

MERİNOS KOYUNLARI RUMEN SIVISINDA PROTOZOA SAYISI VE BAZI  
PROTOZOON TİPLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Nesrin Sulu<sup>1</sup>

Fahri Bölükbaşı<sup>2</sup>

Kazım Börkücü<sup>3</sup>

Protozoa count and identification of some protozoa types in merino sheep ruminal fluid

**Summary.** *This study was carried out on six merino sheep in the Clinic of Internal Diseases of Veterinary Faculty in Ankara University. After rumenotomy, a T shape cannula was inserted into the rumen to obtain the ruminal fluid easily. Three different kind of rations were fed to the same sheep, as I. hay alone, II. hay + barley and III. barley + concentrated feed. Before the ruminal fluid sampling, the sheep were fed with the ration mentioned, for three weeks to have them adapted to the feed. In the ruminal fluid samples taken at the end of second hour of feeding, decrements in the protozoa counts and in the percentages of Entodinia were obtained and pH values were lowered. Diplodinia percentages, however increased when the animals were fed with barley + concentrated feed. Isotrichia had the lowest percentage among these three protozoa species in each differentiation.*

*The MFS solution, in the composition of formaldehyde + methyl-green, sodium chloride and distilled water gave reliable results in determining the protozoa types.*

**Özet.** *Bu çalışma Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğinde bulunan altı merinos koyununda sürdürüldü. Hayvanlara rumenotomi uygulanarak rumen içeriğini kolayca alabilmek için T şeklinde bir kanül yerleştirildi. Aynı koyunlara I. yalnız kuru ot, II. kuru ot + arpa ve III. arpa + konsantrre yem biçiminde üç ayrı rasyon uygulandı. Rumen sıvısı örneklerini almadan önce hayvanların anılan rasyonlara uyumları için üçer hafta beklenildi. Yemlemeden iki saat*

1 Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Bilim Dalı, Ankara.

2 Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Bilim Dalı, Ankara.

3 Dr. Arş. Gör. A.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara.

*sonra alınan rumen sıvısında protozoa sayılarında ve Entodinium yüzde oranlarında azalmalar elde edildi ve pH değerleri düştü. Hayvanlar arpa + konsantre yem ile beslendiğinde Diplodinia yüzde oranı arttı. Her muayenede Isotrichia türünün en az yüzde oranını oluşturduğu saptandı.*

*Protozoon tiplerini belirlemede formaldehit, metilyeşili, sodyum klorid ve distile su bileşimindeki MFS eriyiğinin güvenilir sonuçlar verdiği saptanmıştır.*

### Giriş

Selüloz gibi birçok bitkisel besinler büyük enerji taşımalarına rağmen çoğu hayvanlar ve insanlar tarafından değerlendirilememekte, böylece önemli bir besin kaybı olmaktadır. Ot yiyen hayvanlar ise bitkisel kaynaklı bu besinleri süte ve ete çevirerek dünyanın protein ihtiyacının hemen yarısını karşılamaktadırlar (3). Özellikle geviş getiren hayvanlarda mikroorganizmaların rumendeki fermentatif sindirim olayları üzerindeki etkisi çok büyüktür (5 — 8). Bu mikroorganizmaların başlıcalarını bakteriler ve protozoonlar oluşturmakta ve protozoonların yaptıkları işler, bakteriler kadar açıklığa kavuşturulamamış bulunmaktadır. Nitekim ruminantlara uzunca süre kolay sindirilir nitelikte olan nişasta ve benzeri karbonhidratlar ya da arpa + keten bulamacı gibi rasyonlar verildiğinde protozoonların çok azaldıkları hatta yok oldukları görülebilmektedir. Bu bulgu bazı yazarlarca protozoonların ruminantlar için gerekli olmadığı kanısını uyandırmaktadır (7). Bununla birlikte ruminant, protozoonların sentezlediği besinlerden daha kolay ve daha yüksek oranda yararlanır. Diğer bir deyişle protozoonların sentezlediği besin maddelerinin biyolojik değeri daha yüksektir. Bu arada protozoonların yokluğu yemden yararlanma yeteneğini (10, 12) ve dolayısıyla ağırlık kazancını (10) çok azaltmakla ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Omazum, abomazum ve duodenumda aktif protozoona hiç rastlanmamaktadır (10).

