

ISSN-1304-7280



Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi Zoological Record, EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by Zoological Record, EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2020
Cilt / Volume : 17
Sayı / Number : 3

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Aralık 2020

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Dekan)

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Aytaç AKÇAY (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Mukaddes BAREL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

Okt. Mustafa AKGÜL (Erciyes Üniv. Yabancı Diller YO.)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ali AYDIN (İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Aytakin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Assoc. Prof. Dr. Corneliu BRASLASU (Univ. Agricultural Sci. Vet. Med, Bucharest)

Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Gediminas VALKIUNAS (Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Ass. Prof. Dr. Klaus RIEDELBERGER (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ (Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY (Erciyes Üniv. Tıp Fak.)

Prof. Dr. Mustafa GARİP (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oğuz KUL (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oktay GENÇ (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Özcan ÖZGEL (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Rahşan ÖZEN (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Sinan AKTAŞ (Atatürk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Staffan BENSCH (University of Lund, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI (Balıkesir Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Thomas RÜLICHE (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas WITTEK (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Dergisi Editörlüğü

38039-Kayseri / TÜRKİYE

http://ercivet.erciyes.edu.tr

E-posta : ercivet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli/ Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

The Effects of Feeding Time and Stocking Density on Performance of Laying Hens.....	191
Yemleme Zamanı ve Kafes Yoğunluğunun Yumurta Tavuklarında Performans Üzerine Etkisi O. KAHRAMAN, T. BALEVİ, S. DERE, V. KURTOĞLU, E.S. POLAT, M. ÇAM, H.D. ARIK	
Kayseri İlinde Balık Tüketimi ve Tüketici Tercihlerinin Belirlenmesi	200
Determination of Fish Consumption and Consumer Preferences in Kayseri Province B. DENİZ, S. SARIÖZKAN	
The Anesthetic Role of Some Herbal Oils for Zebrafish.....	209
Bazı Bitkisel Yağların Zebra Balıklarında Anestezik Rolü N. SEYİDOĞLU, C. YAGCILAR	
Kadmiyum Uygulanan Farelerde Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması.....	215
The Investigation of the Protective Effect of Resveratrol on Oxidative Stress Levels in Mice Given Cadmium C. IŞIK BİRCAN, O. MERHAN	
The Effect of N-Acetylcysteine on Oxidant/Antioxidant Status in Irradiated Rats.....	221
Radyasyona Maruz Kalan Rattarda Oksidan/Antioksidan Durum Üzerine N-Asetilsistein'in Etkisi M. ÖZCELİK, M. ERİSİR, O. GULER, M. BAYKARA	
Nevşehir İlindeki Kesimhanelerden İzole Edilen <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi ve Vankomisin Dirençliliğinin İncelenmesi.....	227
Molecular Typing of <i>Staphylococcus aureus</i> Isolates Obtained from Slaughterhouses in Nevşehir Province (Turkey) and Investigation of Vancomycin Resistance of The Isolates Ö.T. YILMAZ, H. HIZLISOY	
Nevşehir İli Süt Sığırcılığı İşletmelerinin Yapısı ve Hayvan Besleme Uygulamaları Yönünden Değerlendirilmesi.....	235
Evaluation of Structure of Dairy Cattle Farms and Animal Nutritional Practices in Nevşehir Province Y. SEZER, E. BAYTOK, A. AKÇAY	
Kedi ve Köpek Dokularının Farklı Fiksatiflerle Tespiti ve Histolojik Görünümlerinin Karşılaştırılması.....	242
Fixation and Comparative Histologic Evaluation of Cat and Dog Tissues using Different Fixatives H. ÖZTÜRK GÜRGEN, F. YILDIRIM	
The Comparison of Saturated and Unsaturated Fatty Acid Compositions in Safflower Herbage and Safflower Straw as Alternative Forage for Ruminant.....	248
Ruminantlar için Alternatif Kaba Yem Olarak Aspir Yeşil Otu ve Aspir Samanının Doymuş ve Doymamış Yağ Asiti Kompozisyonunun Karşılaştırılması K. KARA	
İklim mi Hayvancılığı Yoksa Hayvancılık mı İklimi Etkiliyor?.....	255
Does Climate Effecting the Livestock or Livestock Effecting the Climate? S. SARIÖZKAN, M. KÜÇÜKOFLAZ	
The Effect of Supplementation of Betaine on Performance, Carcass Yield and Some Blood Parameters in Broilers.....	260
Broyerlerde Betain İlavasının Performans, Karkas Verimi ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi T. ŞAHİN, O.Ç. ÖZEL, M. ÖLMEZ	
Determination of the Opinions about Physiology Education of the Kırıkkale University Faculty of Veterinary Students.....	268
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Fizyoloji Eğitimi Hakkındaki Düşüncelerinin Belirlenmesi R. KABAKCI, A. A. YIGİT	
Deneysel Etilen Glikol Zehirlenmesi Oluşturulan Ratlarda Myokardiyal Etkilerin Araştırılması.....	275
Investigation of Myocardial Effects in Rats Subjected to Experimental Ethylene Glycol Toxicity B. DOĞAN, V. GÜNEŞ	
The Effects of Laurel Volatile Oil (<i>Laurusnobilis</i> L.) on In Vitro Ruminant Gas Production of Methane Emission, Organic Acids and Protozoa Counts Alfalfa Herbage	283
Yonca Kuru Otonun In Vitro Ruminant Gaz Üretimi, Metan Salınımı, Organik Asit ve Protozoa Sayısı Üzerine Defne Uçucu Yağının (<i>Laurusnobilis</i> L.) Etkisi S.E. ÖNEL, T. AKSU, K. KARA, D. SARIPINAR AKSU	
İzmir İlinde Bulunan Hastalıktan Ari Sütçü Sığır İşletmelerinin Yapısal Özellikleri.....	290
Structural Characteristics of Disease Free Dairy Cattle Farms in Izmir Province O. DOĞAN, B. KOCAOĞLU GÜÇLÜ	
İnkübasyon Çıkış Asitliğinin Geleneksel Olarak Üretilen Süzme Yoğurtların Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi.....	297
The Effect of Incubation Exit Acidity on Some Quality Properties of Traditionally Produced Strained Yoghurt E. YARALI, Ş. ÇETİNER	
Determination of Phenotypic and Genome Characteristics of <i>Chryseobacterium</i> sp. C-204 Strain Isolated from Rainbow Trout.....	303
Gökkuşluğu Alabalıklarından İzole Edilen <i>Chryseobacterium</i> sp. C-204 Suşunun Fenotipik ve Genom Özelliklerinin Belirlenmesi İ.B. SATICIOĞLU, M. DUMAN, S. ALTUN	
Jersey Irkı İneklerde Bazı Çevre Faktörleri ve İklim Koşullarının Döl ve Süt Verimi Özellikleri Üzerine Etkisi.....	312
Effect of Some Environmental and Climatic Conditions on Reproduction and Milk Yield Traits in Jersey Cows H. U. KOÇ, M. UĞURLU	
Milk Traits of Damascus Goats at Different Lactation Stages: 1. Somatic Cell Counts and Milk Quality Parameters	318
Farklı Laktasyon Dönemlerindeki Damascus Keçilerinde Süt Özellikleri: 1. Somatik Hücre Sayısı ve Süt Kalite Parametreleri H. ÖZKAN, A. YAKAN, B. ÇAMDEVİREN, İ. KARAASLAN	
Milk Traits of Damascus Goats at Different Lactation Stages: 2. Fatty Acid Profiles and Related Lipogenic Genes Expression Levels. 325	325
Farklı Laktasyon Dönemlerindeki Damascus Keçilerinde Süt Özellikleri 2. Yağ Asidi Profili ve Onunla İlişkili Bazı Lipogenik Genlerin Ekspresyon Seviyeleri H. ÖZKAN, A. YAKAN, İ. KARAASLAN, B. ÇAMDEVİREN	
DERLEMELER / REVIEW ARTICLES	
Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Uygulamalarında Kullanılan RNA'ların Kalite Kontrolleri ve Önemi.....	334
Quality Controls and Importance of RNAs Used in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Applications A.O.TURGUT, Ö. KORKMAZ AĞAOĞLU	
OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS	
Bir Buzağıda Çoklu Kongenital Anomali Olgusu.....	342
A Case of Multiple Congenital Anomaly in Calf İ. YURDAKUL, M. YALÇIN, Ö. KARATAŞ	



The Effects of Feeding Time and Stocking Density on Performance of Laying Hens

Oğuzhan KAHRAMAN¹, Tahir BALEVİ¹, Süleyman DERE², Varol KURTOĞLU¹,
Esad Sami POLAT¹, Mustafa ÇAM², Huzur Derya ARIK¹

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD, Konya-TÜRKİYE
²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni ABD, Konya-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Oğuzhan KAHRAMAN; E-mail:vetoguzhan90@gmail.com; ORCID:0000-0002-9315-5276
Atıf yapmak için: Kahraman O, Balevi T, Dere S, Kurtoğlu V, Polat ES, Çam M, Arık HD. The effects of feeding time and stocking density on performance of laying hens. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 191-199.

Summary: This study was carried out with 656 Hysex-Brown layer hen with 58 weeks old. 2 x 4 Multifactorial test setup was used. Egg production, daily feed consumption, feed conversion ratio, egg weight, damaged egg ratio, body weight and specific gravity datas were examined in laying hens fed at different times and raised at different stocking density. Hens placed in cages as 412.5 and 495 cm²/hen and formed 8 groups and feeds were given at 06:00, 9:30, 06:00-06:30 and 09:30-13:30h. The trial was continued for 60 days. At the end of the experiment, it was determined that there was a statistically significant difference between the groups in terms of egg production, daily feed consumption and feed conversion ratio (P<0.05), and there was no difference in egg weight, damaged egg ratio, body weight and specific gravity (P>0.05). It was determined that egg production was the highest and feed consumption and feed conversion ratio was the lowest in groups with a frequency of 495 cm²/chicken and fed at one time at 09:30h. Egg production was the lowest and feed conversion ratio was highest in groups with a frequency of 412.5 cm²/hen and fed at 09:30-13:30h. It was also determined that feeding two times at 06:00h and 06:30h increased the feed consumption, but feeding one time at 09:30h decreased the feed consumption.

Key words: Laying hens, feeding time, performance, stocking density

Yemleme Zamanı ve Kafes Yoğunluğunun Yumurta Tavuklarında Performans Üzerine Etkisi

Özet: Bu araştırma 58 haftalık yaşta toplam 656 adet Hysex-Brown yumurtacı tavuk kullanılarak yürütüldü. Araştırmada 2 x 4 multifaktöriyel deneme düzeni oluşturuldu. Farklı zaman ve sıklıkta yetiştirilen tavuklarda yumurta verimi, günlük yem tüketimi, yemden yararlanma oranı, yumurta ağırlığı, hasarlı yumurta oranı, canlı ağırlık ve spesifik gravite verileri incelendi. Kafeslere 412.5 ve 495 cm²/tavuk olacak şekilde yerleştirilen ve 8 grup oluşturulan tavuklara yemler saat 06:00, 09:30, 06:00-06:30; 09:30-13:30'da verildi. Deneme 60 gün sürdürüldü. Deneme sonunda gruplar arasında yumurta verimi, günlük yem tüketimi ve yemden yararlanma oranları bakımından istatistiksel farklılığın olduğu (P<0.05), yumurta ağırlığı, hasarlı yumurta oranı, canlı ağırlık ve spesifik gravite bakımından ise herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edildi (P>0.05). Yerleşim sıklığı 495 cm²/tavuk olan ve saat 09:30'da tek seferde yemlenen gruplarda yumurta veriminin en yüksek, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranının ise en düşük olduğu tespit edildi. Yerleşim sıklığı 412.5 cm²/tavuk olan ve saat 09:30-13:30'da yemlenen gruplarda yumurta veriminin en düşük, yemden yararlanma oranının ise en yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca tavukları 06:00 ve 06:30'da olmak üzere iki öğünde yemlemenin yem tüketimini artırdığı, sabah saat 09:30'da tek seferde yemlemenin ise yem tüketimini azalttığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Kafes yoğunluğu, performans, yemleme zamanı, yumurta tavuğu

Introduction

There are many nutrition and management factors affecting the egg production and quality (Owings, 1981). Feeding the hens in different times of the day and cage density affect production considerably (Taherkhani et al., 2010; Asghar Saki et al., 2012; Soltanmoradi et al., 2014). Cage density means that cage space per bird is decreased when bird numbers are increased per cage, whereas bird population per se means a change in space with increasing bird numbers per cage (Asghar Saki et al., 2012). There

are conflicting results about effects of cage density on poultry production. Reduced cage space has been reported to decrease egg production, egg weight, and feed consumption and increase mortality (Rodenburg et al., 2005). Dorminey and Arscott, (1971), Leeson and Summers, (1984) and Mtileni et al., (2007) reported that eggs produced by birds kept at the high stocking density were heavier than those produced by birds at the low stocking density. However, Anderson and Adams (1992) observed no effect of stocking density (221, 249, 277, and 304 cm² per bird) on body weight when cage population and feeder and drinker spaces were held constant. Asghar Saki et al., (2012) reported that egg weight did not significantly increase by reducing the cage density of hens from 3 to 2 hens per cage. Same results were repor-

ted in other studies (Sohail et al., 2004; Onbasilar and Aksoy, 2005).

Specific gravity may serve as an indicator of egg shell quality and is affected by changing the feeding time (Farmer et al., 1983; Bootwalla et al., 1983; Harm, 1991; Rozempolska-Rucińska et al., 2011). Egg production and body weight are also affected by feeding time (Harms, 1991). According to Iqbal et al. (2017), the egg weight influences specific gravity which reduce with the egg weight increase.

There is not sufficient data about how many times laying hens should be fed in day to optimize profit (Oyedeji et al., 2007). Samara et al. (1996) gave the whole feed to the first group at 07.00h, and to the second group at 18.00h and to the third group at twice a day of which one at 07.00h and the other one at 18.00h. it was found that egg production percentages in the groups were 78.57%, 64.29% and 72.43% in sequence and daily feed consumptions were 151.7, 142.6 and 148.3g respectively. In this study, it was aimed to investigate the effects of feeding time and stocking density on egg production, feed consumption, feed conversion ratio, egg weight, damaged egg rate, body weight and specific gravity of layer hens.

Materials and Method

Animals

A total of 656 58-week-old Hysex-Brown layer hybrids, which were obtained from University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Animal Husbandry and Research Unit, were used in this study. The number of birds were determined according to following sampling calculation:

$$n = \frac{t^2 pq}{d^2}$$

Experimental design

This research was carried out by using 2 x 4 factorial design (2 different stocking density and 4 different feeding time). The animals were randomly allocated into eight groups according to feeding time and stocking density; each of the first four groups, consisting of 8 replicates of 10 layers, were placed into eight cages equalling to 495 cm² per hen. Each of the second four groups, consisting of 7 replicates of 12 layers, was placed into seven cages equalling to 412 cm² per hen. Dimension of each cages used in the study were 55x45x40 cm. Hens were distributed randomly among the different compartments of the cage system. Totally the distribution resulted in 120 cages and 656 laying hens. Experimental period was 60 days.

Daily feed requirements of the birds in 1st and 5th

groups were fed once a day at 06.00h. 2nd and 6th groups were fed at 09:30h once a day. Birds in 3rd and 7th groups were given twice in early morning at 06:00 and 06:30h. 4th and 8th groups were fed twice a day at 09:30 and 13:30h, allocating equal feed amounts in each of the meal time.

Hen-day egg production

Before trial, the hen-day egg production was recorded for 10 days. Egg production were then recorded daily at the same time and calculated as total number of eggs collected divided to total number of hens per day in each group. The collected eggs were classified as "normal" or "damaged"; the latter included the following: broken eggs (an egg with broken shell and destroyed membrane), cracked eggs (an egg with broken shell but intact membrane), the eggs without shell (an egg without shell but with intact membrane).

Egg weight and specific gravity

Egg weight and specific gravity were determined monthly using the methods described by Hamilton (1982) and Hempe et al. (1988).

Feed consumption and feed conversion ratio

Prior to the experiment, enough amounts of the feed for the each subgroup were supplied. Feed and water were given ad libitum to the hens throughout the 60-day experimental period. During the experiment, a hen was given 130 g feed everyday. Subgroups of the first four groups were given totally 1300 g feed/day. Subgroups of the second four groups were given totally 1560 g feed/day. Feed consumption and feed conversion ratio were determined at 7 day intervals. Every week, residual of the feed in all groups were collected and weighed to determine daily feed intake in corresponding periods. Feed conversion ratio was calculated by dividing total feed amount consumed to the total egg weight.

Measurement of the body weight

In the beginning and at the end of the experiment, the subgroups were weighed to determine the difference of changing body weight of the animals during the study.

Nutrient composition of experimental diet

Crude protein, dry matter, ash, crude cellulose, ether extract, Ca and P values of the experimental diet were determined by chemical analysis (AOAC, 2003). Methionine+Cysteine and lysine values of the diet were formulated to meet the NRC, (1994) requirements of layers.

Statistical analysis

For discrete and continuous variables, descriptive

statistics (mean, standard deviation, median, minimum value, maximum value, and percentile) were given. Repeated measures of analysis of variance was analysed by Mauchly's sphericity test and Box's Test of Equality of Covariance Matrices. For comparisons of means of repeated measures Repeated Measures Analysis of Variance was used. If parametric tests (factorial design for repeated measures analysis) does not provide the preconditions, Greenhouse-Geisser (1959) correction or Huynh-Feldt (1976) correction was used for corrections to the Degrees of Freedom or Friedman Test. The Corrected Bonferroni test was used for multiple comparisons. For the significance level of the tests, $P < 0.05$ and $P < 0.01$ were accepted. The statistical software IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. was used for calculations.

Results

Ingredient composition, nutrient analysis results and metabolizable energy of the diet are shown in table 1 and 2.

Table 1. Ingredient composition of the diet on dry matter basis

Ingredients	%
Corn grain	20.31
Wheat grain	48.13
Soybean meal	15.50
Fish meal	1.00
Oil (vegetable)	2.50
Limestone	9.50
Dicalcium phosphate	1.40
Salt	0.25
Vitamin-premix ¹	0.25
Mineral-premix ²	0.10
Methionin	0.06

¹ Per 2.5 kg of vitamin premix contains 3.6 mg vitamin A, 0.05 mg vitamin D3, 30 mg vitamin E, 3 mg vitamin K3, 3 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 5 mg vitamin B6, 0.015 mg vitamin B12, 25 mg niacin, 0.04 mg biotin, 8 mg karotenoid, 1 mg folic acid, 300 mg choline chloride, 50 mg vitamin C.

² Per kg of mineral premix contains 80 mg Mn, 35 mg Fe, 50 mg Zn, 5 mg Cu, 2 mg I, 0.4 mg Co, 0.15 mg Se.

