Hold, G. L., Vázquez-Campos, X., Mahnert, A., Moissl-Eichinger, C., Gallé, B., Kainz, G., Pjevac, P., Hausmann, B., Schwarz, J., Kohl, G., Berry, D., Vancuren, S. J., Allen-Vercoe, E., Nielsen, N., … Sergaki, C. (2025). DNA reference reagents isolate biases in microbiome profiling: A global multi-lab study. mSystems, 10(11), e00466-25.

Aydın, S. S. (2023). The effect of the addition of fermented natural lactic acid bacterial liquid and some lactic acid bacterial inoculants on alfalfa silage quality, in vitro digestibility and gas production. *Journal of Agricultural Sciences*, *29*(3), 811-820.

Aydin, S. S., & Denek, N. (2022). Amount of lactic acid bacteria in fermented natural lactic acid bacteria liquids prepared with varying sucrose inclusion at different incubation periods. *Medycyna Weterynaryjna*, *78*(9), 456-460.

Chen, H., Kang, L., Li, K., Feng, T., Ni, Z., Gao, E., & Fang, Z. (2023). Accurate quantification on the change of some live pathogenic microbial flora in fermented feed. *International Journal of Food Science and Technology*, *58*(7), 3552-3559.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International journal of food microbiology*, *167*(1), 29-43.

Comtet-Marre, S., Parisot, N., Lepercq, P., Chaucheyras-Durand, F., Mosoni, P., Peyretaillade, E., ... & Forano, E. (2017). Metatranscriptomics reveals the active bacterial and eukaryotic fibrolytic communities in the rumen of dairy cow fed a mixed diet. *Frontiers in microbiology*, *8*, 67.

Daliu, P., Souto, E. B., & Santini, A. (2025). Novel applications of Lactobacillus in the food industry. *Journal of Asian Scientific Research*, *15*(1), 111.

Denek, N., Can, A., Avci, M., & Aksu, T. (2012). The effect of fresh and frozen pre-fermented juice on the fermentation quality of alfalfa silage. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *18*(5).

Dias, C. O., Scariot, M. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., & Arisi, A. C. M. (2020). Application of propidium monoazide coupled with quantitative PCR to evaluate cell viability of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in a non-dairy probiotic beverage. *Annals of Microbiology*, *70*(1), 22.

Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Höfle, M. G., & Guzmán, C. A. (2004). Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using Salmonella as a model organism. *Applied and environmental microbiology*, *70*(6), 3618-3623.

Filya, I. (2003). The effect of Lactobacillus buchneri and Lactobacillus plantarum on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of dairy science*, *86*(11), 3575-3581.

Herbel, S. R., Vahjen, W., Wieler, L. H., & Guenther, S. (2013). Timely approaches to identify probiotic species of the genus Lactobacillus. *Gut Pathogens*, *5*(1), 27.

Ji, Y., Park, S., Park, H., Hwang, E., Shin, H., Pot, B., & Holzapfel, W. H. (2018). Modulation of active gut microbiota by Lactobacillus rhamnosus GG in a diet induced obesity murine model. *Frontiers in microbiology*, *9*, 710.

Jin, M., Zhao, Z. G., Qiu, Z. G., Wang, J. F., Chen, Z. L., Shen, Z. Q., ... & Li, J. W. (2010). Rapid method to extract high-quality RNA from activated sludge. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, *31*(1), 260-265.

Jones, D. J. C. (1991). The Biochemistry of Silage (2nd edn), by P. McDonald, AR Henderson & SJE Heron. 340 pp. Kingston, Kent: Chalcombe Publications (1991).£ 49.50 (UK)£ 55.00 (elsewhere)(hardback). ISBN 0 948617 22 5. *The Journal of Agricultural Science*, *117*(3), 386-386.

Kiraz, A. B., & Kutlu, H. R. (2016). Bakteriyel inokulant kullanımının silajlarda fermantasyon özellikleri üzerine etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *20*(3), 230-238.