Rumende değişik türde protozoa bulunmakta ve çoğunluğunu anaerob siliatlar oluşturmaktadır. Bunlar da başlıca Holotrich ve Entodiniomorph olarak iki gruba ayrılmaktadır. Birinciler hemen tamamen, ikinciler ise sadece ağız yöresinde belirli bir alanda silyalarla örtülüdürler. Holotrich'ler arasında önemli türler olarak Isotrichia, Dasytrichia; Entodiniomorph'lar arasında ise Entodinium, Epidinium, Ophryo-scolex, Diplodinium sayılmaktadır (10, 14, 15).

Siliatlar asimetrik olup *Isotrichia* gibi bazı türleri canlılığını aerob ortamda bir süre sürdürebilmektedir (10, 14). *Holotrich*'ler genç kuzuların rumeninde ilk yerleşen protozoonlardır ve karbonhidrat beslenmesinden çok fazla etkilenirler (10).

Entodiniomorph'lar sadece ağız yöresinde siliata taşımalarına karşın hareket ve özellikle besinlere yönelim yetenekleri oldukça gelişmiştir. Ağız çevresindeki ve saat yelkovanı yönünde hareket eden silyalar en çok *Entodinium*'larda belirgindir (14).

Protozoonların mikroskopik ayırımında hücrenin büyüklüğü, pozisyonu, makro ve mikro çekirdek ile kontraktıl vakuolun bulunduğu yer ve silya durumu gibi faktörler değerlendirilir (14).

Hayvanlar arasında transfaunasyonun doğrudan temas yoluyla olabildiği genellikle kabul edilmektedir. Hayvanı izole etmekle bakterilerin transflorasyonu engellenememekte ancak protozoonların nakli oluşmamaktadır. Transfaunasyonu başlatan en önemli etken yavrunun beraber bulunduğu erişkin ruminantlardır. Ananın ağız yöresi, dışkısı ya da önceden yaladığı yemler protozoa inokulasyonu için ilk kaynakları oluşturmaktadır (8, 9). Rumene protozoonların sürekli gelimi besinlerle sağlanmaktadır. Protozoonlar genellikle adapte olabildikleri besin maddelerine tutunmuş biçimde gelişirler ve rumene bu yolla gelirler (7, 10, 11).

Rumenin pH'sı asit olduğunda (9, 10) protozoonların yerleşik duruma geçmesi genellikle güç olmaktadır. Çünkü protozoa 5.5'den düşük pH'da uyum sağlayamamakta, daha düşük pH'larda defaunasyon şekillenmektedir. Mideye asit koyarak, hayvanı aç bırakarak, yetersiz besleyerek, kaba yem rasyonlarını öğütülmüş biçimde fazla miktarda vererek, nişasta benzeri kolay eriyebilir şekerler, süt, arpa, keten bulamacı gibi besinler ile uzun süre besleyerek,  $\text{CuSO}_4$  gibi bazı kimyasal maddeler vererek ya da genç ruminant çevresinden dikkatle izole ederek defaunasyon oluşturulabilmektedir (9, 10, 15).

Rumen pH'sı fermentasyonun azalması, alkali tükrüğün artması ile yükseltirirse pH: 6'ye ulaştığında *Entodinia* görülmeye başlamakta ve 6.5 pH'da siliatların hemen tamamına rastlanabilmektedir (6, 10).

Rumendeki mikroorganizma hacminin hemen yarısını protozoonların oluşturmasına karşın, birim hacimdeki sayıları bakterilerinden çok azdır. Bunun nedeni protozoonların bakterilerden pek çok büyük oluşudur. Nitekim küçük bir bakterinin hacmi 1 mikronküp

kadar iken, Entodinium'un ki 10.000, Diplodinium'un ki 100.000 ve Epidinium'un ki 1.000.000 mikronküp dolayındadır (9).

Protozoonların enzim sistemlerine malik oldukları ve karbonhidrat fermentasyonundan enerji oluşturdukları kanıtlanmıştır. Bunlar da bakteriler gibi ikiye bölünerek çoğalırlar (15).

Protozoonların gelişimleri için bakterilere muhtaç oldukları, bunları yutarak biyolojik değeri daha yüksek maddelerin sentezinde kullandıkları bilinmektedir. Bazı siliataların küçük tip protozoonları avladıkları da görülmektedir. Nişasta granülleri ya da selüloz parçacıklarını da fagosite edebilmektedirler. Yedek polisakarit sentezinde Holotrich'ler daha aktif bulunmaktadırlar (9).