Table 2. The metabolizable energy and nutrient composition of diet (%)

ME, kcal/kg*	2758
Dry matter	90.41
Crude protein	15.53
Ash	8.22
Crude cellulose	5.56
Ether extract	3.26
Ca	3.48
P	0.60
Methionine+Cysteine**	0.54
Lysine**	0.74

*: Obtained by calculation. **: Formulated values to meet the nutrient requirements of poultry (NRC, 1994)

Damaged egg results were not significantly different between all groups ($P > 0.05$). In the first period (0-30 days) average egg production of the groups were found out between 67.09% and 76.28% ($P > 0.05$).

The lowest egg production (67.09%) was found in the 8th subgroup; the highest egg production (76.28%), was found in the 2nd subgroup. In the second period (30-60 days), egg production of the subgroups were found between 67.78% and 75.21% ($P > 0.05$) which the lowest and highest subgroups were the same with previous period. In the 0-60d period evaluation of egg production, the lowest (67.44%) and highest (75.75%) subgroups were significantly different ($P < 0.05$) (Table 3).

When feed consumption and feed conversion ratio of the groups evaluated, there were significant differences between the subgroups ($P < 0.05$). Feeding times did not effect feed consumption and feed conversion ratio ($P > 0.05$). But different stocking density with different feeding times effected performance of hens in 0-30, 30-60 and 0-60 days test periods (Table 4).

Egg weight and specific gravity parameters evaluated at 1st, 30th and 60th days of the trial and were not affected by stocking density and different feeding times in a day ($P > 0.05$) (Table 5).

At the beginning and the ending days of the trial the birds were weighted. There were not significant difference of body weight changes between the groups ($P > 0.05$) (Table 6).

Table 3. Egg production rate and damaged egg rate of the subgroups (Mean±SE)

Subgroups/Factors	Egg production, %			Damaged egg*, %		
	0-30	30-60	0-60	0-30	30-60	0-60
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
1	74.29±2.01	70.79±2.87	72.54±1.75 ^{ab}	1.74±0.51	2.42±0.96	2.08±0.54
2	76.28±1.17	75.21±1.59	75.75±0.97 ^a	1.62±0.38	0.75±0.28	1.88±0.25
3	72.25±2.22	68.48±3.43	70.37±2.04 ^{bc}	2.04±0.51	2.03±0.70	1.76±0.43
4	73.74±1.55	72.49±1.99	73.11±1.25 ^a	2.03±0.51	1.94±0.52	1.99±0.36
5	68.80±2.31	70.20±1.86	69.50±1.46 ^{bc}	2.38±0.62	1.97±0.56	2.17±0.41
6	72.54±2.08	68.77±2.83	70.66±1.76 ^{bc}	1.55±0.45	1.32±0.41	1.44±0.30
7	71.93±2.30	71.70±2.14	71.82±1.54 ^{abc}	2.25±0.35	1.75±0.42	2.00±0.27
8	67.09±2.38	67.78±2.13	67.44±1.57 ^c	1.28±0.16	1.13±0.38	1.21±0.73
SD. 1	74.14±0.89	71.75±1.29	72.94±0.79	1.72±0.24	1.78±0.33	1.75±0.20
SD. 2	70.18±1.14	69.68±1.12	69.92±0.80	1.88±0.23	1.55±0.22	1.72±0.16
Total	72.29±0.73	70.78±0.87	71.53±0.57	1.80±0.16	1.68±0.21	1.74±0.13
P-value	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05
FT1	71.73±1.58	70.51±1.73	71.12±1.16	2.04±0.40	2.21±0.57	2.12±0.34
FT2	74.54±1.18	72.20±1.65	73.37±1.02	1.59±0.29	1.02±0.24	1.30±0.19
FT3	72.09±1.57	70.04±2.04	71.06±1.28	1.85±0.31	1.89±0.41	1.87±0.26
FT4	70.76±1.48	70.38±1.50	70.56±1.044	1.69±0.31	1.58±0.34	1.64±0.23
Total	72.29±0.73	70.78±0.87	71.53±0.57	1.80±0.16	1.68±0.21	1.74±0.13
P-value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

1: 06.00h: 495 cm²/hen, 2: 09.30h: 495 cm²/hen 3: 06.00-06.30h: 495 cm²/hen 4: 09.30-13.30h: 495 cm²/hen 5: 06.00h: 412.5 cm²/hen 6: 09.30h: 412.5 cm²/hen 7: 06.00-06.30h: 412.5 cm²/hen 8: 09.30-13.30h: 412.5 cm²/hen **Damaged egg***: Broken, cracked or shellless eggs **SD. 1**: 495 cm²/hen stocking density **SD. 2**: 412.5 cm²/hen stocking density **FT1**: Once daily feeding at 06.00h **FT2**: Once daily feeding at: 09.30h **FT3**: Twice daily feeding at 06.00-06.30h **FT4**: Twice daily feeding at 09.30-13.30h **a, b, c**: Means within column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 4. Feed consumption and feed conversion ratio of the subgroups (Mean±SE)

Subgroups/Factors	Feed consumption			Feed conversion ratio		
	0-30	30-60	0-60	0-30	30-60	0-60
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
1	117.74±1.78 ^{abc}	121.03±0.97 ^{ab}	119.38±1.03 ^{ab}	2.40±0.06 ^{bc}	2.71±0.09	2.56±0.06 ^{abcd}
2	112.58±1.36 ^d	118.48±1.33 ^b	115.53±1.03 ^c	2.27±0.05 ^c	2.50±0.07	2.39±0.04 ^d
3	119.67±1.21 ^{ab}	122.38±1.09 ^a	121.03±0.83 ^a	2.50±0.07 ^{ab}	2.78±0.13	2.64±0.08 ^{abc}
4	113.72±1.67 ^{cd}	120.54±1.19 ^{ab}	117.13±1.13 ^{bc}	2.33±0.04 ^{bc}	2.61±0.07	2.47±0.05 ^{cd}
5	120.90±1.43 ^a	123.10±0.62 ^a	121.00±0.79 ^a	2.65±0.09 ^a	2.70±0.07	2.68±0.05 ^{ab}
6	114.39±1.40 ^{cd}	121.03±0.99 ^{ab}	117.71±0.99 ^{bc}	2.35±0.05 ^{bc}	2.70±0.08	2.52±0.06 ^{bcd}
7	120.58±1.30 ^a	123.13±0.93 ^a	121.85±0.81 ^a	2.44±0.07 ^{bc}	2.64±0.06	2.54±0.05 ^{abcd}
8	115.48±1.25 ^{bcd}	119.84±0.79 ^{ab}	117.66±0.81 ^b	2.66±0.40 ^a	2.76±0.08	2.71±0.06 ^a
SD. 1	115.93±0.81	120.61±0.59	118.27±0.52	2.38±0.03	2.65±0.05	2.51±0.03
SD. 2	117.83±0.73	121.78±0.44	119.80±0.45	2.52±0.04	2.70±0.04	2.61±0.03
Total	116.82±0.55	121.15±0.38	118.98±0.35	2.45±0.03	2.67±0.03	2.56±0.02
P-value	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05
FT1	119.21±1.17	122±0.61	120.60±0.67	2.52±0.05	2.71±0.06	2.61±0.04
FT2	113.42±0.97	119.67±0.86	116.55±0.73	2.31±0.04	2.60±0.05	2.45±0.04
FT3	120.09±0.88	122.73±0.72	121.41±0.58	2.47±0.05	2.71±0.08	2.59±0.05
FT4	114.54±1.06	120.21±0.73	117.38±0.71	2.48±0.05	2.68±0.05	2.58±0.04
Total	116.82±0.55	121.15±0.38	118.98±0.35	2.45±0.02	2.67±0.03	2.56±0.02
P-value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

1: 06.00h: 495 cm²/hen, 2: 09.30h: 495 cm²/hen 3: 06.00-06.30h: 495 cm²/hen 4: 09.30-13.30h: 495 cm²/hen 5: 06.00h: 412.5 cm²/hen 6: 09.30h: 412.5 cm²/hen 7: 06.00-06.30h: 412.5 cm²/hen 8: 09.30-13.30h: 412.5 cm²/hen **SD. 1**: 495 cm²/hen stocking density **SD. 2**: 412.5 cm²/hen stocking density **FT1**: Once daily feeding at 06.00h **FT2**: Once daily feeding at: 09.30h **FT3**: Twice daily feeding at 06.00-06.30h **FT4**: Twice daily feeding at 09.30-13.30h **a, b, c**: Means within column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 5. Egg weight and specific gravity of the subgroups(Mean±SE)

Subgroups/Factors	Egg weight, g			Specific gravity, g/cm ³		
	First day	30 th day	60 th day	First day	30 th day	60 th day
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
1	64.80±0.67	65.77±0.69	65.29±0.91	1.083±0.001	1.080±0.001	1.083±0.001
2	63.72±0.76	65.21±0.88	64.47±0.80	1.081±0.001	1.081±0.001	1.083±0.001
3	64.96±0.82	64.50±1.26	64.73±0.67	1.080±0.001	1.084±0.003	1.080±0.001
4	63.96±0.83	64.79±1.32	64.38±1.24	1.082±0.001	1.085±0.003	1.086±0.004
5	65.15±0.90	64.74±0.91	64.95±0.90	1.080±0.001	1.080±0.001	1.082±0.001
6	63.66±0.74	65.45±0.79	64.56±0.90	1.080±0.001	1.081±0.001	1.082±0.002
7	64.00±0.95	64.84±0.85	64.42±0.96	1.081±0.001	1.080±0.001	1.081±0.001
8	64.09±0.79	63.66±0.74	63.88±0.94	1.081±0.001	1.080±0.001	1.083±0.001
SD. 1	64.36±0.38	65.07±0.53	64.98±0.46	1.08±0.001	1.082±0.001	1.082±0.001
SD. 2	64.47±0.42	64.67±0.41	65.67±0.46	1.08±0.001	1.081±0.001	1.082±0.001
Total	64.41±0.28	64.88±0.34	65.3±0.33	1.08±0.000	1.081±0.000	1.082±0.001
P-value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
FT1	64.96±0.55	65.29±0.56	65.41±0.64	1.08±0.001	1.082±0.001	1.083±0.001
FT2	63.69±0.53	65.32±0.59	64.40±0.59	1.08±0.001	1.081±0.001	1.083±0.001
FT3	64.98±0.62	64.65±0.78	66.11±0.57	1.08±0.001	1.081±0.001	1.081±0.001
FT4	64.02±0.57	64.26±0.78	65.30±0.79	1.08±0.001	1.082±0.001	1.084±0.001
Total	64.41±0.28	64.88±0.34	65.30±0.33	1.08±0.000	1.081±0.000	1.082±0.001
P-value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

1: 06.00h: 495 cm²/hen, 2: 09.30h: 495 cm²/hen 3: 06.00-06.30h: 495 cm²/hen 4: 09.30-13.30h: 495 cm²/hen 5: 06.00h: 412.5 cm²/hen 6: 09.30h: 412.5 cm²/hen 7: 06.00-06.30h: 412.5 cm²/hen 8: 09.30-13.30h: 412.5 cm²/hen SD. 1: 495 cm²/hen stocking density SD. 2: 412.5 cm²/hen stocking density FT1: Once daily feeding at 06.00h FT2: Once Daily feeding at 09.30h FT3: Twice daily feeding at 06.00-06.30h FT4: Twice daily feeding at 09.30-13.30h

Table 6. Body weights of the subgroups at the begining and end of the experiment(Mean±SE)

Subgroups/Factors	Initial body weight, g	Eventual body weight, g
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
11	1817.50±26.08	1787.50±31.15
12	1800.00±19.46	1726.25±17.62
21	1776.88±20.15	1753.75±35.70
22	1800.00±34.47	1718.13±40.69
31	1770.29±24.47	1706.00±21.22
32	1786.29±28.67	1701.14±16.23
41	1792.43±37.28	1740.29±14.80
42	1758.43±14.48	1682.00±54.36
SD. 1	1798.59±12.51	1746.41±16.17
SD. 2	1776.86±13.21	1707.36±15.24
Total	1788.45±9.12	1728.18±11.37
P-value	>0.05	>0.05
FT1	1795.47±18.46	1749.47±21.61
FT2	1793.60±16.39	1714.53±12.11
FT3	1784.13±19.76	1747.47±19.67
FT4	1780.60±19.74	1701.27±32.49
Total	1788.40±9.12	1728.18±11.37
P-value	>0.05	>0.05

11: 06.00h: 495 cm²/hen 12: 06.00h: 412.5 cm²/hen 21: 09.30h: 495 cm²/hen 22: 09.30h: 412.5 cm²/hen 31: 06.00-06.30h: 495 cm²/hen 32: 06.00h-06.30h: 412.5 cm²/hen 41: 09.30-13.30h: 495 cm²/hen 42: 09.30-13.30h: 412.5 cm²/hen SD. 1: 495 cm²/hen stocking density SD. 2: 412.5 cm²/hen stocking density FT1: Once daily feeding at 06.00h FT2: Once daily feeding at 09.30h FT3: Twice daily feeding at 06.00-06.30h FT4: Twice daily feeding at 09.30-13.30h

Discussion and Conclusion

Egg production

It was generally found out that egg productions of the subgroups of 5 hens in each cage (495 cm²/hen) were higher than that of the subgroups with 6 hens (412 cm²/hen) in each cage, similar to some research findings (Connor and Burton, 1975; Al-Rawi et al., 1976; Mench et al., 1986; Teng et al., 1990; Nagara-jan et al., 1991; Lee and Moss, 1995) and different from the some others (Kivimae, 1976; Mathew et al., 1979). In a study by Mench et al. (1986) hens were put in cages as 1394 cm²/hen, 1394 cm²/2 hens, 2788 cm²/2 hens cage spaces, it was stated that in the group with 1394 cm²/hen floor space, egg production was found to be the highest. Asghar Saki et al. (2012) also reported that egg production was significantly lower in the group 4 hens per cage (500 cm²) than 1 hen per cage (2000 cm²). Sarica et al. (2008) found the similar results with Asghar Saki et al. (2012). They also observed the most egg production in the group having 2000 cm² cage allowance per hen. But in a study conducted by Kivimae (1976), it was found that increasing cage space from 450 to 900 cm²/hen didn't have an important effect on egg production. Canibalismus was not seen in this study. When studies are evaluated it can be said that being more hens in a unit space in the cages decreases the egg production. Insufficient feeding caused by reduced feeding space and stocking density are might be the reasons of reduction of egg production.

There was no significant relationship between egg production and different feeding times or frequencies during the day similar to the results of Bootwalla et al. (1983) and Samara et al. (1996). Samara et al. (1996) found that egg production was decreased when feed total ration were split into two portions as morning and evening feeding. When fed afternoon (16:00h), reduction of egg production in broiler breeder hens were reported (Harms et al., 1991). This decrease might be due to changing ovulation time when fed afternoon (Wilson and Keeling, 1991). But in a study by Balnave (1977) restricted evening feeding of White Leghorns in individual cages was found to increase egg production and Moradi et al. (2013) reported that until 38 wk of age, total hen-day egg production in the broiler breeder hens fed twice and thrice a day was greater.

Feed consumption and feed conversion ratio

In every period of the this study, statistically significant differences were determined among the subgroups in point of feed consumption which were similar to the findings of Lee and Moss (1995) and Teng et al. (1990). At the end of the test, it was found that, when the feed was given at 09:30h to the subgroups with 5 hens, the feed consumption decreased to

115.53 g to compare feeding in early morning. In the subgroups included 6 hens in cages, the lowest feed consumption (117.66 g) was found in the 8th subgroup. The highest feed consumption (121.85 g) was found in the subgroup 7. feeding the hens in the morning before the sun rising once a day at 06:00 h increased the feed consumption average 4 g compared to subgroups fed once a day at 09:30 h instead of feeding the hens at 06.00 h, feeding them twice in the morning as giving half of feed at 06:00 h and the other half of it at 06:30 h. caused average 2 g increases in feed consumption. On the other hand, feeding the hens twice a day as giving half of feed at 9:30 h and the other half of it at 13.30 h caused average 2 g decreases in feed consumption. Similar results were found even in the groups of 6 hens in the cages with respect to feed consumption. Another study has shown that feeding laying hens the required quantity of feed once in a day as against the usual practice of either feeding twice or thrice in day generally resulted in a better laying performance (Oyededeji et al., 2007).

Teng et al. (1990) reported that being more hens in a unit decreased the feed consumption. In this study being more hens in a unit and feeding the hens twice in the morning increased feed consumption and feeding at 09:30h decreased feed consumption. In every periods of the test, the lowest feed consumption rates were obtained from the 2nd subgroup and the highest feed consumption rates were from the 8th subgroup. Feed conversion ratio tended to be decreased as stocking density increased. This result was similar to the findings of Lee and Moss (1995) and Mathew et al. (1979). On the other hand, it was different from the some other results (Kivimae, 1976; Mench et al., 1986). In a test done by Lee and Moss (1995) it was stated that being more hens in a unit floor space in cages, feed conversion ratio tended to be lower. In some other studies (Kivimae, 1976; Mench et al., 1986), increasing cage floor space didn't have any effect on feed conversion ratio of laying hens. In a study conducted by Mathew et al. (1979) hens were allocated 450, 600 and 900 cm²/hen floor space, in the lower stocking density group feed conversion ratio was lower. In this study, generally being more hens in cages caused an increase in feed conversion ratio, feeding the hens at 09:30h in the morning caused a decrease in the feed conversion ratio.

Egg weight

During the experiment egg weight means in the subgroups were found between 63.88 and 65.29 g, and were statistically identical. In some studies (Kivimae, 1976; Mench et al., 1986; Harms, 1991, Wilson and Keeling, 1991), increasing cage floor space for the layer hens didn't have any important effect on egg weight. But Connor and Burton, (1975) reported that increasing hen number in a unit space in the cage affected egg weight a little. But in another research

(Mathew et al., 1979), used cages of 450, 600 and 900 cm²/hen unit space, egg weight was reported to be higher in the lower stocking density group. There are some results that decreased floor densities causes a reduction in egg weight and feed consumption (Onbasilar and Aksoy, 2005; Jalal et al., 2006). On the other hand Sarica et al. (2008) reported no significant difference of egg weights between the 4 different cage density (2000, 1000, 667 and 500 cm² per hen). In this study, different feeding time didn't affect egg weight similar to the results of Samara et al. (1996).