Koç, F., Karapinar, B., Okuyucu, B., & Korucu Erdem, D. (2020). The effects of kefir addition on the fermentation characteristics and aerobic stability of alfalfa silages.

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.

Marshall, N. T., Vanderploeg, H. A., & Chaganti, S. R. (2021). Environmental (e) RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific reports*, *11*(1), 2769.

Martínez, N., Martín, M. C., Herrero, A., Fernandez, M., Alvarez, M. A., & Ladero, V. (2011). qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(7), 367-376.

Mira Miralles, M., Maestre-Carballa, L., Lluesma-Gomez, M., & Martinez-Garcia, M. (2019). High-throughput 16S rRNA sequencing to assess potentially active bacteria and foodborne pathogens: A case example in ready-to-eat food. *Foods*, *8*(10), 480.

Mu, L., Wang, Q., Cao, X., Li, H., & Zhang, Z. (2022). The potential of pre-fermented juice or Lactobacillus inoculants to improve the fermentation quality of mixed silage of agro-residue and lucerne. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 858546.

Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung Jr, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of dairy science*, *101*(5), 3980-4000.

Nascimento Agarussi, M. C., Gomes Pereira, O., Paula, R. A., Silva, V. P., Santos Roseira, J. P., Fonseca e Silva, F., & Ribeiro, K. G. (2019). Novel lactic acid bacteria strains as inoculants on alfalfa silage fermentation. Scientific Reports, 9, 8007. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44520-9

Ndoye, B., Rasolofo, E. A., LaPointe, G., & Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology*, *91*(5), 495-524.

Nyanzi, R., Jooste, P. J., & Buys, E. M. (2021). Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. *Journal of Dairy Science*, *104*(1), 1-19.

Ohshima M, Kimura E and Yokota H.1997. A method of making good quality silage from direct cut alfalfa by spraying previously fermented juice. Animal Feed Science and Technology 66: 129–37. DOI: https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01111-X

Oruç, A., & Avcı, M. (2024a). Şanlıurfa koşullarında ikinci ürün olarak yetiştirilen yem bezelyesi (Pisum arvense L.) + arpa (Hordeum vulgare L.) karışımı hasıllarına farklı oranlarda melas ilavesinin silaj kalitesi üzerine etkisinin araştırılması. MAS Journal of Applied Sciences, 9(3), 486–500. https://doi.org/10.5281/zenodo.13253371

Oruç, A., & Avcı, M. (2024b). Pamuk ekiminde ara ürün olarak yetiştirilen macar fiği (Vicia pannonica Crantz) + tritikale (X Triticosecale Wittm) karışımı hasıllarına farklı seviyelerde melas ilavesinin silaj kalitesi üzerine etkisinin araştırılması. MAS Journal of Applied Sciences, 9(2), 400–413. https://doi.org/10.5281/zenodo.11904700

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O. and Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of Ensiling. In Silage Science and Technology (eds D.R. Buxton, R.E. Muck and J.H. Harrison). https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2

Pega, J., Rizzo, S., Rossetti, L., Pérez, C. D., Díaz, G., Descalzo, A. M., & Nanni, M. (2017). Impact of extracellular nucleic acids from lactic acid bacteria on qPCR and RT-qPCR results in dairy matrices: implications for defining molecular markers of cell integrity. *Lwt*, *80*, 416-422.

Sohier, D., Pavan, S., Riou, A., Combrisson, J., & Postollec, F. (2014). Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 16.

Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M., & Ashour, H. M. (2018). Probiotic Lactobacillus sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. *Journal of cellular and molecular medicine*, *22*(3), 1972-1983.

Wang, Y., Thompson, K. N., Yan, Y., Short, M. I., Zhang, Y., Franzosa, E. A., ... & Huttenhower, C. (2023). RNA-based amplicon sequencing is ineffective in measuring metabolic activity in environmental microbial communities. *Microbiome*, *11*(1), 131.

Yap, M., O'Sullivan, O., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2022). Development of sequencing-based methodologies to distinguish viable from non-viable cells in a bovine milk matrix: A pilot study. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1036643.