Bu araştırmanın amacı kuru ot, arpa + kuru ot ve arpa + konsantre yem biçimindeki 3 ayrı rasyonla beslenen koyunlarda rumen sıvısı, protozoon sayısı ve protozoon tiplerinin yüzde oranlarını uygun bir yöntemle belirlemek ve bu şekilde protozoon sindirimi konusunda literatüre katkıda bulunabilmektir.

### Materyal ve Metot

Bu çalışma üç ayrı rasyona adapte edilmiş ve rumenine kanül takılmış merinos koyunları üzerinde sürdürüldü. Sabah yemlemesinden önce ve iki saat sonra alınan rumen içeriğinde protozoon sayıları ve türlerinin yüzde oranları belirlendi.

#### *Besin Materyali:*

Altı adet Merinos koyunu üç değişik rasyonla beslenmeye alınarak rasyonların rumendeki protozoon sayısına ve türlerine etkisi incelendi. Koyunların, rumenetomi ile takılan kanüllere adaptasyonları sağlandıktan sonra, hayvanların anılan rasyonlara uyumları için üç haftalık bir süre beklenildi (12). I. rasyon olarak sadece kuru ot, II. rasyon olarak kuru ot + arpa, III. rasyon olarak da arpa + konsantre yem verildi. Gıda Sanayii A.Ş.'den sağlanan konsantre yemin ana maddesini ham protein ve ham selüloz oluşturuyordu. Koyunlar sabah saat 9 ve öğleden sonra 16 olmak üzere günde iki kez beslendi. Önlerinde içtikleri kadar su bulunduruldu.

#### *Hayvan Materyali:*

Çalışmamızda İç Hastalıkları Bilim Dalındaki altı Merinos koyundan yararlanıldı. Hayvanlar çalışmaya başlamadan önce sağlıklı ve

uygun beslenme koşullarında bulunduruldu. Rumen içeriğinin kolaylıkla sağlanması için rumende bir pencere açıldı (4, 10). Buraya T şeklinde bir kanül konuldu. İçeriğin rumende homojenizasyonunu sağlamak için ventral keseye dıştan masaj uygulandı (12) ve vakumlu bir pompa yardımıyla kanülden, yeterli rumen içeriği alındı. İçerik daha önce içinde pamuk yakarak anaerob getirilen bir erlenmayer içine konuldu (14). Erlenmayer, içinde 40 °C'lik sıvı bulunan bir kaba yerleştirilerek doğrudan pompanın ucuna takıldı. Alınan örnekler hemen laboratuvara getirilerek aynı ısıdaki çalkalayıcı su banyosunda deney süresince saklandı. Örnekler alındıktan hemen sonra pH'ları elektrometrik olarak ölçüldü.

*Sayımın yapılması:* Protozoa sayımında kullanılan eriyik şu bileşimde idi (4, 12, 14).

Formol % 35'lik	20 ml
Gliserin	150 ml
Saf su	820 ml

Rumen içeriğinin 1 ml'si, 50 ml sulandırma eriyiği ile bir erlenmayer içine konuldu ve çalkalandı. Bu sıvı bir tülbent ile başka bir erlenmayere süzüldü. Tülbentte kalan yem parçalarına yapışmış olan protozoonlar, üzerinden 49 ml sulandırma eriyiği geçirilerek yıkandı. Böylece toplam 100 ml olan eriyikte protozoonların büyük bir bölümü alta geçirilmiş oluyordu. Sayım için hazır olan bu örnekler çalkalayıcı su banyosuna konarak sayım işlemi bitinceye kadar saklandı. Sayım sırasında bu eriyik geniş ağızlı bir pipetle Mc-Master lamına konuldu (4, 9, 12 — 14). Lam ile lamel arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edildi. Protozoonların çökmesi için bir dakika kadar beklendi. Her örnek için paralel sayım yapılarak ortalama değerler alındı. Santimetre küpteki protozoon sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı (12, 13):

$$P.S. /ml = S.P.S. \times S.O. \times \frac{1000}{450}$$

P.S. /ml = ml'deki protozoa sayısı

S.P.S. = sayılan protozoa sayısı

S.O. = sulandırma oranı

Mc Master lamında herbiri  $10 \times 10 \times 1.5 = 150 \text{ mm}^3$  olan üç hacim bulunmaktadır ( $150 \times 3 = 450 \text{ mm}^3$ ). Bu hacimde sayılan protozoa sayısı ile sulandırma oranı gözönünde tutulursa, santimetreküpteki protozoa sayısını bulmak için S.P.S. x S.O. değerini  $\frac{1000}{450}$  ile çarpmak yeterlidir.