Egg quality

At the end of the experiment, it was determined that damaged egg rates of the 8 subgroups were 2.08%, 1.88%, 1.76%, 1.99%, 2.17%, 1.44% , 2.00% and 1.21%. The highest damaged egg rate was found out in the 5th subgroup. More number of hens in the subgroups might have increased the rate of damaged eggs. The eggs were weighed in water and air and in every period of the test. There was not statistically significant difference amongst the subgroups in point of specific gravity. Similar to these results Al-Ruwi-B.A. (1976) formed 4 groups including 4, 8, 14 and 28 of leghorn hens and 412, 824, 1442 and 2884 cm²/hen floor space for each hen. They reported that there wasn't any significant difference in the egg quality by increasing the group capacity. Mench et al. (1986) and Wilson and Keeling (1991) also didn't find any difference in egg qualities of groups in different cage spaces. Sarica et al. (2008) did not report any cracked and broken egg ratio difference between the 4 different stocking density groups. Also changing the feeding time of broiler breeder hens from morning to evening didn't have significant effect on specific gravity (Mench et al., 1986; Wilson and Keeling, 1991; Samara et al., 1996). But Soltanmoradi et al. (2014) concluded that feeding broiler breeder hens twice or three times per day improves the egg quality. Farmer et al. (1983) and Bootwalla et al. (1983) resulted that feeding one time in afternoon (16:00h) increased specific gravity. Contrast to our results, Wilson and Keeling (1991) concluded that damaged egg rates weren't affected by changing feeding times.

Body weight

There was not any significant differences between the subgroups in terms of body weights. During the test there was not any mortality in the subgroups, Nagarajan et al. (1991) fed quails between 6 and 26 weeks age periods as 150, 180, 210 and 250 cm²/quail cage floor space and reported that when the cage floor space increased, mortality rate had decreased. Mortality rate had also increased when the animal number per cage increased without changing the cage floor space. Sarica et al. (2008) studied with 2000 and 1000 cm² space allowances and they suggested that the higher body weights can be explained

by higher feed consumption and water intake thanks to the greater feeding area and nipple. Onbasilar and Aksoy, (2005) also reported that increasing the number of hens per cage from 1 to 5 decreased body weights of Hy-Line Brown genotypes. Feeding time did not have any effect on body weights in this study but Harms, (1991) found that feeding broiler breeder hens at 16:00 h resulted significant body weight loss to compare feeding at 08:00 h. The differences of the results between studies can be attributed to breed, group size and number of groups regarding to floor space.

As a result; in this study it was found that egg production rate was highest in the groups of 495 cm²/hen cage floor space and the groups were fed at 09:30h once a day, while feed consumption and feed conversion ratio were lowest. In the group of 412.5 cm²/hen cage floor space, and given half of feed at 09:30 h and the other half of it at 13:30 h, egg production rate decreased and feed conversion ratio increased.

Egg production weren't affected significantly by changing feeding time. Splitting the daily feed into 2 portion in early morning was found to increase feed consumption. It seems to be converse relationship between stocking density and feed conversion rate but it wasn't statistically important. Egg weight, egg quality and body weight were affected by changing neither stocking density nor feeding time. Furthermore, time and labour used in feeding hens twice in a day can be saved if hens are fed their feed requirement once daily. Therefore, for optimum laying performance and to control feed waste associated with ad libitum feeding of laying hens, as well as saving time and labouring expended in feeding hen two times daily, we suggest that feeding laying hens the required feed quantity once in a day.

References

- Al-Rawi B, Craig JV, Adams AW. Agonistic behavior and egg production of caged layers: Genetic strain and group-size effects. *Poult Sci* 1976; 55 (2): 796-807.
- Anderson KE, Adams AW. Effects of rearing space and feeder and waterer spaces on the productivity and fearful behavior of layers. *Poult Sci* 1992; 71: 53-8.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Thirteenth Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 2003.
- Asghar Saki A, Zamani P, Rahmati M, Mahmoudi H. The effect of cage density on laying hen performance, egg quality, and excreta minerals. *J Appl Poultry Res* 2012; 21(3): 467-75.
- Balnavé D. The effect of energy restriction on laying

- hens given either a single morning or single evening meal. *Br Poult Sci* 1977; 18(2): 115-9.
- Bootwalla SM, Wilson HR, Harms RH. Performance of broiler breeders on different feeding system. *Poult Sci* 1983; 62: 2321-5.
- Connor JK, Burton HW. Effects of cage population and stocking density on the performance of layers in Queensland. *Aust J Exp Agric and Anim Husb* 1975; 76: 619-25.
- Dorminey RW, Arscott GH. Effect of bird density, nutrient density and perches on the performance of caged White Leghorn layers. *Poult Sci* 1971; 50: 619-24.
- Farmer M, Roland DA, Eckman MK. Calcium metabolism in broiler breeder hens. 2. The influence of the time of feeding on calcium status of the digestive system and egg shell quality in broiler breeders. *Poult Sci* 1983; 62: 465-71.
- Hamilton RMG. Methods and factors that affect the measurement of eggshell quality. *Poult Sci* 1982; 61: 2022-39.
- Hempe JM, Laukx RC, Savage JE. Rapid determination of egg weight and specific gravity using a computerised data collection system. *Poult Sci* 1988; 67: 902-7.
- Harms RH. The influence of changing time of feeding on performance of broiler breeder hens. *Poult Sci* 1991; 70: 1695-8.
- Iqbal J, Mukhtar N, Rehman ZU, Khan SH, Ahmad T, Anjum MS, Umar S. Effects of egg weight on the egg quality, chick quality, and broiler performance at the later stages of production (week 60) in broiler breeders. *J Appl Poultry Res* 2017; 26(2): 183-91.
- Jalal MA, Scheideler SE, Marx D. Effect of bird cage space and dietary metabolizable energy level on production parameters in laying hens. *Poult Sci* 2006; 85: 306-11.
- Kivimäe A. The influence of floor area per hen and the number of hens per cage on the performance and behaviour of laying hens. *Archiv-fur Geflügelkunde* 1976; 40(6): 202-5.
- Lee K, Moss CW. Effects of population density on layer performance. *Poult Sci* 1995; 74(11): 1754-60.
- Leeson S, Summers JD. Effects of cage density and diet energy concentration on the performance of growing Leghorn pullets subjected to early induced maturity. *Poult Sci* 1984; 63: 875-82.
- Mathew PV, Siddiqui SM, Reddy CV. Effect of floor and cage-housing in relation to stocking density on the performance of layers. *Indian J Anim Sci* 1979; 49(10): 822-7.
- Mench JA, Tienhoven AV, Marsh JA, McCormick CC, Cunningham DL, Baker RC, Van TA. Effects of cage and floor pen management on behavior, production, and physiological stress responses of laying hens. *Poult Sci* 1986; 65(6): 1058-69.
- Moradi S, Zaghari M, Shivazad M, Osfoori R, Mardi M. The effect of increasing feeding frequency on performance, plasma hormones and metabolites, and hepatic lipid metabolism of broiler breeder hens. *Poult Sci* 2013; 92(5): 1227-37.
- Mtileni BJ, Nephawe KA, Nesamvuni AE, Benyi K. The influence of stocking density on body weight, egg weight, and feed intake of adult broiler breeder hens. *Poult Sci* 2007; 86: 1615-9.
- Nagarajan S, Narahari D, Jayaprasad IA, Thyagarajan D. Influence of stocking density and layer age on production traits and egg quality in Japanese quail. *Br Poult Sci* 1991; 32(2): 243-8.
- NRC. Nutrient Requirement of Poultry. Ninth Edition. Washington: National Research Council, National Academy Press; 1994.
- Onbasilar TEE, Aksoy FT. Stress parameters and immune response of layers under different cage floor and density conditions. *Livest Prod Sci* 2005; 95: 255-63.
- Owings WJ. Management and nutrition factors affecting egg quality. *South Dakota Poultry Field Day Proceedings and Research Reports* 1981; Paper 11. http://openprairie.sdstate.edu/sd_poultry_1981/11; Accessed Date: 24.02.2020.
- Oyedemi JO, Orheruata AM, Omatsuli M. Effects of feed rationing on the laying performance of 40-weeks in-lay hens. *J Food Agric Environ* 2007; 5 (3/4): 301.
- Rodenburg TB, Tuytens FAM, Sonck B, De Koen R, Lieve H, Johan Z. Welfare, health, and hygiene of laying hens housed in furnished cages and in alternative housing systems. *J Appl Anim Welf. Sci* 2005; 8: 211-26.
- Rozempolska-Rucińska I, Zięba G, Łukaszewicz M, Ciechońska M, Witkowski A, Ślaska B. Egg specific gravity in improvement of hatchability in laying hens. *J Anim Feed Sci* 2011; 20(1): 84-92.
- Samara MH, Robbins KR, Smith MO. Interaction of feeding time and temperature and their relationship to performance of the broiler breeder hen. *Poult Sci* 1996; 75(1): 34-41.

- Sarica M, Boga S, Yamak US. The effects of space allowance on egg yield, egg quality and plumage condition of laying hens in battery cages. *Czech J Anim Sci* 2008; 53(8): 346-53.
- Sohail SS, Bryant MM, Roland DA. Effect of reducing cage density on performance and economics of second-cycle (force rested) commercial Leghorns. *J Appl Poult Res* 2004; 13: 401-5.
- Soltanmoradi MG, Seidavi A, Dadashbeiki M, Laudadio V, Centoducati G, Tufarelli V. Influence of feeding frequency and timetable on egg parameters and reproductive performance in broiler breeder hens. *Avian Biol Res* 2014; 7(3): 153-9.
- Taherkhani R, Zaghari M, Shivazad M, Zare Shahneh A. A twice-a-day feeding regimen optimizes performance in broiler breeder hens. *Poult Sci* 2010; 89(8): 1692-702.
- Teng MF, Soh GL, Chew SH. Effects of stocking densities on the productivity of commercial layers in the tropics. *Singapore J Primary Ind* 1990; 18(2): 123-8.
- Wilson HR, Keeling LJ. Effect of time of feeding on oviposition time and production parameters in broilerbreeders. *Poult Sci* 1991; 70(2): 254-9.



Kayseri İlinde Balık Tüketimi ve Tüketici Tercihlerinin Belirlenmesi*

Berat DENİZ¹, Savaş SARIÖZKAN²

¹Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zootekni ABD., Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği ABD., Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Savaş SARIÖZKAN; E-posta: ssariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID:0000-0003-2491-5152

Atıf yapmak için: Deniz B, Sariözkan S. Kayseri ilinde balık tüketimi ve tüketici tercihlerinin belirlenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 200-208.

Özet: Bu çalışmada Kayseri ilinde balık tüketim tercihleri ve balık tüketimine etki eden sosyal, kültürel, ekonomik faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 2018 yılında basit tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçilen 529 kişiyle yüz yüze görüşme tekniği ile uygulanan anketlerden elde edilen veriler kullanılmıştır. Çalışma verilerinin bir kısmı deskriptif olarak sunulmuş, balık tüketimi üzerine cinsiyetin etkisi bağımsız T-testi ile; medeni durum, gelir ve eğitim düzeyinin etkisi ise tek yönlü varyans analizi (Anova) yapılarak değerlendirilmiştir. Araştırma bulgularına göre tüketicilerin yaş ortalamaları 39.1±12.2 ve ailedeki birey sayıları da 4.1±1.3 olarak belirlenmiştir. Aylık ortalama gelirin 3.399±2.599 TL olduğu ve düşük gelir grubunda (1000-2000 TL/ay) daha az balık tüketildiği tespit edilmiştir (P<0.05). Ayrıca ankete katılanların % 79.2'sinin evli olduğu ve daha fazla balık tükettiği belirlenmiştir (P<0.05). Tüketicilerin eğitim düzeyine paralel olarak balık tüketiminin de arttığı tespit edilmiştir (P<0.05). Yapılan çalışmada ilk sıradaki et tüketim tercihi % 53.1 ile kırmızı et olurken, bunu %35.8 ile beyaz et ve %11.1 ile balık eti izlemiştir. Tüketicilerin tamamına yakını (% 95.5) balığa kolay ulaştığını ve % 52.4'ü balık fiyatlarının normal olduğunu belirtmiştir. Tüketimde balık etinin tercih edilme sebepleri arasında en çok lezzetli olması (% 47.3) ve besin değerinin yüksek olması (% 43.5) gelmektedir. Kayseri'de en çok tercih edilen balık türü hamsi (% 61.1) olurken, kişi başına düşen balık tüketim miktarı 5.56±4.4 kg/yıl olarak hesaplanmıştır. Tüketicilerin çoğu (% 71.5) gelirlerinin artmasının balık tüketimini etkilemeyeceğini, % 28.5'i ise artacağını bildirmiştir. Sonuç olarak, Kayseri ilinde balık tüketim miktarının Türkiye ortalamasına civarında olduğu, balık tüketim düzeyinin medeni durum, eğitim ve gelir seviyesinden etkilendiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Balık, Kayseri, tüketici tercihi, tüketim

Determination of Fish Consumption and Consumer Preferences in Kayseri Province

Summary: In this study, it is aimed to determine the fish consumption preferences and the social, cultural, economic factors affecting the fish consumption Kayseri province. The data obtained through surveys applied face to face interviews with 529 participants chosen with simple random sampling method were used in the study. Some data of the study were presented as descriptive, and the effect of gender, evaluated through Independent T-test, marital status, income and education level on fish consumption was evaluated by means of One Way Anova. As a result, the mean age of the consumers was 39.1±12.2 and the number of the family members was 4.1±1.3. It has been determined that monthly average income is 3.399±2.599 TL and less fish is consumed in the low income (1000-2000 TL / month) group (P<0.05). In addition, 79.2% of the respondents were married and consumed more fish (P<0.05). It was determined that fish consumption increased in parallel with the education level of consumers (P<0.05). In the study, the first consumption preference was red meat with 53.1%, followed by white meat with 35.8% and fish meat with 11.1%. Almost all (95.5%) consumers stated that they reached the fish easily and 52.4% stated that the fish prices were normal. Among the reasons for fish meat being preferred in consumption is that it is the most delicious (47.3%) as well as its high nutritional value (43.5%). Anchovy is the most preferred (61.1%) fish type in Kayseri, while the amount of fish consumption per capita is calculated as 5.56 ± 4.4 kg/year. Most of the consumers (71.5%) reported that increasing their income will not affect fish consumption and 28.5% will increase. In conclusion, the average fish consumption in Kayseri province is close to Turkey's average, and the consumption level is thought to be positively affected by marital status, education level and income level.

Key words: Consumption, consumer preference, fish, Kayseri

Giriş

Dünya nüfusunun hızla artması insan beslenmesinde önemli bir yer tutan hayvansal kökenli gıdaların ve bu

gıdalarda bulunan proteinlerin eksikliğine yol açmakla birlikte, bu eksikliğin kapatılması açısından da ucuz ve kolay ulaşılabilir oluşu sucül kaynaklı ürünleri önemli kılmaktadır (Angiş, 2004). Dünya nüfusunun önemli bir kısmını oluşturan az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hayvansal kaynaklı gıdalarla alınan protein miktarı oldukça azdır. Bu protein açığını kapatılmak için önemli bir potansiyel olan su ürünleri iyi

Geliş Tarihi/Submission Date : 28.01.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 23.06.2020

*Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

bir alternatif oluşturmaktadır (Aydın ve Karadurmuş, 2013).

Avcılık yoluyla yakalanan veya kültürü yapılan balıklar, insan beslenmesinde gerekli temel besin öğelerini içermesi bakımından ve kaliteli hayvansal protein kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir (Sarıözkan, 2016). Sucul kaynaklı ürünler; protein oranının yüksek (%17-22) ve sindirimlerinin kolay olması, doğada bulunan tüm aminoasitleri içermesi, vitamin/mineral bakımından zengin, biyolojik değerliliğinin yüksek olması gibi özellikleriyle insanların sağlıklı ve dengeli beslenmesinde öne çıkan besin kaynaklarıdır (Adıgüzel ve ark., 2009; Olgunoğlu ve ark., 2014; Şen, 2011). Su ürünleri, Dünya Sağlık Örgütü tarafından insan beslenmesi için önerilen esansiyel amino asit modeline uygundur. Balıkların içerdiği ortalama doymuş yağ oranı (% 1.19) ve kalori miktarı (101.3 kcal/100g), karasal kökenli hayvansal ürünlerin içerdiği doymuş yağ oranı (%16.7) ve kalori miktarından (209 kcal/100g) daha düşüktür (Tacon ve Metian, 2013).

Türkiye zengin su kaynaklarına sahip bir ülkedir. Üç tarafı denizlerle çevrili bir yarımada olmasının yanında 8.333 km'lik kıyı şeridinde, 25 milyon hektarlık su kaynağına ve 177.714 km uzunluğunda akarsulara sahiptir. Ülkemizin su kaynakları dikkate alındığında balıkçılık alanlarının etkin bir şekilde kullanılması ve yapılacak üretimin ekonomiye kazandırılması önem taşımaktadır (Sarıözkan, 2016).

Genel olarak su ürünleri tüketimi; ekonomik durum, su ürünleri sunum şekli veya yemek alışkanlıkları/ kültürü gibi faktörlerden etkilenmektedir (Girard ve ark., 1998). Bireyin büyüme ve gelişme dönemlerinde tüketilmesi faydalı olan su ürünlerinin, yemek kültürü veya alışkanlıkları bölgelere göre değişkenlik göstermektedir (Atay, 2000). Türkiye'de insanların hayvansal protein ihtiyacını karşılayacak zengin su kaynakları ve balık çeşitliliği olmasına rağmen, daha önce yapılan çalışmalarda halkımızda genel olarak balık tüketim alışkanlığının çok yaygın olmadığı görülmüştür (Sarıözkan, 2016). Dünya'da kişi başına düşen yıllık ortalama balık tüketimi 18 kg civarında iken, Avrupa ülkelerinde 23 kg, Japonya ve İzlanda'da 60-70 kg'a çıkmaktadır (FAO, 2019). Türkiye'de ise kişi başı balık tüketimi maalesef 5.5 kg/yıl seviyelerine kadar düşmüştür (TÜİK, 2019). Ayrıca ülkemizde bölgeler arasında da tüketim miktarları yönünden önemli farklılıklar göze çarpmaktadır. Türkiye'de kişi başına düşen yıllık balık tüketim miktarı İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde düşükken, Karadeniz, Akdeniz ve diğer kıyı bölgelerinde bu miktar daha yüksektir (Dağtekin ve Ak, 2007; Uzundumlu ve Dinçel, 2015). Örneğin Karadeniz Bölgesi'nde kişi başına yılda 25 kg civarında balık tüketimi olurken, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde bu değer 1 kg'ın bile altına düşmektedir (Atay, 2000).

Yapılan literatür taramalarında Türkiye'de Adıyaman (Olgunoğlu ve ark., 2014), Amasya (Nalinci, 2013), Ankara (Bayraktar, 2015; Yavuz ve ark., 2015; Yüksel ve Diler, 2019), Burdur (Orhan ve Yüksel, 2010), Çanakkale (Bayraktar, 2015; Çolakoğlu ve ark., 2006), Edirne (Onurlubaş, 2013), Elazığ (Çadır, 2012; Çiçek ve ark., 2014; Şen ve ark., 2008), Erzincan (Şen, 2017), Erzurum (Güngör, 2014), Giresun (Aydın ve Karadurmuş, 2013), Isparta (Hatırlı ve Demircan, 2004), İzmir (Çaylak, 2013; Saygı ve ark., 2015), Kahramanmaraş (Beyazbayrak, 2014), Kocaeli (Baydede, 2018), Konya (Bolat ve Cevher, 2018; Şen, 2011), Manisa (Çelik, 2014), Mersin (Şen, 2011; Şen ve Şahin, 2017), Niğde (Bashimov, 2017), Ordu (Aydın ve Karadurmuş, 2012), Rize (Temel, 2014) Sinop (Erümit, 2016), Sivas (İbiş, 2012), Şanlıurfa (Karadağ, 2017), Tekirdağ (Abdikoğlu, 2015), Tokat (Erdal ve Esengün, 2008), Trabzon (Aydın ve Karadurmuş, 2013), Tunceli (Menteşe, 2016; Yüksel ve ark., 2011), Van (Güngör, 2014; Gürgün, 2006) ve Yozgat (Sağlam ve Samsun, 2018) gibi birçok ilde halkın balık tüketim tercihi ile ilgili daha önce bilimsel çalışmalar yapıldığı görülmüştür.

Bu çalışmada Kayseri ilinde yaşayan insanların balık tüketim alışkanlıklarının araştırılması, tüketici tercihlerinin belirlenmesi, balık tüketimine etki eden sosyal, kültürel, ekonomik faktörlerin belirlenmesi, tüketicilerin balık tüketimi hakkında bilgilendirilmesi ve tüketimin artırılması için çözüm önerilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın esas materyalini, 2018 yılında araştırma bölgesi olan Kayseri ilinde yaşayan tesadüfen seçilen 529 kişi ile yüz yüze görüşülerek uygulanan anket (33 soru) yoluyla elde edilen veriler oluşturmuştur. Krejcie ve Morgan (1970)'in örnekleme tablosu dikkate alınarak örnekleme sayısı belirlenmiş ve seçilen örneklemin farklı gelir gruplarını (düşük, orta, yüksek) içermesine dikkat edilmiştir. Anket yapmadan önce bireylere, çalışma hakkında bilgi verilerek iyi bir diyalog kurulması, anketlere daha kolay ve sağlıklı cevap verilmesi sağlanmıştır.

İstatistik analizler

Araştırmada elde edilen veriler elektronik ortama kaydedilmiş, eksik ve hatalı veriler düzenlenerek SPSS 15.0 paket programı ile istatistik analizler yapılmıştır. Çalışmada verilerin bir kısmı tanımlayıcı (sayı, oran, tablo, grafik) olarak sunulmuş, ayrıca balık tüketimi üzerine cinsiyetin etkisi Student T-testi ile; medeni durum, gelir ve eğitim düzeyinin etkisinin olup olmadığı ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark önemli bulunduğunda Duncan's Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır.

Bulgular

Araştırmaya katılan tüketicilerin ortalama aile birey sayıları 4.1±1.3 ve yaş ortalamasının 39±12.2 (erkeklerin 40±12.5; kadınların 36±10.4) olduğu belirlenmiş olup, cinsiyete göre balık tüketim miktarları aşağıda verilmiştir.

31.4'ü memur, %21.4'ü işçi, %18.3'ü serbest meslek, %10.4'ü emekli, %6.6'sı ev hanımı, %0.9'u çiftçi ve geri kalan %11'i ise diğer meslek gruplarından olduğu tespit edilmiştir.

Ankete katılanların medeni durumlarına bakıldığında %79.2'si evli, %19.5'i bekâr ve %1.3'ü ise diğer ola-

Tablo 1. Katılımcıların cinsiyete göre dağılımı ve balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Cinsiyet	n	Oran (%)	Tüketim Miktarı (kg/yıl)	P değeri
Kadın	107	20.2	5.28±0.4	0.703
Erkek	422	79.8	5.75±0.2	
Ortalama	529	100.0	5.56±4.4	

Çalışmada katılımcıların yaklaşık 4/5'ini erkek, geri kalan 1/5'ini ise kadınlar oluşturmuştur. Balık tüketimine cinsiyetin önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (P>0.05). Kayseri genelinde kişi başı ortalama balık tüketimi 5.56 kg/yıl olarak bulunmuştur (Tablo 1).

rak tespit edilmiştir. Evli bireylerin balık eti tüketim miktarlarının, bekar ve diğer bireylere oranla daha fazla olduğu saptanmıştır (P<0.05; Tablo 4).

İncelenen tüketicilerin % 33.1'inin düşük gelire (1000-2000 TL/ay), %12.8'inin ise (5001 TL/ay ve üzeri)

Tablo 2. Tüketicilerin yaş gruplarına göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Yaş Grubu	n	Oran (%)	Tüketim Miktarı (kg/yıl)	P değeri
≤30	154	21.1	5.56±0.34	0.441
31-40	165	31.2	5.26±0.30	
41-50	123	23.2	5.85±0.38	
51-60	56	10.6	6.29±0.68	
61 ve üzeri	31	5.9	6.41±1.04	

Kayseri'de tüketicilerin ortalama yaşı 39.1±12.2 bulunmuş; yaş gruplarına göre balık tüketimleri arasında istatistiki olarak bir fark tespit edilmemiştir (P>0.05). Ancak gençlere göre ileri yaşlarda rakamsal bir artış görülmüştür (Tablo 2).

yüksek gelire sahip olduğu, ortalama gelirin ise 3.399 TL/ay olduğu tespit edilmiştir. Tüketicilerin aylık gelirlerine göre balık tüketimleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Buna göre en yüksek balık tüketimi (7.22 kg) en fazla geliri olan

Tablo 3. Eğitim düzeylerine göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Eğitim durumu	n	Oran (%)	Tüketim Miktarı (kg/yıl)	P değeri
Okuryazar değil	4	0.8	2.25±0.55 ^c	0.013
İlkokul	113	21.3	5.02±0.46 ^{bc}	
Ortaokul	54	10.2	4.60±0.41 ^{bc}	
Lise	147	27.8	5.82±0.33 ^{abc}	
Ön lisans	59	11.2	5.90±0.48 ^{abc}	
Lisans	129	24.4	6.12±0.42 ^{abc}	
Yüksek lisans	18	3.4	7.23±0.79 ^{ab}	
Doktora	5	0.9	10.18±2.72 ^a	

Tablo 3. Eğitim düzeylerine göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Çalışmada tüketicilerin eğitim durumlarına göre balık tüketimleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Eğitim durumuna göre en yüksek balık tüketimi 10.18 kg/yıl ile doktora eğitimi alanlarda tespit edilmiş ve bu yüksekliğin anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır (P<0.05). Genel olarak bakıldığında eğitim düzeyi arttıkça balık tüketim eğiliminin de arttığı, en düşük tüketimin 2.25 kg/yıl ile okuryazar olmayanlarda olduğu belirlenmiştir (P<0.05; Tablo 3).

Çalışmaya katılanların meslekleri incelendiğinde; %

grupta bulunurken, en düşük tüketim ise (5.22 kg) aylık geliri en az olan grupta olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

Kayseri'de tüketicilerin öncelikli et tercihleri incelendiğinde; kırmızı etin %53.1 ile ilk sırayı aldığı, bunu % 35.8 ile beyaz et ve %11.1 ile balık eti takip etmiştir. Toplam et tüketimi içinde balık etinin % 21.5 oranında pay aldığı hesaplanmıştır. Katılımcıların %20.4'ünün hiç balık tüketmediği tespit edilmiştir. Balık tüketiminde bulunanların %95.5'i Kayseri'de istediği balığı kolay ulaştığını beyan etmiştir.

Tablo 4. Tüketicilerin medeni durumuna göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Medeni durumu	n	Oran (%)	Tüketim Miktarı (kg/yıl)	P değeri
Evli	419	79.2	5.92±0.21 ^a	0.033
Bekâr	103	19.5	4.67±0.39 ^b	
Diğer	7	1.3	5.30±1.81 ^b	

Tablo 4. Tüketicilerin medeni durumuna göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ **Tablo 5.** Katılımcıların aylık net gelirlerine göre balık tüketim miktarları $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Aylık net gelir (TL)	n	Oran (%)	Tüketim Miktarı (kg/yıl)	P değeri
1000-2000	175	33.1	5.22±0.35 ^b	0.031
2001-3000	156	29.5	5.60±0.37 ^{ab}	
3001-4000	82	15.5	5.51±0.38 ^{ab}	
4001-5000	48	9.1	5.62±0.51 ^{ab}	
5001+	68	12.8	7.22±0.50 ^a	

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

Tüketicilerin balık fiyatları konusunda düşünceleri incelendiğinde; % 52.4'ü balık fiyatlarını normal olduğunu belirtirken, 51 kişi (%9.6) çok pahalı, 9 kişi (1.7) ise çok ucuz olduğunu belirtmiştir. Çalışmaya katılanların % 5.3'ü balık fiyatlarını ucuz bulurken, %31'i balık fiyatlarının pahalı olduğunu belirtmiştir.

ise %2.3 ile en az tercih edilen satın alma yeri olmuştur.

Balık tüketim şekline göre, %41.1'lik oranla ilk sırada fırında-buğulama tüketim, %39.5 tavada-kızartma ve %17.2'lik oranla ızgarada tüketim tercih edilmektedir.

Tablo 6. Balık eti tercih edilme sebepleri

Balık eti tercih sebepleri	n	Oran (%)
Lezzetli olması	250	47.3
Besin değerinin yüksek olması	230	43.5
Ucuz olması	20	3.8
Alışkanlık	12	2.3
Kolay bulunması	5	0.9
Kolesterolü düşük olması	4	0.8
Diğer	8	1.5

Yapılan çalışmada balık etinin tercih edilme sebepleri arasında en çok lezzetli olması (% 47.3) ve besin değerinin yüksek olması (%43.5) gelmektedir (Tablo 6).

Kayseri'de en fazla tercih edilen balık türü Hamsi olarak belirlenmiş (%61.1), bunu Alabalık (%10.6), Levrek (%10.4), Norveç Somon (%6.0), Çipura (% 5.3) ve İstavrit (%4.3) takip etmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Tüketimde tercih edilen balık türleri ve oranları

Balık türü	n	Oran (%)
Hamsi	323	61.1
Alabalık	56	10.6
Levrek	55	10.4
Norveç Somon	32	6.0
Çipura	28	5.3
İstavrit	23	4.3
Diğer	12	2.3

Diğer taraftan, Kayseri'de balık satın alırken tazeliğin (% 82.2) en önemli kriter olduğu belirlenmiştir. Daha sonra fiyat (%8.7), lezzet (% 6.6) ve besin değeri (% 2.5) gelmektedir.

Ayrıca, katılımcıların %67.9'u daha önce hiç balık avlamadığını, %9.8'i az, %18.3'ü bazen fırsat buldukları avladıklarını, % 2.1'i çok balık avladığını, %1.9'u ise oldukça çok balık avladığını belirtmiştir.

Balık satın alırken tüketicilerin sabit satıcıları tercih etme oranı yüksek bulunmuş (%85.5), onu süper market (%5.1), balık yetiştiricisi (%4.5) ve kendim tutarım (%2.6) seçenekleri izlemiştir. Sokak satıcısı

Tüketicilerin %28.2'si hamsiyi, %21.9'u alabalığı, % 15.5'i Norveç Somon'u, %15.1'i levreği, %9.8'i Çipurayı ve %6.2'si İstavriti daha lezzetli bulduklarını belirtmişlerdir (Tablo 8).

Tablo 8. Lezzetine göre tercih edilen balık türleri ve oranları

Balık türleri	n	Oran (%)
Hamsi	149	28.2
Alabalık	116	21.9
Norveç Somon	82	15.5
Levrek	80	15.1
Çipura	52	9.8
İstavrit	33	6.2
Diğer	17	3.2

Tablo 9. Besin değeri yüksek bulunan ve fiyatı pahalı bulunan balık türleri

Balık türleri	Fiyatı pahalı bulunan türler		Besin değeri yüksek bulunan türler	
	n	Oran (%)	n	Oran (%)
Norveç Somon	343	64.8	174	32.9
Levrek	82	15.5	74	14.0
İstavrit	34	6.4	28	5.3
Çipura	31	5.9	22	4.2
Alabalık	19	3.6	147	27.8
Hamsi	12	2.3	73	13.8
Diğer	8	1.5	11	2.1

Anket çalışmasına katılanların %64.8'i Norveç Somon'u ve %15.5'i Levreği pahalı bulurken; Hamsi ve Alabalık fiyatları daha makul bulunmuştur. Besin değerine göre balık türleri sıralandığında tüketicilerin %32.9'u Norveç Somon'un, %27.8'i Alabalığın, %14.0'ü Levreğin ve %13.8'i Hamsinin besin değerini daha yüksek bulduğunu bildirmiştir (Tablo 9).

olması ve gelişmeye açık bir alan olmasına rağmen toplam su ürünleri üretimi Dünya üretiminden sadece %0.4 pay alabilmektedir (FAO, 2019). Araştırmanın yürütüldüğü Kayseri İli, Türkiye su ürünleri üretiminin %3.7'sini gerçekleştirmektedir (TÜİK, 2019).

Kayseri İlinde balık tüketim tercihleri üzerine yapılmış

Tablo 10. Gelir artışının ve balık fiyatı düşmesinin tüketime etkisi

Cevaplar	Gelir-tüketim ilişkisi		Fiyat-tüketim ilişkisi	
	n	Oran (%)	n	Oran (%)
Hayır, Artmaz	378	71.5	299	56.5
Evet, Artar	151	28.5	230	43.5

Çalışmaya katılanların % 71.5'i gelir durumlarında artış olması halinde balık tüketiminin artmayacağını, % 28.5'i ise geliri artarsa balık tüketiminin de artacağını belirtmişlerdir (Tablo 10).

Tartışma ve Sonuç

Dünya'da su ürünleri üretimi ve yetiştiriciliği, özellikle son 50 yılda en hızlı büyüyen ve gelişen gıda sektörü olarak belirlenmiştir (Dağtekin ve Ak, 2007). Sektörün ivme kazanmasında etkili olan en önemli unsurlar; nüfus ve gelir seviyesindeki artış, avlanma ile sağlanan üretim miktarındaki maksimum artış, bazı tür ve stokların aşırı avlanması, mevsimselliğin su ürünleri avlanmasında önemli olması, yetiştiriciliğin yaygınlaşması ve son yıllardaki biyoteknolojik gelişmeler olarak gösterilebilir (Işıdan, 2006).

Türkiye'de de benzer şekilde sektörde gelişme görülmekte, ancak bunun avcılıktan ziyade sadece yetiştiricilik yoluyla gerçekleşmesi sürdürülebilirlik açısından düşündürücüdür. Türkiye'de üretim potansiyelinin

bu çalışmada katılımcıların çoğunluğunu (%79.8) erkek bireyler oluşturmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da genellikle erkek bireyler çoğunlukta olup (Aydın ve Karadurmuş, 2012; Abdikoğlu, 2015; Temel, 2014; Sağlam ve Samsun, 2018; Bolat ve Cevher, 2018; Erümit, 2016; Erdal ve Esengün, 2008; Yüksel ve Diler, 2019; Nalinci, 2013; Çolakoğlu ve ark., 2006; Aydın ve Karadurmuş, 2013; Yüksel ve ark., 2011; Şen, 2011; Şen ve ark., 2008; Bashimov, 2017; İbiş, 2012; Beyazbayrak, 2014; Çiçek, 2014; Bayraktar, 2015; Karadağ, 2017), az da olsa kadın bireylerin ağırlıkta olduğu çalışmalar mevcuttur (Baydede, 2018; Şen, 2011; Çelik, 2014; Yavuz ve ark., 2015; Çaylak, 2013). Kayseri İlinde cinsiyet faktörü balık tüketimine etkili bulunmadığından, seçilen tüketicinin cinsiyetinin farklı olmasının araştırma sonucunu etkilemeyeceğini göstermektedir. İldeki kişi başına düşen yıllık ortalama balık tüketiminin (5.6 kg) Türkiye geneli ile (5.5 kg) benzerlik göstermesi, gelişmiş iller arasında yer alan (17. sırada) Kayseri'de daha fazla tüketimin gerçekleşebileceğini düşündür-

mektedir (TÜİK, 2019).

Türkiye’de yapılan çalışmalarda yıllık kişi başı balık tüketim miktarları bölgeler ve hatta aynı bölgede bulunan iller arasında bile değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Yıllık ortalama kişi başı balık tüketimi; Karadeniz bölgesinde yaklaşık 25 kg (Aydın ve Karadurmuş, 2013; Temel, 2014; Aydın ve Karadurmuş, 2012), Ege ve Marmara bölgelerinde 15 kg (Abdikoğlu, 2015; Çaylak, 2013; Çolakoğlu ve ark., 2006), Akdeniz bölgesinde 6 kg (Beyazbayrak, 2014; Şen ve Şahin, 2017), Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde 4 kg (Çiçek ve ark., 2014; Güngör, 2014; Olgunoğlu ve ark., 2014; Şen ve ark., 2008; Yüksel ve ark., 2011), İç Anadolu bölgesinde 3-4 kg (Bashimov, 2017; Bolat ve Cevher, 2018; Sağlam ve Samsun, 2018) olduğu görülmüştür. Denize kıyısı olan bölgelerde balık tüketim miktarının yüksek olmasında; balığa ulaşım imkanlarının kolay olması, balık avlama ve tüketim alışkanlıklarının olması ve bu bölgelerde yaşayan bireylerin damak tadı ve tüketim kültürlerinde balığın ön planda tutulmasının etkili olduğu söylenebilir.

Araştırmada elde edilen tüketici yaşının balık tüketimine etkisinin olmadığı tespiti, benzer yaş grubu üzerinde yürütülen çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermiştir (Güngör, 2014; Menteşe, 2016; Nalinci, 2013; Wan ve Hu, 2012).

Katılımcıların medeni durumları incelendiğinde; yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde evli bireylerin katılım oranı yüksek çıkmıştır (Abdikoğlu, 2015; Çelik, 2014; Erümit, 2016; Menteşe, 2016; Nalinci, 2013; Olgunoğlu ve ark., 2014; Güngör, 2014; Yavuz ve ark., 2015). Medeni duruma göre balık tüketim miktarı mevcut çalışmada evli bireylerde önemli düzeyde daha fazla bulunmuştur ($P<0.05$). Evlilikle birlikte düzenli hayat kurulması, çocukların olması, beslenme ve sağlık konusunda artan bilinç ile birlikte tüketimin olumlu etkilendiğini söylemek mümkündür.