#### *Protozoon Türlerinin İdentifikasyonu:*

Metil yeşili-Formalin-NaCl'den oluşan ve kısaca MFS solüsyonu olarak bilinen boyama eriyiği şu bileşimde idi (14):

Formaldehyde eriyiği (% 35)	100 ml
Methylgreen	0.6 g
NaCl	8 g
Distile su	900 ml

Sadece nükleusları boyayan bu solüsyon, ışıkta kalması halinde metil yeşilinin metil violeye dönüşerek boyamanın yeterli olmaması nedeniyle karanlıkta saklandı.

Santrifüj tüpüne 3 ml kadar rumen içeriği konulup dakikada 500 devirli bir santrifüjde beş dakika döndürüldü. Bunun üzerine dört katı miktarda % 30'luk sukroz eriyiği konuldu. Aynı devirde üç dakika tekrar santrifüje edildi. Üst kısım atılıp kalan kısmın üzerine beş katı kadar MFS eriyiğinden konuldu. Protozoonların boyanması için en az 30 dakika beklendi. Tekrar beş dakika 500 devirde santrifüje edildi. Dipteki çökeltiden pipet ucu veya damlalıklarla bir miktar alınıp lam üzerine yayıldı. Hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek bir lamelle kapatılıp araştırma mikroskopunda her preparattan 200 protozoon identifiye edildi. Araştırma süresince karanlıkta saklanan santrifüj tüpü dibindeki bu boyalı ve homojen protozoon karışımından taze preparatlar hazırlanarak protozoonların, örnekleme zamanlarına ait yüzde oranları saptandı. Ençok görülen türlerin resimleri çekilerek sunuldu.

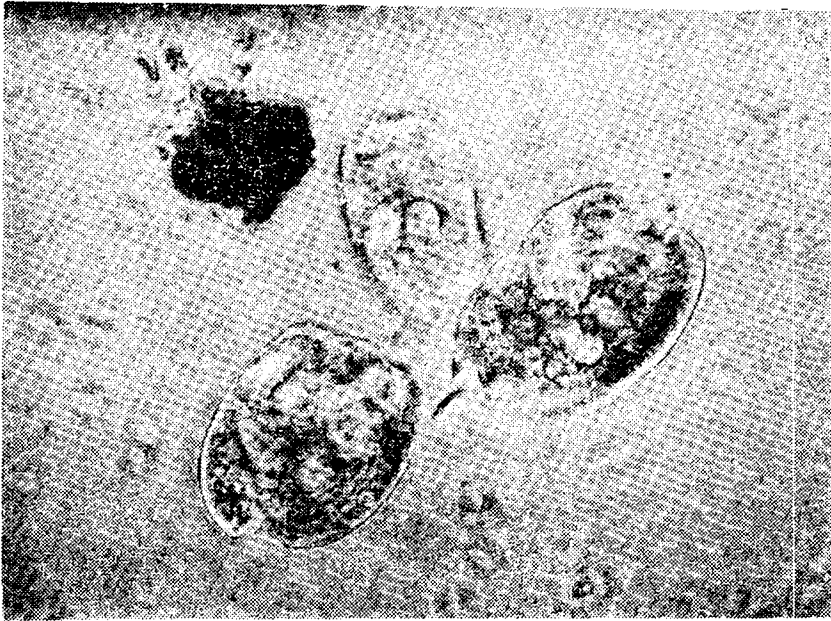
#### **Bulgular**

I. Kuru ot, II. kuru ot + arpa ve III. arpa + konsantre yem biçiminde değişik üç rasyonla beslenen aynı koyunlarda yemleme öncesi

ve yemlemeden iki saat sonraki rumen içeriği pH'sı ve protozoon sayısı Tablo 1'de, başlıca protozoon tiplerinin yüzde oranları Tablo 2'de sunulmaktadır. Bu arada bazı protozoon tiplerine ait resimler Şekil 1, 2 ve 3'de verilmektedir.