Katılımcıların meslek dağılımlarına bakıldığında mevcut çalışmaya en çok katılımın (%31.4) Çolakoğlu ve ark., (2006) ile benzer olarak memur olduğu görülmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda; %37 ile öğrenci (Aydın ve Karadurmuş, 2013), %60 kamu çalışanı (Abdikoğlu, 2015; Baydede, 2018), %33 ev hanımı (Nalinci, 2013), %23 emekli (Bayraktar, 2015) ve %47 ile serbest çalışanlar ilk sırada yer almıştır (Orhan ve Yüksel, 2010).

Türkiye’nin diğer bölge veya illerinde de balık tüketimi üzerinde yapılan benzer çalışmalara rastlanmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda et tüketiminde sıralama tercihleri değişkenlik göstermektedir. Çanakkale, Adıyaman, Van, İzmir, Sivas, Erzincan illerinde yapılan çalışmalarda beyaz et tüketim tercihi olarak ilk sırada yer alırken (Çaylak, 2013; Çolakoğlu ve ark., 2006; Güngör, 2014; İbiş, 2012; Olgunoğlu ve ark.,

2014; Şen, 2017) mevcut çalışma ile benzer olarak Erzurum, Konya, Kayseri, Tunceli, Kahramanmaraş, Ankara, Elazığ illerinde kırmızı et ilk sırada yer almıştır (Beyazbayrak, 2014; Bolat ve Cevher, 2018; Çiçek ve ark., 2014; Güngör, 2014; Soylu, 2018; Yavuz ve ark., 2015; Yüksel ve ark., 2011). Balık eti ise Giresun, Trabzon, İzmir’de tüketim tercihi olarak ilk sırada yer almıştır (Aydın ve Karadurmuş, 2013; Saygı ve ark., 2015). Yapmış olduğumuz çalışmada balık etinin kırmızı et ve beyaz et tüketiminden sonra tercih edilmesinin sebepleri arasında ilin denize kıyısının olmaması, ilde yemek kültürü bakımından kırmızı et ve pastırma, sucuk gibi kırmızı et ürünlerinin öncelikli tercih edilmesi olabilir.

Tüketimi öncelikli olarak tercih edilen balık türü bakımından değerlendirildiğinde ise, çalışma yapılan illerde çoğunlukla hamsi tüketildiği görülmüştür (Aydın ve Karadurmuş, 2012; Aydın ve Karadurmuş, 2013; Bashimov, 2017; Bolat ve Cevher, 2018; Erümit, 2016; Güngör, 2014; Nalinci, 2013; Orhan ve Yüksel, 2010; Sağlam ve Samsun, 2018; Şen ve ark., 2008; Temel, 2014; Yüksel ve Diler, 2019; Yüksel ve ark., 2011). Mevcut çalışmada da hamsi (%61.1) en çok tüketimde tercih edilen balık türü olarak belirlenmiştir. Hamsinin çok tercih edilmesinin nedenleri arasında deniz balığı olması, fiyatının nispeten ucuz olması ve bol olduğuna kolay ulaşılması gösterilebilir.

Kayseri ilinde yapmış olduğumuz çalışmada eğitim düzeyi ve gelir seviyesinin balık tüketim miktarı üzerinde etkili olduğu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Eğitimin ve gelirin artmasıyla birlikte balık tüketiminde yaşanan anlamlı artış, literatürle uyumlu bulunmuştur (Aydın ve ark., 2011; Çadır, 2012; Çolakoğlu ve ark., 2006; Güngör, 2014; İbiş, 2012; Hatırlı ve Demircan, 2004; Orhan ve Yüksel, 2010; Soylu, 2018; Yüksel ve ark., 2011). İslamoğlu (2003), gelir düzeyinin satın alma davranışını doğrudan etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğunu bildirilmiştir. Buna göre, Kayseri halkının gerek eğitim seviyesinin ve gerekse gelir düzeyinin artırılmasının balık tüketimine doğrudan yansıtacağını söylemek yanlış olmayacaktır. Gelir artışı sağlanması, araştırmada balık fiyatını yüksek bulan %40.6 civarındaki tüketicilerin de balık tüketmesini sağlayabilecektir.

Diğer taraftan, yapmış olduğumuz çalışmada tüketicilerin % 85.5’i sabit satıcıdan balık satın aldığını, % 67.9’u hiç avlanmadığını ve %20.4’ü ise hiç balık tüketmediğini beyan etmiştir. Benzer şekilde denize kıyısı olmayan bazı illerde balık tüketmeyenlerin olduğu bildirilmiştir (Beyazbayrak, 2014; Nalinci, 2013; Orhan ve Yüksel, 2010).

Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda balık tüketim tercihi olarak tava-kızartma öne çıkarken (Aydın ve Karadurmuş, 2013; Baydede, 2018; Çolakoğlu ve ark., 2006; Olgunoğlu ve ark., 2014; Orhan ve Yüksel, 2010; Şen, 2017; Yüksel ve Diler, 2019) mevcut

çalışmada Çiçek ve ark., (2014) ile Bayraktar (2015)'in sonuçlarına benzer olarak tüketim tercihi açısından %41.1'i ilk sırada fırında-buğulama şeklinde tüketmeyi tercih etmektedir.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre; Kayseri ilinde balık tüketim kültürünün kırmızı et ve tavuk eti kadar gelişmediği ve tüketimin Türkiye ortalaması kadar olduğu; eğitim ve gelir seviyesi arttıkça balık tüketiminin de arttığı, balık tüketim miktarı üzerinde medeni durumun (evliliğin) da etkili olduğu ortaya çıkmıştır. İl'de balık tüketiminin artırılabilmesi için; tüketicilerin deniz balığını tüketme tercihi balığı taze olarak tüketme tercihi ile bağlantılı olup, avlanma yoluyla elde edilen deniz balıklarının iç bölgelere daha hızlı sevkiyatları yapılarak taze tüketime ve çeşitliliğe olanak sağlanması önem arz etmektedir. Zengin iç su kaynaklarına sahip Kayseri ilinde katılımcıların % 67.9'u balık avlamadığını belirtmiştir. İl genelinde özellikle alabalık üretiminin yoğunlaştığı Pınarbaşı ilçesinde avlanma ile ilgili etkinlikler düzenlenerek avlanma yoluyla balık temini ve tüketimini artırmak düşünülebilir.

Ayrıca iç su kaynaklarınca zengin olan Kayseri ili balık üretim tesislerinin devlet destek ve teşvikleri ile sayılarının artırılarak gerek ülke ekonomisine katkı sağlaması gerekse taze balık tüketmek isteyen Kayseri halkı için önemli bir diğer husustur. Su ürünlerinin işlenmiş hallerinin de tüketilmesinin alışkanlık haline getirilmesi mevsimsel balık tüketim tercihini de etkileyecek olup balık tüketim miktarını da artıracaktır. Bu amaçla gelişen teknoloji imkânlarının kullanılarak tüketimin tüm yıla yayılması adına işlenmiş su ürünleri yönünden halkın bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, gelişen internet teknolojileri kullanılarak tüketimi artırmak amacıyla reklam faaliyetleri, kamu spotları, görsel afişler düzenlenerek daha fazla kişiye ulaşılmasını sağlanmalı, şehir merkezinde yoğunlaşmış olan balık satış noktalarının şehrin farklı noktalarına da kurularak sayılarının ve erişimlerinin artırılması ve özellikle kamuya ait yemekhanelerde yemek listelerinde balığa daha fazla yer verilmesi tüketimi artırabilecektir.

Kaynaklar

- Abdikoğlu Dİ. Tekirdağ ilinde balık tüketim eğilimlerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, NKÜ Fen Bil Ens, Tekirdağ 2015.
- Adıgüzel F, Civelek O, Sayılı M, Büyükbay EO. Tokat ili Almus ilçesinde ailelerin balık tüketim durumu. GOP Üniv Zir Fak Derg 2009; 26(2): 35-43.
- Angiş S. Gökkuşluğu alabalığı'nda soğuk tütsülemenin bazı önemli kimyasal ve duyuşsal özellikler üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üni Fen Bil Ens, Erzurum 2004: s. 36
- Atay D. The export and import arrangements between fishery products sectors of European Un-

ion and Turkey (in Turkish), Dördüncü Su Ürünleri Sempozyum. Haziran,28-30, 2000; Erzurum-Türkiye.

- Aydın H, Dilek MK, Aydın K. Trends in fish and fishery products consumption in Turkey. Turk J Fish Aquat Sci 2011; 11(3): 499-506.
- Aydın M, Karadurmuş U. Consumer behaviours for seafood in Ordu province. Aquaculture Studies 2012; 12(3): 18-23.
- Aydın M, Karadurmuş U. Trabzon ve Giresun bölgelerindeki su ürünleri tüketim alışkanlıkları. Karadeniz Fen Bil Derg 2013; 3(9): 57-71.
- Bashimov G. Niğde ilinde balık eti tüketim alışkanlığının belirlenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bil Derg 2017; 4(2): 196-204.
- Baydede S. Kocaeli ilinin balık tüketimi ve tüketici kararlarını etkileyen faktörlerin araştırılması, Yüksek lisans tezi, SNÜ Fen Bil Ens, Sinop 2018; s. 13-31.
- Bayraktar S. Ankara ve Çanakkale'de su ürünleri tüketim tercihleri ve alışkanlıklarının karşılaştırılması, Yüksek lisans tezi, ÇOMÜ Fen Bil Ens, Çanakkale 2015; s. 13-47.
- Beyazbayrak Z. Kahramanmaraş ili merkez ilçede balık tüketim alışkanlıkları, Yüksek lisans tezi, KSÜ Fen Bil Ens, Kahramanmaraş 2014; s. 19-39.
- Bolat Y, Cevher H. Konya İli (Türkiye) su ürünleri tüketim alışkanlıkları üzerine bir anket çalışması. SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fak Derg 2018; 14(3): 241-52.
- Çadır F. Keban Baraj Gölü ova bölgesi su ürünleri tüketiminin araştırılması. Yüksek lisans tezi, FÜ Fen Bil Ens, Elazığ 2012; s. 14-17.
- Çaylak B. İzmir ili su ürünleri tüketimi ve tüketici tercihleri üzerine bir araştırma. Yüksek lisans tezi, ÇOMÜ Fen Bil Ens, Çanakkale 2013; s. 25-41.
- Çelik R. Manisa ili su ürünleri tüketim ve tercihleri üzerine bir araştırma, Yüksek lisans tezi, İKCU Fen Bil Ens, İzmir 2014; s. 25-47.
- Çiçek E, Akgün H, İlhan S. Elazığ ili balık eti tüketim alışkanlığı ve tercihinin belirlenmesi. Aquaculture Studies (Eski Yunus Araştırma Bülteni) 2014; (1): 1-11.
- Çolakoğlu FA, İşmen A, Özen Ö, Çakır F, Yığın Ç, Ormancı HB. Çanakkale ilindeki su ürünleri tüketim davranışlarının değerlendirilmesi. Ege Üniv Su Ürünleri Derg 2006; 23(3): 387-92.
- Dağtekin M, Ak O. Doğu Karadeniz bölgesinde su

- ürünleri tüketimi, ihracaat ve ithalat potansiyeli. Yunus Araştırma Bülteni 2007; 7(3): 14-7.
- Erdal G, Esengün K. Tokat ilinde balık tüketimini etkileyen faktörlerin logit model ile analizi. Ege Üniv Su Ürünleri Derg 2008; 25(3): 203-9.
- Erümit İ. Sinop İli Gerze ilçesinde balık tüketimi ve balık tüketimini etkileyen faktörler, Yüksek lisans tezi, GOÜ Fen Bil Ens, Tokat 2016; s. 25-40.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org>; Erişim tarihi: 14.11.2019.
- Girard S, Mariajouis C, Paquette P, Wisner-Bourgeois C. An analysis of seafood consumption survey methods in France. Nineth NFET Conference-Tromso, 8-11, July Norway 1998.
- Güngör ES. Erzurum ve Van illerindeki balık tüketimi ve tüketici tercihleri üzerine bir araştırma, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üni Fen Bil Ens, Erzurum 2014; s. 19-54.
- Gürgün H. Van Gölüne kıyısı bulunan bazı ilçelerdeki balık tüketimine yönelik bir araştırma, Yüksek lisans tezi, Ege Üni Fen Bil Ens, İzmir 2006; s. 17-24.
- Hatırlı SA, Demircan, V. Isparta ilinde ailelerin balık tüketiminin analizi. SDÜ İktisadi ve İdari Bilimler Fak Derg 2004; 9(1): 245-56.
- Işıdan H. Önemli bazı viral balık hastalıkları-1. Sümae, Yunus Araştırma Bülteni 2006; 6 (1): 12-14.
- İbiş B. Sivas ili merkez ilçesinde yaşayan bireylerin su ürünleri tüketim davranışlarının değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, GOÜ Fen Bil Ens, Tokat 2012; s. 11-35.
- İslamoğlu AH. Tüketici Davranışları, İstanbul: Beta Yayıncılık, 2003.
- Karadağ A. Şanlıurfa ili merkez ilçesinde yaşayanların su ürünlerine yaklaşımlarının incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Munzur Üni Fen Bil Ens, Tunceli 2017; s. 7-39.
- Krejcie RV, Morgan DW. Determining sample size for research activities. Educ Psychol Meas, 1970; 30: 607-10.
- Menteşe CM. Tunceli ili merkez ilçede ailelerin balık tüketim tercihlerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Tunceli Üni Fen Bil Ens, Tunceli 2016; s. 17-38.
- Nalinci S. Amasya ili merkez ilçedeki hanehalkının et tüketim alışkanlıkları ve et tüketimini etkileyen faktörler, Yüksek lisans tezi, GOÜ Fen Bil Ens, Tokat 2013; s. 49-134.
- Olgunoğlu İA, Bayhan YK, Olgunoğlu MP, Artar E, Ukav İ. Adıyaman ilinde balık eti tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. Gıda Teknolojileri Elektronik Derg 2014; 9(1): 21-5.
- Onurlubaş E. The factors affecting fish consumption of the consumers in Kesan Township in Edirne. Bulgarian J Agr Sci, 2013; 19(6): 1346-50.
- Orhan H, Yüksel O. fishery Product consumption survey in Burdur Province, SDU Journal of the Faculty of Agriculture 2010; 5(1): 1-7.
- Sağlam NE, Samsun S. Yozgat ili su ürünleri tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fak Derg 2018; 14(1): 9-16.
- Sarıözkan S. Türkiye'de balıkçılık sektörü ve ekonomisi. Turk J Fish Aquat Sci 2016; 31(1): 15-22.
- Saygı H, Bayhan B, Hekimoğlu MA. Türkiye'nin İzmir ve Ankara illerinde su ürünleri tüketimi. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Derg 2015; 3(5): 248-54.
- Soylu M. Fish consumption preferences of people living in three different socioeconomic regions of Kayseri, Turkey. Third Sector Social Economic Review 2018; 53(2): 463-76.
- Şen A. Konya ve Mersin il merkezlerinde yaşayan bireylerin balık tüketimi konusundaki alışkanlık ve bilgi düzeylerinin karşılaştırılması, Yüksek lisans tezi, SÜ Sosyal Bil Ens, Konya 2011; s. 38-63.
- Şen B, Canpolat Ö, Sevim AF, Sönmez F. Elazığ ilinde balık tüketimi. Fırat Üniv Fen ve Mühendislik Bilimleri Derg 2008; 20(3): 433-7.
- Şen B. Erzincan ilindeki ailelerin balık tüketim tercihlerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Munzur Üniversitesi Fen Bil Ens, Tunceli 2017; s. 38-63.
- Şen İ, Şahin A. Mersin'de yaşayan tüketicilerin balık tüketim tercihlerini demografik faktörler açısından ele alan bir araştırma. J Econ Admin Sci 2017; 19 (1): 33-46.
- Tacon AG, Metian M. Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. Reviews in Fisheries Science 2013; 21(1): 22-38.
- Temel T. Rize ilinde hanelerin balık tüketimi üzerine etkili olan faktörlerin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üni Fen Bil Ens, Erzurum 2014; s. 37-62.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). <http://www.tuik.gov.tr>; Erişim tarihi: 04.02.2019
- Uzundumlu AS, Dinçel E. Trabzon İli Beşikdüzü İlçe-

sinde balıketi tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. Alinteri Zirai Bil Derg 2015; 29 (B): 1-11.

Wan W, Hu W. At-home seafood consumption in Kentucky: A double hurdle model approach. Southern Agricultural Economics Association Annual Meeting, February, 4-7, 2012; Birmingham, AL-England.

Yavuz G, Yasan Ataseven Z, Gül U, Gülaç ZN. Factors affecting consumer preferences on seafood consumption: The case of Ankara. Yunus Research Bulletin 2015; 1: 73-82.

Yüksel E, Diler A. Ankara İlinde su ürünleri tüketim tercihlerinin belirlenmesi. Aydın Gastronomy 2019; 3(1): 11-21.

Yüksel F, Kuzgun NK, Özer Eİ. Tunceli ili balık tüketim alışkanlığının belirlenmesi. Karadeniz Fen Bil Derg 2011; 3(2):5, 28-36.



The Anesthetic Role of Some Herbal Oils for Zebrafish

Nilay SEYIDOĞLU¹, Cetin YAGCILAR²

¹Tekirdag Namik Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Tekirdag, Turkey

²Tekirdag Namik Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Tekirdag, Turkey

Correspondance author: Nilay SEYIDOĞLU; E-mail: nseyidoglu@nku.edu.tr; Orcid ID: 0000-0002-2817-5131

How to cite: Seyidoglu N, Yagcilar C. The anesthetic role of some herbal oils for zebrafish. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 209-214.

Summary: Anesthetics have been important in ornamental fishes for transport and restriction of behaviors as well as for surgical applications and studies in science. Also, more economical and appropriate anesthetics can be common choice for these situations. In the study, a total of two hundred and fifty two zebrafish (forty two females and forty two males in each group) divided in three groups were studied as group A (Anise oil); group T (Thyme oil); group M (Mint oil). Anesthesia intake and lethal dose values were determined by following the anesthetic entry and recovery times. There was no anesthetic effect in group A, while anesthetic effects occurred in groups T and M in concentrations 1, 5, 10, 20 and 30 mg/l. Similarity was found in groups T and M in terms of anesthesia entry and recovery times ($P>0.05$). Nevertheless, no mortality occurred in group M. However, 5mg/l thyme oil anesthesia was determined to cause 50% mortality in male fishes (group T). It was also observed that mint oil has an anesthetic effect on zebrafish with increasing doses determined by anesthesia entry and recovery times (group M, $P<0.05$). Thereby, mint oil may be an alternative herbal anesthetic agent for zebrafish. However, further studies are necessary to show the herbal anesthetics effect on ornamental fishes.

Key words: Anise oil, mint oil, thyme oil, zebrafish

Bazı Bitkisel Yağların Zebra Balıklarında Anestezik Rolü

Özet: Süs balıklarında anestezikler, taşıma ve davranışların azaltılmasında olduğu gibi cerrahi müdahale ve bilimsel çalışmalarda da önemlidir. Genellikle daha uygun ve ekonomik anestezikler seçilmektedir. Çalışmada toplam ikiyüz elli iki adet (her grupta kırk iki dişi ve kırk iki erkek) zebra balığı üç gruba ayrıldı; grup A (Anason yağı), grup T (Kekik yağı) ve grup M (Mentol yağı). Anesteziye giriş ve lethal dozlar, anesteziye giriş ve çıkış sürelerine göre değerlendirildi. Çalışma sonunda grup A'da bulunan balıklarda anestezi görülmezken T ve M gruplarında 1, 5, 10, 20 ve 30 mg/l konsantrasyonlarında anestezik etkiler gözlemlendi. Anesteziye giriş ve çıkış süreleri bakımından grup T ve M'de istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmedi ($P>0.05$). Ayrıca grup M'de hiç ölüm gözlenmedi. Ancak, 5 mg/l kekik yağı anestezisinin erkek balıklarda (grup T) %50 oranında ölüme neden olduğu belirlendi. Mentol yağının ise artan dozlarına bağlı anesteziye giriş ve çıkış süreleri değerlendirilerek anestezik etki oluşturduğu belirlendi (grup M, $P<0.05$). Bu nedenle mentol yağı, zebra balıklarında alternatif bir bitkisel anestezik madde olarak kullanılabilir. Süs balıklarında bitkisel anesteziklerin etkilerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Anason yağı, mentol yağı, kekik yağı, zebra balığı

Introduction

Anesthetics have been used for reducing stress and protecting from death which are associated with transport, catching, measuring, weighing, vaccination, sampling, photographing and surgical applications of ornamental fishes (Summerfelt and Smith, 1990; Weber et al., 2011). According to the selection criteria of anesthetics, rapid entry and exit time of anesthesia are important as well as the anesthetic agents. Anesthetic agents, which are expected to have no residues in tissues, should be effective in low concentrations, and toxic dose range should be

wide. Also an ideal anesthetic agent should be low-cost, easily applicable, and available.

The most known anesthetic for ornamental fishes is Trikaïn Methane sulphonalfanate-Trikaïn (MS222) however, it must be used with sodium bicarbonate buffer to balance the water pH (Serezli et al., 2005). Although Food Drug Administration (FDA) limits its usage for human health, it is still used for fish anesthesia. Some researchers reported that MS222 decreases the heart rate and increases the mortality of zebrafish (Huang et al., 2010). Also, Deebani et al., (2019) determined that MS222 may cause vasoconstriction and change the blood parameters. Nevertheless, nowadays, plant derived anesthetics have been preferred due to their several positive effects (Sharif Rohani et al., 2008; Metin et al., 2015). Metin et al. (2015) determined that 200mg/l dose mint oil

can be used for rainbow trout safely. It was also reported that 3, 5 and 7 ml/l dose of mint oil was found effective on carps (Roohi and Imanpoor, 2015). However, the number of studies on mint oil anesthesia with different species of fishes such as spotted-sorubim, bass and tambaqui is limited (Façanha and Gomes, 2005; Souza et al., 2012; Sanchez et al., 2014). The researchers also indicated that carvone, which is a compound of mint oil, has the anesthetic efficiency. Another plant derived anesthetic agent named thyme oil has been used as a medicinal banded for human through modern medicinal science (Baydar et al., 2004). Azad et al. (2014) explained that thyme oil has a protective role on immunity after anesthesia, and they also indicated that there is a need for further studies for this purpose. Anise oil known as a sedative, antispasmodic and antibacterial, and also has attracted attention with its essential oil contents in recent years. It was reported that alcoholic extracts and oils of anise may relax the muscles by antagonist action against contraction of different organs (Reiter and Brandt, 1985).

In recent years, Zebrafish has been an important species of ornamental fish used in studies on cancer, toxicology, medicine and genetics because of its anatomical structure, survival rate and easy nutrition (Spitsbergen and Kent, 2003; Hengartner and Horvitz, 1994). In this sense, aquaculture of Zebrafish to provide better quality and more economy has gained importance.

The purpose of this study was to assess the anesthetic effects of anise, thyme and mint oils in zebrafish. We also focused on the appropriate doses of these plant-derived anesthetics for entry and recovery times of anesthesia. There exist no data regarding the use of these oils for anesthesia, although they are used in medicinal studies if limitedly. We hope this study will improve our awareness of the effects of all these anesthetic agents for ornamental fish and scientific studies.

Material and Methods

Ethics statement

All procedures were carried out under ethics licence (Ethical no: T2018-7) approved by the

National Competent Authority for Animal Research in Tekirdag Namik Kemal University.

Animals and housing

The research was carried out in the Tekirdag Namik Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Fisheries and Diseases Laboratory. Totally two hundred and fifty two zebrafish divided into three groups (n=84; male and female; age, 4 month) were studied as groups; group A (Anise oil); group T (Thyme oil); group M (Mint oil). The animals were acclimatized for seven days in a system tanks of 50 L with water (in 26 to 28 °C water, conductivity, 500 to 600 µS; pH, 8 to 8,2; hardness, 80 ppm; alkalinity, 80 ppm; dissolved oxygen, greater than 8 ppm; ammonia, 0 ppm; nitrate, 10 to 30 ppm; and nitrite, 0 ppm), in a room with a 12:12-h light-dark cycle. Feeding was carried out with an *ad libitum* commercial diet (Bioaqua) twice daily.

Experimental design

The experiment was conducted in 3 L of water in an aquarium with a volume of 5 litres. The anesthetic agents anise oil, thyme oil and mint oil were diluted in 99.8% ethanol, resulting in a concentrated solution 1:9. The experiment was executed with each twelve fishes (six male and six female) based on the 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 and 30 mg/l concentrations of anesthetic solutions. Within the trial design, three anesthetics groups were studied as two replications (in twenty-one day of quarantine) which was modified from literatures (Chen et al., 2014; Masoumeh and Masoumeh, 2018). The anesthesia stages were analysed in three parts; first entry time of anesthesia, time of anesthesia and exit time from anesthesia. Anesthesia intake and lethal dose values were determined by following the anesthetic entry and exit times. After the induction period, exit times were evaluated, so the animals were removed from anesthesia tank and transferred to another aquarium containing anesthetic free water. Physiological responses such as respiration and behavior were also observed. The different stages of the anesthesia were described according to Cunha (2015) (Table 1). The behavioral patterns was monitored by a digital stopwatch and for 48 hours the animals were put back to an aquarium

Table 1. Behavioral characteristics observed in entry and recovery stages of anesthesia (Cunha, 2015)

Stage	Anesthesia entry	Recovery (exit)
I	Normal reaction to external stimuli Partially decrease of swimming motion	Slight movements in the opercular Slight swimming motion
II	Loss of muscle movement and balance Decreased respiration rate Decreased responses to external stimuli	Mild responses to external stimuli Balance recovery
III	No responses to stimuli Opercular movement absent Total loss of reflexes to external stimuli Immobility at the bottom of aquarium	Normal movement and swimming balance (Full recovery)

(80*35*45 cm) for monitoring mortality with feeding, ventilation and filtration.

Statistical analyses

The results were analyzed with Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 (Chicago, IL, USA). Data were tested for normality distribution and variance homogeneity assumptions. All the values were grouped, and the means and standard errors were calculated. One-way ANOVA was applied to all parameters of females and males to examine the difference between anesthesia doses. If the difference between groups proved to be significant (P<0.05), differences were evaluated with Tukey's test. On the other hand, in non-homogenous groups, differences between means were analyzed with Kruskal Wallis and following Mann Whitney U test between groups one by one. Also, statistical analysis of either anesthesia entry or recovery times between females and males were determined with Independent samples T-test, which considered P<0.05 to be significant.

Results

The chemical and physical parameters of water were 8.05±0.04 for pH, 26.87±0.16 C for temperature and 8.27±0.18 for oxygen. The difference in body length and weight between males and females is considered to be the natural result of gender although they are peer research material (Table 2).

was occurred in fishes which were anesthetized by thyme oil (group T). Also, there is no sedation occurred in group T concentrations 0.1 and 0.5 mg/l and in group M concentrations 0.1, 0.5, 1 and 5 mg/l.

When the gender differences were considered, anesthesia entry and recovery times were found to be similar between males and females in group T (Table 2). However, males were found more sensitive than female ones to recovery times. While all the males could not recover from anesthesia in concentration of 10 mg/l of thyme oil, female fishes reached recovery without mortality. Nevertheless, mortality occurred in a concentration of 20 mg/l thyme oil with ratio %100 of females (Tables 3-4).

There was no mortality in group M. The anesthesia entry times were found similar in the groups of females and males for concentrations of 10mg/l, 20mg/l and 30mg/l of mint oil (P:0.839, P:0.347, P:0.242, respectively 10mg/l, 20mg/l and 30mg/l concentrations). Also, males were more sensitive than females. Although no difference was found between females and males of anesthesia entry times, the anesthesia recovery times in concentration 20mg/l and 30mg/l were found higher in the males than in the females statistically (Table 5, P:0.04, 20mg/l: 68.50±10.60sec - 215.00±21.63sec; P:0.01, 30mg/l: 162.75±10.44sec - 192.13±24.35sec, respectively the females and males). Furthermore, in the females, anesthesia entry times were found statistically different by increasing concentrations of mint oil (Table 6, P<0.0001,

Table 2. Anesthesia entry and recovery times (sec) of zebrafish with different concentrations of thyme oil added in aquarium water

		Female (mean±SEM)	Male (mean±SEM)	P values
Weight (g)		0.78±0.05	0.64±0.04	0.60
Total length (cm)		3.69±0.08	4.01±0.07	0.19
Anesthesia entry time (sec)	1 mg/l	51.14±1.72	36.00±1.63	0.90
	5 mg/l	39.63±2.96	34.13±4.13	0.37
	10 mg/l	27.00±1.73	37.00±1.73	1.00
Anesthesia recovery time (sec)	1 mg/l	45.43±1.36	17.86±1.91	0.47
	5 mg/l	139.88±34.47	199.63±41.25	0.51
	10 mg/l	225.63±24.41	-	-

In the study, neither anesthetic effect nor mortality was occurred in group anise oil (group A). Although there was no mortality in group M (mint oil), mortality

40.71±3.69sec, 26.88±1.66sec and 20.38±1.08sec, respectively 10mg/l, 20mg/l and 30mg/l). On the other hand, in the female, no differences was found between concentration 10mg/l (65.00±5.67sec) and

Table 3. Anesthesia entry and recovery times of female zebrafish with different concentrations of thyme oil

Anesthesia Doses	Anesthesia entry time (sec) (mean±SEM)	Anesthesia recovery time (sec) (mean±SEM)
1 mg/l	51.14±1.72 ^a	45.43±1.36 ^a
5 mg/l	39.63±2.96 ^b	139.88±34.47 ^b
10 mg/l	27.00±1.73 ^c	225.63±24.41 ^c
P values	<0.0001	<0.0001

^{a,b,c} Means with different superscripts in the same column differ at P<0.05.

Table 4. Anesthesia entry and recovery times of male zebrafish with different concentrations of thyme oil

Anesthesia Doses	Anesthesia entry time (sec) (mean±SEM)	Anesthesia recovery time (sec) (mean±SEM)
1 mg/l	36.00±1.63	17.86±1.91 ^a
5 mg/l	34.13±4.13	199.63±41.25 ^b
10 mg/l	37.00±1.73	-
P values	0.65	0.001

^{a,b} Means with different superscripts in the same column differ at P<0.05.

Table 5. Anesthesia entry and recovery times (sec) of zebrafish with different concentrations of mint oil

		Female (mean±SEM)	Male (mean±SEM)	P values
Weight (g)		0.70±0.04	0.51±0.04	1.49
Total length (cm)		3.50±0.11	3.49±0.13	0.45
Anesthesia entry time (sec)	10 mg/l	40.71±3.69	40.00±4.23	0.84
	20 mg/l	26.88±1.66	31.00±2.07	0.35
	30 mg/l	20.38±1.08	20.25±1.66	0.24
Anesthesia recovery time (sec)	10 mg/l	65.00±5.67	64.29±5.92	0.85
	20 mg/l	68.50±10.60 ^a	215.00±21.63 ^b	0.04
	30 mg/l	162.75±10.44 ^a	192.13±24.35 ^b	0.01

^{a,b} Means with different superscripts between females and males, differ at P<0.05.

Table 6. Anesthesia entry and recovery times of female zebrafish with different concentrations of mint oil

Anesthesia Doses	Anesthesia entry time (sec) (mean±SEM)	Anesthesia recovery time (sec) (mean±SEM)
10 mg/l	40.71±3.69 ^a	65.00±5.67 ^a
20 mg/l	26.88±1.66 ^b	68.50±10.60 ^a
30 mg/l	20.38±1.08 ^c	162.75±10.44 ^b
P values	<0.0001	0.001

^{a,b} Means with different superscripts in the same column differ at P<0.05.

Table 7. Anesthesia entry and recovery times of male zebrafish with different concentrations of mint oil

Anesthesia Doses	Anesthesia entry time (sec) (mean±SEM)	Anesthesia recovery time (sec) (mean±SEM)
10 mg/l	40.00±4.23 ^a	64.29±5.92 ^a
20 mg/l	31.00±2.07 ^a	215.00±21.63 ^b
30 mg/l	20.25±1.66 ^b	192.13±24.35 ^b
P values	0.001	0.001

^{a,b} Means with different superscripts in the same column differ at P<0.05.

20mg/l (68.50±10.60sec) for anesthesia recovery time, although 30mg/l (162.75±10.44sec) concentration of mint oil was found significantly different (Table 6, P:0.001). Nevertheless, in the males, only the concentration of 30mg/l mint oil was found significant among anesthesia entry times (Table 7, P:0.001, 10mg/l, 20mg/l and 30mg/l, respectively, 40.00±4.23sec, 31.00±2.07sec and 20.25±1.66sec). Also, anesthesia recovery times in 20mg/l (215.00±21.63sec) and 30mg/l (192.13±24.35sec) of mint oil, statistically different than 10mg/l

(64.29±5.92sec) in males (P:0.001).

Discussion and Conclusion

Anesthetic agents can be used for operation, sedation and reducing stress (Neiffer and Stamper 2009; Sisecioglu et al., 2009). Also, to slow down the reflexes and remove consciousness are important for transport as well as for scientific studies of ornamental fishes. In this study, we found that although anise oil has only a sedative effect, both thyme oil and mint

oil have anesthetic efficiency on zebrafish. Besides, in the study, water was blurred due to anise oil, so this situation could not give a choice to use this herbal for either sedation or anesthesia. Nevertheless, it was determined that mortality had a high ratio in concentration 10mg/l of thyme oil anesthesia. Also, males had more sensitivity than females due to death ratio in group thyme oil (group T). However, although 5 mg/l (LD50) and 10 mg/l (LD100) concentration of thyme oil was detected lethal dose for males, mortality in the females occurred in concentrations 10 mg/l (LD50) and 20 mg/l (LD100). Although there was no difference observed in anesthesia entry times in group thyme oil in the males, decreased times were observed in increasing concentrations significantly in females. On the other hand, significant recovery times were observed in increased concentrations in both females ($P<0.0001$) and males ($P:0.001$). Females entered anesthesia more quickly with increasing dose of thyme oil. It was stated that the concentration of 10 mg/l noted the highest entry and recovery time from other concentrations (entry times for 1mg/l, 5mg/l and 10mg/l respectively 51.14 ± 1.72 sec, 39.63 ± 2.96 sec and 27.00 ± 1.73 sec – $P<0.0001$; recovery times for 1mg/l, 5mg/l and 10mg/l respectively 45.43 ± 1.36 sec, 139.88 ± 34.47 sec and 225.63 ± 24.41 sec – $P:0.001$). On the other hand, although no difference was observed in the males for anesthesia entry times, significant difference ($P:0.001$) was found in recovery time between concentrations 1mg/l (17.86 ± 1.91 sec) and 5 mg/l (199.63 ± 41.25 sec). Based on our results, it's thought to that thyme oil could not be a good and safe anesthetic agent for zebrafish. However, in a study with grass carps, it was reported that thyme oil might be a better anesthetic agent (Masoumeh and Masoumeh, 2018). Nevertheless, further studies are necessary to identify the thyme oil efficiency in fish anesthesia.

There was no mortality in group mint oil (group M) in both males and females. Also, there was no significant difference in anesthesia entry times between females and males. However, recovery times in males were longer than females in concentrations 20mg/l and 30mg/l than 10 mg/l ($P:0.01$). Metin et al. (2015) reported that mint oil anesthesia in concentration 200mg/l was effective and safe for rainbow trout. Roohi and Imanpoor (2015) detected that 3, 5 and 7ml/l oil mint oil concentrations may be useful for carp. They also indicated that carvone content in mint oil was important during anesthesia procedure. In our study, it could be said that concentrations 10, 20 and 30 mg/l of mint oil may be used safely for zebrafish and thereby ornamental fishes. However, Rezende et al. (2017) observed that mint oil anesthesia should not be recommended for sedation and handling due to their adverse effects on behaviors. On the other hand, Spanghero et al., (2019) reported that 80mg/l peppermint oil has an anesthetic effect on silver cat-

fish. Also, it has been proven as an anesthetic for tropical fishes as sorubim or tambaqui according to some researches (Façanha and Gomes, 2005; Sanchez et al., 2014).

Nowadays, choice of anesthetics in ornamental fishes depend on cost, availability, administration procedure and recovery rates. Also, herbal anesthetic agents have been used as an alternative to chemical ones which are risky for health and economically unfavorable. Especially mint oil may be the most appropriate herbal anesthetic agent. Nevertheless, there is limited study about herbal anesthetics, their usages and also effects on species of ornamental fishes. Thereby it is necessary further studies to identify the herbal anesthetics and their usages for ornamental fishes.

References

- Azad IS, Al-Yaqout A, Al-Roumi M. Antibacterial and immunity enhancement properties of anaesthetic doses of thyme (*Thymus vulgaris*) oil and three other anaesthetics in *Sparidentax hasta* and *Acanthopagrus latus*. J King Saud Univ Sci 2014; 1(1): 101-6.
- Baydar H, Sagdic O, Ozkan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control 2004; 15: 169-72.
- Chen K, Wang CQ, Fan YQ, Xie YS, Yin ZF, Xu ZJ, Zhang HL, Cao JT, Han ZH, Wang Y, Song DQ. The evaluation of rapid cooling as an anesthetic method for the zebrafish. Zebrafish 2014; 11(1):71-5.
- Cunha L, Geraldo A, Silva V, Cardoso M, Tamajusuku A, Hoshiba M. Clove oil as anesthetic for guppy. Bol Inst Pesca 2015; 41: 729-35.
- Deebani A, Iyer N, Raman R, Jagadeeswaran P. Effect of MS222 on hemostasis in Zebrafish. JAALAS 2019; 58(3): 390-6.
- Façanha MF, Gomes LC. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). Acta Amazonica, Manaus 2005; 35(1): 71-5.
- Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Genet Develop 1994; 4: 581-6.
- Huang WC, Hsieh YS, Chen IH, Wang CH, Chang HW, Yang CC, Ku TH, Yeh SR, Chuang YJ. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. Zebrafish 2010; 7: 297-

304.