Tablo 2. Değişik rasyon uygulanan koyunlarda yemleme öncesi ve yemlemeden iki saat sonra başlıca protozoon tipleri yüzde oranları  
(Y.Ö. = Yemlemeden önce, Y.S. = Yemlemeden sonra)

Rasyon Grubu	Koyun sayısı	Protozoon Tipleri		
		Entodinium %	Diplodinium %	Isotrichia %
I. Kuru ot	6	Y.Ö. 80 (65-80)	19 (15-22)	1 (1-2)
	Y.S.	75 (64-79)	19 (9-26)	6 (1-12)
II. Kuru ot + arpa	6	Y.Ö. 76 (35-81)	18 (17-25)	1 (1-2)
	Y.S.	79 (44-91)	20 (9-25)	1 (0-1)
III. Arpa + konsantre yem	6	Y.Ö. 84 (48-89)	13 (8-21)	2 (2-8)
	Y.S.	73 (51-90)	23 (10-36)	4 (0-8)

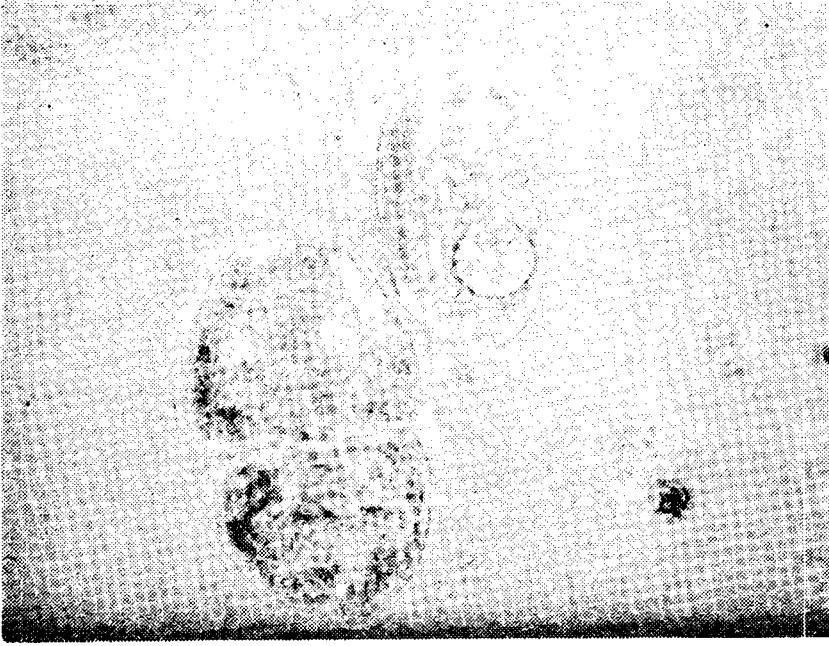


Şekil 1. Entodinium.

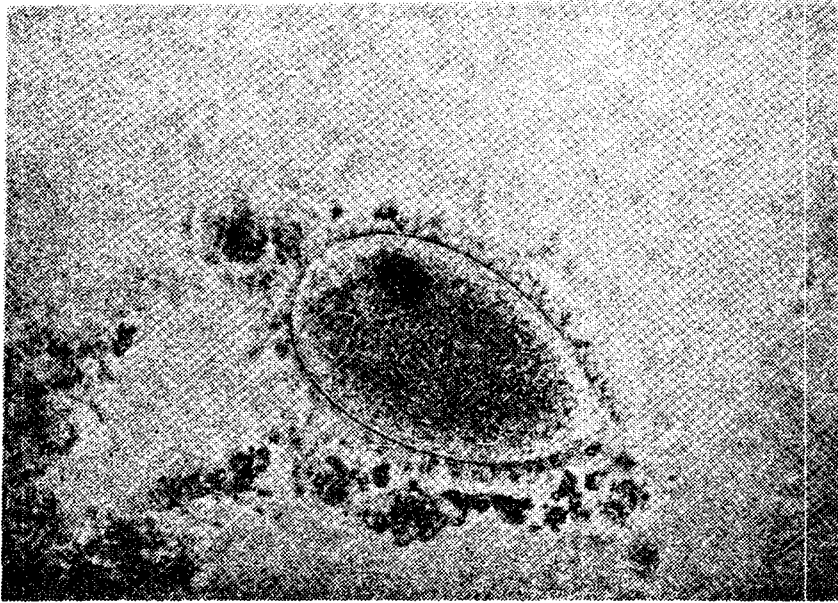
Tablo 1: Değişik rasyon uygulanan koyunlarda yemleme öncesi ve yemlemeden iki saat sonra rumen içeriği pH'sı ve protozoa sayısı