Masoumeh E, Masoumeh B. Effects of four anesthetics, clove extract, thyme extract, lidocaine, and sodium bicarbonate on the blood parameters and cortisol amount in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*). J Marine Biol Aquacult 2018; 4(1): 1-4.

Metin S, Didinen BI, Kubilay A, Pala M, Aker I. Determination of anesthetic effects of some medicinal plants on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). LIMNOFISH 2015; 1(1): 37-42.

Neiffer DL, Stamper MA. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. ILAR J 2009; 50(4): 343-60.

Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. Drug Res 1985; 35: 408e414.

Rezende FP, Pascoal LM, Vianna RA, Lanna EAT. Sedation of Nile tilapia with essential oils: tea tree, clove, eucalyptus, and mint oils. Rev Caatinga Mossoró 2017; 30(2): 479-86.

Roohi Z, Imanpoor MR. The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. Aquacult 2015; 437: 327-32.

Sanchez MSS, Rodrigues RA, Nunes AL, Oliveira AMS, Fantini LE, Campos CM. Respostas fisiológicas de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a anestésicos naturais. Semina: Ciências Agrárias, Londrina 2014; 35(2): 1061-70.

Serezli R, Okumuş İ, Akhan S. Anaesthetics in aquaculture. Turk J Fish Aquatic Life 2005; 4: 475-80.

Sharif Rohani M, Haghghi M, Assaeian H, Lashtoo Aghaee GR. A study of the anesthetic effect of Zataria multiflora Boiss essence on *Oncorhynchus mykiss* and cultured *Salmo trutta caspius*. Iran J Fish Sci 2008; 16(4): 99-106.

Sisecioglu M, Cankaya M, Gulcin I, Ozdemir M. The inhibitory effect of propofol on lactoperoxidase. Protein Pept Lett 2009; 16: 46-9.

Souza RAR, Carvalho CVA, Nunes FF, Scopel BR, Guarizi JD, Tsuzuki MY. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. Bol Inst Pesca, São Paulo 2012; 38(3): 247-55.

Spanghero DBN, Spanghero ECAM, Pedro, JS, Chagas EC, Chaves FCM, Zaniboni-Filho E. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. PAB 2019; 54: e00367.

Spitsbergen JM, Kent ML. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research advantages and current limitations. Toxicol Pathol 2003; 31: 62-87.

Summerfelt RC, Smith LS. Anesthesia, Surgery, and Related Techniques. Schreck CB, Moyle PB. eds. In: Methods for Fish Biology. USA: American Fisheries Society Bethesda, 1990; pp. 213-63.

Weber RA, Perez-Maceira JJ, Peleteiro JB, García-Martin L, Aldegunde M. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture 2011; 321(1-4): 108-12.



Kadmiyum Uygulanan Farelerde Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması*

Canan IŞIK BİRCAN¹, Oğuz MERHAN²

¹ Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

² Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Oğuz MERHAN; E-posta: oguzmerhan@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-3399-0667

Atıf Yapmak İçin: Isık Bircan C, Merhan O. Kadmiyum uygulanan farelerde oluşturulan oksidatif strese karşı resveratrolün koruyucu etkisinin araştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 215-220.

Özet: Kadmiyum ve diğer ağır metaller hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmekte ve sanayide yaygın olarak kullanılmaktadır. Resveratrol anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör ve immunomodulator özellikleri olan doğal bir polifenolik bileşiktir. Bu nedenle yapılan çalışmada farelerin plazma, karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda kadmiyum toksisitesine karşı resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 35 fare eşit olarak 5 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu, alkol grubu, kadmiyum grubu (CdCl₂, 1 mg/kg/gün), resveratrol grubu (10 mg/kg/gün), kadmiyum+resveratrol grubu (1 mg/kg/gün+10 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Tüm uygulamalar 21 gün süreyle oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulama süresi sonunda karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda oksidatif stresin göstergesi olarak malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) miktarları, antioksidan savunmanın biyobelirteci olarak redükte glutatyon (GSH) miktarı, akut faz yanıtın bir göstergesi olan total siyalik asit (TSA) ve plazmada aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gamma glutamil transpeptidaz (GGT) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Kontrole göre, kadmiyum verilen grupta doku (karaciğer, böbrek ve kalp) MDA, NO, TSA düzeyleri ile plazma AST, ALT, GGT aktiviteleri önemli derecede artarken, doku GSH düzeyi ise önemli derecede azalmıştır. Kadmiyum+resveratrol verilen grupta ise doku MDA, NO, TSA düzeyleri ile plazma AST, ALT, GGT aktivitelerinin kadmiyum verilen gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede azalırken, doku GSH düzeyi ise önemli derecede artmıştır. Sonuç olarak kadmiyumun toksik etkisine karşı resveratrolün karaciğer, böbrek ve kalpte koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kadmiyum, oksidatif stres, resveratrol, siyalik asit

The Investigation of the Protective Effect of Resveratrol on Oxidative Stress Levels in Mice Given Cadmium

Summary: Cadmium and other heavy metals which are commonly used in industry could threaten human health with both environmental and occupational exposures. Resveratrol, a natural polyphenol, is thought to have some properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and immunomodulatory. Therefore, the present study was designed to examine the protective effect of resveratrol on cadmium toxicity in plasma, liver, kidney and heart tissue of mice. In our study, thirty five mice were equally divided into five groups. Control group, alcohol group, cadmium group (CdCl₂, 1 mg/kg/day), resveratrol group (10 mg/kg/day), cadmium+resveratrol group (1 mg/kg/day+10 mg/kg/day). All treatments were administered orally via gavage for 21 days. The amount of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) as an indicator of oxidative stress in liver, kidney, and heart tissue at the end of the application period, the amount of reduced glutathione (GSH) as a biomarker of antioxidant defense, total sialic acid (TSA) as an indicator of acute phase response and aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT) activities in plasma were determined by spectrophotometric methods. In cadmium group, it was determined that tissue MDA, NO, TSA level and plasma AST, ALT, GGT activities increased significantly compared to control in the tissue (liver, kidney, and heart), while tissue GSH level decreased significantly compared to control. In cadmium+resveratrol group, it was determined that tissue MDA, NO, TSA level and plasma AST, ALT, GGT activities decreased, while tissue GSH level increased statistically significantly compared to cadmium groups. As a result, it was concluded that resveratrol may have a protective effect on the liver, kidney and heart against the toxic effect of cadmium.

Key words: Cadmium, oxidative stress, resveratrol, sialic acid

Giriş

Yer kabuğunun doğal bir elementi olan kadmiyum madencilik ve endüstriyel faaliyetler esnasında çevre-

ye yüksek emisyon düzeyinde yayıldığından insan sağlığını tehdit eden önemli bir çevresel kirlenici olarak değerlendirilmektedir. Kadmiyumun insanlarda çeşitli organ kayıpları ve kanseri tetiklediği bilinmektedir. Kadmiyumun büyük bir kısmı karaciğer ve böbreklerde birikmektedir (Kim ve ark., 2013). Birikime bağlı olarak oluşan doku hasarları ve hücre ölümlerinin sistemik enflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin

Geliş Tarihi/Submission Date : 17.03.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 20.07.2020

*Bu çalışma ilk isimli araştırıcının Yüksek Lisans tezinden özetlenmiş olup Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016-TS-33 kodlu proje ile desteklenmiştir.

üretimi ile indüklenen oksidatif stresle ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda kadmium kaynaklı reaktif oksijen türleri üretiminin hem zaman hem de konsantrasyona bağlı olduğu aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi enzimlerin yanı sıra antioksidan savunmada önemli rolü olan glutatyon miktarının azalmasını da etkilediği belirtilmiştir (El-Ebiary ve ark., 2016).

Resveratrol kırmızı meyvelerde bulunan doğal polifenolik bir bileşiktir. Resveratrolün antioksidan, antiproliferatif ve anti-inflamator özelliklerinin yanı sıra kardiovasküler hastalıklar, yaşlanma, metabolik hastalıklar ve kansere karşı koruyucu etkileri bilinmektedir. Resveratrolün en iyi bilinen özelliği reaktif oksijen türleri gibi serbest radikalleri reaktif olmayan bileşiklere dönüştüren antioksidan özelliğidir (Yousef ve ark., 2017).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentazlar (NOS)'ın L-arjinini okside ederek L-sitrullin oluşmasıyla sentezlenmektedir. Memelilerin, damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem gibi farklı dokularından nöronal (nNOS), uyarılabilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üzere üç farklı tip NOS izoformu izole edilmiştir. Nitrik oksit, oksidatif stres altında apoptozisi, sitotoksitesiyi, mutajenezisi ve DNA hasarını artırır, ayrıca lipid oksidasyonuna da neden olur (Atakışı ve Merhan, 2017).

Glikoproteinler, glikolipidler, polisakaritler ve mukoproteinlerin yapısına katılan siyalik asit, mannozamin ve piruvatın kondenzasyonu ile oluşan nöraminik asitin asetillenmiş türevleridir. Total siyalik asit ise serbest, proteine ve lipide bağlı siyalik asidin toplamını ifade etmektedir (Merhan ve Özcan, 2004).

Çalışmada resveratrolün, toksik bir madde olan kadmiumun meydana getirdiği zararlı etkilerine karşı karaciğer, böbrek ve kalpte olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK) Başkanlığının 2016/030 kodlu etik kurul onayı ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan Swiss albino fareler (n=35) Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Biriminden temin edilmiştir. Fareler, bir aylık adaptasyon süresi boyunca *ad libitum* standart fare yemi ve su ile beslenmiştir. Fareler ağırlıklarına göre her bir grupta 7 adet olmak üzere toplam 5 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu; *ad libitum* beslenen (n=7), alkol grubu; % 1'lik etil alkol (resveratrol etil alkolde çözüldüğü için) (n=7), kadmium grubu; 1 mg/kg/gün kadmium ($CdCl_2$) (n=7), resveratrol grubu; 10 mg/kg/gün resveratrol (n=7), kadmium+resveratrol grubu; 1 mg/kg/gün kadmium ($CdCl_2$) ve 10 mg/kg/gün resveratrol verilen gruplar olarak belirlenmiştir. Tüm uygulamalar

21 gün süreyle oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Çalışmada kullanılmak için gerekli olan kan ve doku (karaciğer, böbrek ve kalp) numuneleri alınmıştır. Son uygulamalardan 24 saat sonra, kan örnekleri antikuagülanlı (EDTA) tüplere intrakardiyak olarak alınmış ve farelere servikal dislokasyon yöntemi uygulanmıştır. Kan örnekleri, 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edilmiş ve örnekler analiz edilinceye kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Plazmada AST, ALT, GGT enzim aktiviteleri analizleri ticari test kitleri (Biobio, Fransa) ile yapılmıştır. Karaciğer, böbrek, kalp dokuları hızlı ve hasarsız bir şekilde çıkarılmıştır. Biyokimyasal analiz için alınan 1 g karaciğer, böbrek ve kalp doku örnekleri fosfat tampon çözeltisi ile 5 kat sulandırılarak buz üzerinde, 12000 rpm'de 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 14000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizler yapılana kadar -45 °C'de saklanmıştır. Elde edilen süpernatantlardan MDA Yoshioka ve ark. (1979), NO Miranda ve ark. (2001), GSH Beutler ve ark. (1963), TSA analizi ise Sydow'un (1985) bildirdikleri metoda göre yapılmıştır.

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS® paket programı (SPSS 16.0, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Gruplardaki denek sayısının azlığı tek yönlü varyans analiz varsayımını yerine getirmediyinden dolayı grupların istatistiksel karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi kullanıldı. Post-hoc çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirilmede $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Karaciğer dokusu için; kadmium verilen grupta kontrole göre, MDA ($P=0.001$), NO ve TSA ($P<0.001$) düzeylerinin arttığı, GSH ($P=0.001$) düzeyinin ise istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Kadmium+resveratrol verilen grupta ise kadmiumun MDA ve GSH konsantrasyonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca kadmium+resveratrol grubunda MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole göre yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark belirlenmediği ($P>0.05$), fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiumun etkisini önlemekle beraber kontrole karşı istatistiksel olarak fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$) (Tablo 1).

Böbrek dokusu için; kadmium verilen grupta kontrole göre, MDA, NO ve TSA düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı ($P<0.001$), GSH ($P=0.003$) düzeylerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Kadmium+resveratrol verilen grupta ise kadmiumun MDA ve GSH konsantras-

Tablo 1. Karaciğer MDA, GSH, NO ve TSA düzeyleri

KARACİĞER	MDA ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	TSA (mg/g yaş doku)
Kontrol	0.51±0.02 ^a	3.84±0.11 ^a	0.73±0.04 ^{ab}	0.65±0.06 ^a
Alkol	0.49±0.01 ^a	3.81±0.06 ^a	0.67±0.04 ^a	0.61±0.04 ^a
Kadmiyum	0.78±0.03 ^b	2.74±0.07 ^b	1.32±0.04 ^c	1.47±0.05 ^b
Resveratrol	0.49±0.01 ^a	3.77±0.08 ^a	0.84±0.03 ^{bd}	0.68±0.03 ^a
Kadmiyum+Resveratrol	0.56±0.02 ^a	3.68±0.05 ^a	0.91±0.05 ^d	0.84±0.03 ^c
P Değeri	0.001	0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c,d}: Her sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir.

yonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği belirlenmiştir. Ayrıca kadmiyum+resveratrol grubunda MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole göre yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmadığı ($P>0.05$), fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görüldüğü kontrole karşı istatistiksel olarak fark görüldüğü saptanmıştır (sırasıyla $P=0.025$ ve $P=0.002$) (Tablo 2).

rak arttığı ($P<0.001$), GSH düzeylerinin ise azaldığı ($P=0.003$) tespit edilmiştir. Kadmiyum+resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA konsantrasyonuna yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği saptanmıştır. Ayrıca kadmiyum+resveratrol grubunda MDA konsantrasyonu için kontrole göre yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark olmadığı ($P>0.05$), fakat GSH, NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etki-

Tablo 2. Böbrek MDA, GSH, NO ve TSA düzeyleri

BÖBREK	MDA ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	TSA (mg/g yaş doku)
Kontrol	1.67±0.03 ^a	4.58±0.08 ^a	2.08±0.07 ^a	5.33±0.12 ^a
Alkol	1.59±0.03 ^a	4.61±0.05 ^a	2.06±0.08 ^a	5.28±0.05 ^a
Kadmiyum	2.18±0.08 ^b	4.12±0.06 ^b	3.14±0.09 ^b	8.24±0.11 ^b
Resveratrol	1.62±0.05 ^a	4.53±0.07 ^a	2.27±0.09 ^{ac}	5.62±0.07 ^c
Kadmiyum+Resveratrol	1.73±0.04 ^a	4.47±0.07 ^a	2.39±0.07 ^c	5.97±0.09 ^d
P Değeri	<0.001	0.003	<0.001	<0.001

^{a,b,c,d}: Her sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir.

Tablo 3. Kalp MDA, GSH, NO ve TSA düzeyleri

KALP	MDA ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	TSA (mg/g yaş doku)
Kontrol	1.09±0.03 ^a	0.82±0.06 ^a	1.94±0.08 ^a	1.35±0.06 ^a
Alkol	1.12±0.04 ^a	0.84±0.04 ^a	1.97±0.06 ^a	1.33±0.05 ^a
Kadmiyum	1.96±0.05 ^b	0.56±0.04 ^b	2.86±0.05 ^b	2.94±0.08 ^b
Resveratrol	1.15±0.04 ^a	0.79±0.04 ^{ac}	2.11±0.05 ^{ac}	2.07±0.07 ^c
Kadmiyum+Resveratrol	1.27±0.06 ^a	0.65±0.04 ^{bc}	2.24±0.05 ^c	2.26±0.05 ^c
P Değeri	<0.001	0.003	<0.001	<0.001

^{a,b,c}: Her sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir.

Tablo 4. Plazma AST, ALT ve GGT aktiviteleri

PLAZMA	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)
Kontrol	142.38±2.86 ^{ab}	53.18±3.85 ^{ab}	2.78±0.04 ^a
Alkol	144.24±6.56 ^{ab}	57.62±2.95 ^{ab}	2.82±0.07 ^a
Kadmiyum	212.78±5.13 ^c	105.31±3.33 ^c	8.63±0.38 ^b
Resveratrol	134.74±3.78 ^a	50.67±2.44 ^a	3.15±0.14 ^a
Kadmiyum+Resveratrol	158.83±6.88 ^b	55.23±1.67 ^b	4.52±0.07 ^c
P Değeri	<0.001	0.001	<0.001

^{a,b,c}: Her sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir.

Kalp dokusu için; kadmiyum verilen grupta kontrole göre, MDA, NO ve TSA düzeylerinin istatistiksel ola-

sini önlemiş gibi görüldüğü kontrole karşı istatistiksel olarak fark belirlenmiştir (sırasıyla $P=0.035$, $P=0.025$, $P=0.002$) (Tablo 3).

Plazmada; kadmiyum verilen grupta kontrole göre, AST, ALT ve GGT aktivitelerinin istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (sırasıyla $P < 0.001$, $P = 0.001$, $P < 0.001$). Kadmiyum+resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun AST ve ALT aktivitelerine yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca kadmiyum+resveratrol grubunda AST ve ALT aktiviteleri için kontrole göre yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmadığı ($P > 0.05$), GGT aktivitesinde ise resveratrolün kadmiyumun olumsuz etkisini tolere edemediği belirlenmiştir ($P = 0.002$) (Tablo 4).

Tartışma ve Sonuç

Kadmiyum ve diğer ağır metaller insan sağlığını tehdit etmektedir. Yarı ömrünün uzun olması, sanayide yaygın olarak kullanımı ve hemen hemen tüm sistemlere toksik etki gösterebilmesi sebebiyle ayrı bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir (Wang ve Du, 2013). Pulmoner ve gastrointestinal absorpsiyonun ardından büyük bir kısmının karaciğer ve böbrekte biriktiği ve idrarla atıldığı bildirilmiştir. Karaciğerde küçük peptidler ve sülfidril grupları aracılığı ile glutatyon veya afinitesi daha yüksek olan metal bağlayıcı protein olan metallothionein gibi proteinlerle kompleksler oluşturarak antioksidan sistemlerin etkinliğinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır (Kim ve ark., 2013).