Rasyon Grubu	Koyun sayısı	Yemlemeden önce		Yemlemeden sonra	
		Protozoa sayısı $\times 10^3$ / ml	pH	Protozoa sayısı $\times 10^3$ / ml	pH
I. Kuru ot	6	454 (230— 630)	7.04 (6.9 —7.20)	380 (250 - 550)	6.8 (6.6—7.05)
II. Kuru ot + arpa	6	1136 (228—2329)	6.72(6.25—7.0)	831 (301 -1937)	6.45 (6.1- 7.0)
III. Arpa + konsantre yem	6	1281 (950—1558)	6.9 (6.6—7.0)	972 (311 -1549)	6.3 (5.9—6.8)





Şekil 2. Diplodinium.



Şekil 3. Isotrichia.

Tablo 1'de yemlemeden önceki pH değerlerinin tüm besi gruplarında, yemlemeden sonrakilerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Protozoa sayıları da yemlemeden sonra azalmış bulunmaktadır.

Tablo 2'de gerek yemlemeler öncesinde gerekse rasyonların verilmesinden iki saat sonraki tespitlerde protozoonlar arasında en yüksek yüzde oranını Entodinium'un oluşturduğu, bunu Diplodinium'un izlediğini ve Isotricha'nın en az oranda bulunduğu görülmektedir. Tablo 2'de ayrıca yeme sonrası Entodinium değerlerinin belirgin bir azalma gösterdiği dikkati çekmektedir.

### Tartışma ve Sonuç

Rumen fizyolojisinin çeşitli konularını anlamak için en çok kullanılan yöntemlerden biri sol açlık çukurluğundan yapılan rumen fistülüdür (4, 9, 10). Bu şekilde hayvana zarar vermeden rumende şekillenen fermentasyon olayları kolaylıkla araştırılabilmektedir. Rumendeki protozoon sayısı ve tiplerin identifikasyonu için *in vivo* rumen şartlarının *in vitro* olarak sağlanması gerekmektedir. Bunların başlıcaları 39 °C'lik ısı, anaerob ortam ve yüksek nemlilik (4, 8, 9). Araştırmamızda bu amaçla erlenmayer içerisinde oksijensiz bir ortam yaratılıp (2), 40 °C'lik su banyosuna konuldu. Alınan rumen içeriği örnekleri bu erlenmayer içerisinde bulunduruldu (14). Gerek protozoonların sayım eriyiğinde (4, 12, 14), gerekse identifikasyon için kullanılan MFS eriyiğinde (14) formalin bulunması ile örneklerin uzun süre saklanabilmeleri mümkün oluyordu. Ayrıca bu boyama yöntemleriyle protozoonun ve organellerinin çok belirgin boya aldığı ve bu teknik ile protozoon identifikasyonunun kolayca yapılabildiğini vurgulamak yerinde olacaktır. Identifikasyon için mikroskop altında fazla sayıda protozoonu (200 adet) değerlendirmenin nedeni yüzde oranlarında yanlış payını minimuma indirmektir.

Yemlemeden önce pH'nın nötre yakın oluşu literatür bildirimlerine uygundur (8 — 10, 12, 15). Yemlemeden iki saat sonraki örneklerde pH'nın düşmesi, rumendeki fermentasyon sonucu asit ürünlerin artmasına bağlanabilir (Tablo 1).

Yeme ile protozoon sayısının azaldığı genellikle kabul edilmektedir (9, 10, 12). Burada fermentasyon sonucu asit ürünlerin oluşmasının en önemli sorunu oluşturduğuna inanılmaktadır. Besinler kolay sindirilir nitelikte olduğunda, hem besin alımı sırasında hem

de fazla ruminasyon gerekmemesi nedeniyle tükürük sekresyonu az olmakta ve rumen sıvısındaki tamponlama özelliğinin azalması nedeniyle pH'nun asit yöne kayışı gerçekleşmektedir (10, 12). Araştırmamızda her üç rasyondan sonra da protozoon sayısının azalması, anılan literatür bildirimlerini destekleyici niteliktedir. Hayvan sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamadığından protozoon sayısındaki azalmanın verilen rasyonlara uyumlu bir yorum getirebilmesi mümkün olamamıştır.

Yemleme ile Entodinium yüzde oranında belirgin bir artış gözlenmektedir. Hem bu bulgumuz, hem de saptadığımız Entodinium yüzde oranı, Hungate'in (10) Entodinium'un % 88 oranında bulunduğu ve yemleme ile azaldığı bildirimine uygundur. Üre içeren ve böylece amonyak oluşumu kolaylaşan rasyonlar verildiğinde Entodinium'un arttığı bildirilmektedir (1). Bulgularımız (Tablo 2) arpa ile birlikte ana bileşimini ham protein ve ham selülozun oluşturduğu konsantre yem verildiğinde, yemleme öncesi % 13 olan Diplodinium oranının, yemlemeden sonra % 23'e yükselmesinin sadece tesadüflere bağlı olmadığı kanısını desteklemektedir.

Sonuç olarak değişik rasyon uygulanan koyunlarda rumen sıvısındaki protozoon sayısı ve protozoon tiplerinin yüzde oranlarını belirlemede kullanılan eriyik ve boyalarla güvenilir sonuçlar alındığını, yemleme ile protozoon sayısının ve Entodinium yüzde oranının azaldığını, pH'nun biraz düştüğünü, ham protein, ham selüloz içeren konsantre yem ile Diplodinium türünün arttığını ve tüm bulgularımızın genelde literatür verilerine ters düşmediğini kaydedebiliriz. Bu çalışmanın, yurdumuzda rumenoloji alanında çalışacaklara, özellikle boyama yöntemi yönünden yararlı olacağı inancını taşımaktayız.

#### Kaynaklar

1. Ahuja, S.P. and Sarmah, T.C. (1979). *Studies on the activity of rumen protozoa*. Zbl. Vet. Med. A, 26. 482-492.
2. Allison, M.J., PhD; Robinson, I.M., MS; Dougherty, R.W., DVM, M.S.; Bucklin, I.A. (1974). *Changes in Microbial Populations in the Cecum and Rumen*. Am. J. Vet. Res., Vol. 36, No. 2.
3. Byerly, T.C. (1977). *Ruminant Livestock, Research and Development*, Science, Vol. 195, pp 450-456.
4. Czerkawski, J.W. (1986). *An introduction to Rumen Studies*. Pergamon international

library of science, technology, engineering and social studies. Printed in Great Britain by A. Wheaton. Co. Ltd., Exeter.

5. Demeyer, D.I. and Van Nevel, C.J. (1979). *Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms*. Br. J. Nutr. 42: 515-524.
6. Demeyer, D.I. (1981). *Rumen microbes and digestio of plant cell walls*. Agr. Environm. 6: 295-337.
7. Demeyer, D.I. and Vervaeke, I. (1984). *Rumen digestion and microbial processes for increasing the feed value of poor quality materials*. OECD Workshop on "Improved Utilisation of Lignocellulosic materials with special reference to animal feed" Braunschweig, 19-21.
8. Demeyer, D.I. and Van Nevel, C.J. (1985). *Influence of substrate and microbial interaction efficiency of rumen microbial growth*. Reproduction, Nutrition, Development, MISC, Papers Landbouwhoges school Wageningen. 11: 31-32.
9. Dukes, H.H. (1984). *Dukes Physiology of Domestic Animals*. 10th ed., M.J. Swenson, ed., Ithaca and London.
10. Hungate, R.E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press. New York and London. 533 pp.
11. Hungate, R.E. (1981). *The role of rumen microbes in ruminant digestion*. Indian J. Vet. Med. 1: 1-20.
12. Kocabatmaz, M. (1980). T.Ü.B.İ.T.A.K. VHAG Proje No. 475. F.Ü. Veteriner Fakültesi.
13. Mimioglu, M., Göksu, K., Sayın, F. (1969). *Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. 2 x 8 Ders kitabı, 150.
14. Ogimoto, K. and Imai, S. (1981). *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 231 pp.
15. Van Soest, P.J. (1982). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O and B Books, Inc. Corvallis, Oregon. 373 pp.