Resveratrol üzüm, kırmızı şarap gibi birçok bitki türünde bulunan ve antiinflamatuvar, antioksidan, anti-tümör ve immunomodulator özellikleri olan doğal bir polifenolik bileşik olduğu bildirilmiştir. Oksidatif strese bağlı olarak oluşan hücresel hasarları ve apoptozu önleyerek süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti hücreden uzaklaştırmada oldukça güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Das ve Maulik, 2006).

Deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmanın sonuçlarına göre akut kadmiyuma maruz kalma durumunda oksidatif stresin artarak öncelikle karaciğer hasarı ve kadmiyum toksisitesine neden olduğu bildirilmektedir (Sarkar ve ark., 1995; Bagchi ve ark., 1996). El-Demerdash ve ark. (2004) ratlarda 15 gün boyunca oral gavaj yoluyla 5 mg/kg CdCl₂ uyguladıkları bir çalışmada kadmiyumun karaciğer dokusunda hücre hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada, kadmiyum uygulaması sonucunda karaciğerde hasar olduğu ve karaciğer homojenatlarında MDA düzeyinin arttığı, SOD ve CAT aktivitelerinde ise düşüş saptandığı bildirilmiştir (Koyu ve ark., 2006). Nitrik oksit in ise hipertansiyon, astım, septik şoka kadar değişken bir dizi hastalıkların patogenezinde rol oynadığı, DNA hasarını artırdığı, demirsülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirdiği ve mitokondriyal solunumu bozduğu bildirilmektedir (Gross ve Wolin, 1995). *In vitro* bir çalışmada, ortamdaki kadmiyumun endotel hücreleri tarafından üretilen NO'yi inhibe ettiği (Kishimoto ve ark., 1994), başka bir çalışmada ise kronik kadmiyum maruziyeti sonra-

sında ratların plazma NO düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (Skoczynska ve Martynowicz, 2005). Çalışmamızda ise karaciğer dokusunda kadmiyum verilen grupta kontrole göre MDA, NO ve TSA düzeyleri artarken, kadmiyum+resveratrol verilen grupta MDA seviyelerinin resveratrol aracılı olarak önlediği fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında istatistiksel olarak bir farkın oluşmadığı görülmüştür.

Metallothionein proteinlerinin sentezinin karaciğerde olmasından dolayı karaciğer kadmiyum toksikasyonu için önemli bir organdır (Coyle ve ark., 2000). Shirahhi ve ark. (1994) tek başına kadmiyum uygulaması sonucu karaciğer metallothionein miktarının arttığını göstermiştir. Metallothioneinlerin yanında hücresel antioksidan savunma sistemlerinin işlevselliği de bir diğer önemli husustur. Ratlarda yapılan bir çalışmada, kadmiyum uygulaması sonucunda karaciğer SOD ile CAT aktivitelerinde düşüş saptandığı bildirilmiştir (Koyu ve ark., 2006). Yaptığımız çalışmada da literatürdeki bilgilere paralel olarak kadmiyum verilen grubun karaciğer dokularında kontrole kıyasla GSH düzeylerinin azaldığı tespit edilmiş ve aynı zamanda kadmiyum+resveratrol verilen grupta GSH konsantrasyonlarının kontrol düzeyine yaklaştığı görülmüştür. Bu koruyucu etkinin, resveratrolün hücresel antioksidan savunmayı güçlendirmesi yoluyla şekillendiği kanaati oluşmuştur.

Hepatositlerde sentezlenen plazma ALT, AST ve safra kanalında sentezlenen GGT enzimleri karaciğer hasarının belirlenmesinde kullanılan önemli belirteçlerdendir (Pratt ve Kaplan, 2000). Farelerde oluşturulan deneysel toksikasyon sonucunda ise AST ve ALT aktivitesindeki yükselmeyi resveratrol uygulanmasının düşürdüğü bildirilmiştir (Sener ve ark., 2006). Elde ettiğimiz bulgularda da literatürde sunulan bilgiler ile paralel olarak plazma AST, ALT ve GGT aktivitelerinin kadmiyum verilen grupta kontrol grubuna nazaran, istatistiksel olarak arttığını göstermekle birlikte kadmiyum+resveratrol uygulamasının AST ve ALT aktivitelerini fizyolojik sınırlara çektiği görülmüştür. Ayrıca kadmiyum+resveratrol grubunda AST ve ALT aktiviteleri için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Fakat GGT aktivitesinde resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülse de kontrole kıyasla istatistiksel bir farkın varlığı tespit edilmiştir.

Böbrekler ise kadmiyum toksikasyonunda sekonder hedef organ olarak değerlendirilmektedir. Çünkü kadmiyum boşaltım sistemi yoluyla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Kadmiyum proksimal tübüleri etkileyerek böbreklerde fonksiyon bozukluğuna neden olmakta bunun sonucunda da kanda yüksek asit seviyesiyle seyreden birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Tsuruoka ve ark., 2000). Renugadevi ve Prabu (2009) yaptıkları çalışmada 4 hafta boyunca 5 mg/kg CdCl₂'ün böbrek dokusunda hasar oluşturdu-

ğunu bildirmişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada da, tek başına kadmiyum uygulamasının böbrek metallothionein miktarlarında önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilere ek olarak resveratrolün iskemik böbrek modelinde lipit peroksidasyon seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (Sener ve ark., 2006). Elde ettiğimiz verilere göre böbrek dokularında, kadmiyum verilen grupta kontrole grubuna kıyasla, MDA, NO ve TSA düzeylerinin istatistiksel olarak arttığını, GSH düzeylerinin ise azaldığını göstermekte olup kadmiyum+resveratrol verilen grupta kadmiyumun MDA ve GSH konsantrasyonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Çünkü aynı grubun MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole göre yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görünse de kontrole göre istatistiksel farkın şekillendiği görülmektedir.

Kadmiyumun, kalpte metabolik ve yapısal bozuklukların yanı sıra hipertansiyon oluşumunda da etkili olduğu belirtilmektedir (Tomera ve ark., 1991). Kardiyomyositlerde mitokondri hasarı oluşturarak hücre solunum ve enerji metabolizmasında bozulmaya neden olduğu bilinmektedir (Skowerski ve ark., 2000). Ayrıca kadmiyumun kalpte birikme oranının, karaciğer ve böbrekle kıyaslandığında oldukça düşük olduğu kaydedilmiştir (Tomera ve ark., 1991). Kadmiyum okside maruz kalan işçilerde, kardiyovasküler sistem hastalıkların görülme sıklığının 4 kat arttığı rapor edilmiştir (Vorobieva ve Ereneeve, 1980). Yapılan çalışmalar resveratrolün kalp dokusu için koruyucu etkilere sahip olduğunu işaret etmektedir (Giovannini ve ark., 2001). Ek olarak rat aorta düz kas hücre kültürlerinde yapılan farklı bir çalışmada, resveratrol uygulamasının hücresel GSH düzeyini kontrol gruba göre anlamlı derecede yükselttiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2006). Verilerimiz literatürdeki bilgilere paralel olarak kadmiyumun kontrol grubuna nazaran kalp dokularında MDA, NO ve TSA düzeylerini istatistiksel olarak arttırdığını fakat GSH düzeylerini ise azalttığını göstermektedir. Kadmiyum+resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA konsantrasyonuna yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Çünkü aynı grubun MDA konsantrasyonu için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat GSH, NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görünse de kontrole karşı istatistiksel olarak fark görülmektedir. Lindberg ve ark. (1991) yaptıkları bir çalışmada, serum TSA konsantrasyonları ile kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle ölümler arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu yönüyle çalışmamızda, resveratrol aracılı olarak düşen TSA seviyelerinin, pozitif kardiyovasküler etkilerinin de olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, kadmiyum uygulanan farelerin karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda oksida-

tif stresin indüklendiğini ve antioksidan sistemin kadmiyumun toksik etkisini elimine etmede yetersiz kaldığını göstermektedir. Resveratrol ve kadmiyum+resveratrol uygulanan farelerde ise karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda ise oksidatif stresin azaldığı ve antioksidan sistemin kadmiyumun toksik etkisini azaltarak doku hasarını önlediği kanısına varılmıştır.

Teşekkür

2016-TS-33 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki maddi katkılarından dolayı Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Atakisi E, Merhan O. Nitric oxide synthase and nitric oxide involvement in different toxicities. Saravi SSS. ed. In: Nitric Oxide Synthase-Simple Enzyme-Complex Roles. Croatia: In Tech 2017; pp. 197-214.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 52(2): 143-54.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-8.
- Coyle P, Niezing G, Shelton TL, Philcox JC, Rofe AM. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: In vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicol* 2000; 150(1-3): 53-67.
- Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006; 6(1): 36-47.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: Protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(10): 1563-71.
- El-Ebiary AA, El-Ghaiesh S, Hantash E, Alomar S. Mitigation of cadmium-induced lung injury by *Nigella sativa* oil. *Environ Sci Poll Res* 2016; 23 (24): 25356-63.
- Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37(3): 262-70.
- Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.

- Kim BM, Lee SY, Jeong IH. Influence of squid liver powder on accumulation of cadmium in serum, kidney and liver of mice. *Prev Nutr Food Sci* 2013; 18(1): 1-10.
- Kishimoto T, Oguri T, Ohno M, Matsubara K, Yamamoto K, Tada M. Effect of cadmium (CdCl₂) on cell proliferation and production EDRF (endothelium-derived relaxing factor) by cultured human umbilical arterial endothelial cells. *Arch Toxicol* 1994; 68(9): 555-9.
- Koyu A, Gökçimen A, Özgüner F, Bayram DS, Kocak A. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem* 2006; 284(1-2): 81-5.
- Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* 2006; 53(1): 6-15.
- Lindberg G, Eklund GA, Gullberg B, Rastam L. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. *BMJ* 1991; 302(6769): 143-6.
- Merhan O, Özcan A. Kazlarda serum seruloplazmin ve total sialik asit düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2004; 10(2): 139-42.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5(1): 62-71.
- Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000; 342(17): 1266-71.
- Renugadevi J, Prabu SM. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology* 2009; 256(1-2): 128-34.
- Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* 1995; 9(3): 144-9.
- Sener G, Toklu HZ, Sehirlı AÖ, Velioglu-Ögünç A, Çetinel S, Gedik N. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 2006; 35(1): 62-8.
- Shiraishi N, Rehm S, Waalkes MP. Effect of chlorpromazine pretreatment on cadmium toxicity in the male wistar (WF/NCr) rat. *J Toxicol Environ Health* 1994; 42(2): 193-208.
- Skoczynska A, Martynowicz H. The impact of subchronic cadmium poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24(7): 353-61.
- Skowerski M, Jasik K, Konecki J. Effects of interaction between cadmium and selenium on heart metabolism in mice: the study of mRNA, protein, ANP synthesis activities and ultrastructure in mouse heart. *Med Sci Monit* 2000; 6(2): 258-65.
- Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochim Acta* 1985; 44(11-12): 1721-3.
- Tomera JF, Kukulka SP, Lilford K, Harakal C. Cadmium accumulation in experimental hypertension. *Corn Art Dis* 1991; 2: 769-74.
- Tsuruoka S, Sugimoto KI, Muto S, Nomiya K, Fujimura A, Imai M. Acute effect of cadmium-metallothionein on glucose and amino acid transport across the apical membrane of the rabbit proximal tubule perfused *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(2): 769-77.
- Vorobieva RS, Eremeeva EP. Cardiovascular function in workers exposed to cadmium. *Gig Sanit* 1980; 10: 22-5.
- Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 1-12.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135(3): 372-6.
- Yousef M, Vlachogiannis IA, Tsiani E. Effects of resveratrol against lung cancer: In vitro and in vivo studies. *Nutrients* 2017; 9(11): 1-14.



The Effect of N-Acetylcysteine on Oxidant/Antioxidant Status in Irradiated Rats

Mehtap OZCELİK¹, Mine ERİSİR², Osman GULER³, Murat BAYKARA⁴

¹University of Firat, Vocational School of Health Services, Elazığ-TURKEY

²University of Firat, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Elazığ-TURKEY

³University of Munzur, Pertek Sakine Genc Vocational School of Technical Sciences, Tunceli-TURKEY

⁴University of Firat, Medicine Faculty, Department of Radiology, Elazığ-TURKEY

Correspondance author: Mehtap OZCELİK; E-mail: mehtapyo@hotmail.com; ORCID: 0000-0003-2362-4935

How to cite: Ozcelik M, Erisir M, Guler O, Baykara M. The effect of N-Acetylcysteine on oxidant/antioxidant status in irradiated rats. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 221-226.

Summary: N-Acetylcysteine (NAC) is both a strong antioxidant and a glutathione precursor. The effect of NAC on the oxidant/antioxidant status of some tissues of the irradiated rats was investigated. Twenty one rats were assigned to 3 groups; the control group, the irradiation group, for which physiological saline solution was administered as i.p. for three days and then, 9 Gy gamma irradiation was applied, and 3rd irradiation + NAC group for which NAC was administered as i.p. for three days as 300 mg/kg body weight and then the same dose of irradiation was applied. Upon irradiation, the increase determined in malondialdehyde (MDA) was significant in the liver, kidney, and brain tissues of the rats (P<0.05). While glutathione peroxidase (GSH-Px) activity decreased in all of the tissues and superoxide dismutase (SOD) activity only in the liver (P<0.01), glutathione (GSH) levels significantly increased in the kidney and ovarium tissues (P<0.001). While NAC administration returned the increased MDA levels in the kidney and brain as a result of irradiation to normal levels (P<0.05), it was determined that it did not return the increased MDA levels in the liver tissue to the normal level (P<0.001). While NAC addition led to a significant increase in GSH levels of the liver, heart, spleen, brain and ovarium tissues compared to both control and irradiation groups, it caused a significant decrease in the kidney tissue compared to irradiation group (P<0.001). As a result of NAC addition, a significant decrease was determined in spleen GSH-Px activity, heart and ovarium SOD activity compared to control and irradiation groups (P<0.05). It can be asserted that GSH increasing by the addition of NAC is the main antioxidant that has a role in decreasing oxidative stress occurring as a result of irradiation. In the examination of MDA values, it was found that the addition of NAC protected the kidney and brain against the oxidative damage induced by irradiation but NAC addition could remain insufficient for the liver.

Key words: Irradiation, N-Acetylcysteine, oxidative stress

Radyasyona Maruz Kalan Ratlarda Oksidan/Antioksidan Durum Üzerine N-Asetilsistein'in Etkisi

Özet: N-Asetilsistein (NAC) hem güçlü bir antioksidan, hemde glutatyon prekürsörüdür. Radyasyona maruz kalan ratların bazı dokularındaki oksidan/antioksidan durum üzerine NAC'in etkisi araştırıldı. Yirmi bir rat üç gruba bölündü; 1. grup kontrol grubu. 2. grup radyasyon grubu; serum fizyolojik üç gün i.p. verildikten sonra 9 Gy gamma radyasyon uygulandı. Üçüncü grup radyasyon + NAC grubu; NAC, 300 mg/kg canlı ağırlık i.p. olarak üç gün süreyle verildi ve sonra aynı dozda radyasyon uygulandı. Radyasyon sonucu, ratların karaciğer, böbrek ve beyin dokularında malondialdehit (MDA)'de önemli artış saptandı (P<0.05). Tüm dokulardaki glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ve sadece karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi azaldı (P<0.01), böbrek ve ovarium dokularında glutatyon (GSH) düzeyleri önemli olarak arttı (P< 0.001). N-Asetilsistein ilavesinin radyasyon sonucu böbrek ve beyindeki artmış MDA seviyelerini normal seviyeye ulaştırırken (P<0.05), karaciğer dokusunda artan MDA seviyelerini normal seviyeye (P<0.001) getiremediği belirlendi. N-Asetilsistein ilavesi hem kontrol hemde radyasyon uygulanan gruba göre; karaciğer, kalp, dalak, beyin ve ovarium dokularının GSH seviyelerinde önemli artışa, böbrek dokusunda radyasyon uygulanan gruba göre önemli azalmaya sebep oldu (P<0.001). N-Asetilsistein ilavesiyle dalak GSH-Px aktivitesinde, kalp ve ovarium SOD aktivitesinde kontrol ve radyasyon uygulanan gruba göre önemli azalma tespit edildi (P<0.05). N-Asetilsistein ilavesiyle artan GSH'un radyasyon sonucu oluşan oksidatif stresi azaltmada rol alan ana antioksidan olduğu söylenebilir. Doku MDA değerleri incelendiğinde, NAC ilavesinin böbrek ve beyini radyasyonun neden olduğu oksidatif hasardan korumasına rağmen, karaciğer için yetersiz kalabileceği düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: N-Asetilsistein, oksidatif stres, radyasyon

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.04.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 27.07.2020

Introduction

The wide use area of radiation includes radiotherapy, medical diagnosis, dental radiography, and several imaging protocols and also its exposure is seen in

accidental radiation releases (Radwan and Mohamed, 2018). A detrimental effect of irradiation is the production of reactive oxygen species (ROS), which includes superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$). ROS are highly reactive and could diffuse to vital cellular targets like DNA, proteins and membrane, ultimately leading to cell death (Kilciksiz et al., 2008; Mansour et al., 2008).

Cells possess an important antioxidant defense against ROS. The antioxidant system consists of low molecular weight antioxidant molecules, such as GSH and of various antioxidant enzymes; for instance SOD, GSH-Px). When there is an imbalance between formation of ROS and antioxidant defense, this can lead to oxidative stress, associated with deficiencies of antioxidants and/or rised production of ROS (Sies, 1993).

It is reported that a number of dietary antioxidants decrease free radical attacks towards biomolecules (Duthie et al., 1996). N-Acetylcysteine is a natural compound found in several vegetables such as garlic, onion, peppers, and asparagus (Demirkol et al., 2004; Hsu et al., 2004). N-Acetylcysteine has multiple biological activities including antioxidant, anticarcinogenic, and antiangiogenic properties (Kilciksiz et al., 2008; Mansour et al., 2008; Tosetti et al., 2002). Being a strong antioxidant and a GSH precursor NAC directly destroys ROS (Liu et al., 2007). Many studies have revealed that NAC has an ability to decrease chemically created oxidative stress and DNA damage (Kilciksiz et al., 2008; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008; Neal et al., 2003). Moreover, NAC has been used clinically for decades in order to treat numerous illnesses (Thomas, 1993).

It is known that exposure to γ -radiation causes liver damage (Kilciksiz et al., 2008; Mansour et al., 2008; Radwan and Mohamed, 2018). Antioxidant supplements reduce side effects of the radiation treatment by inhibiting the oxidative damage to normal cells (Lawenda et al., 2008). In the present study, the effect of irradiation on oxidative stress parameters (MDA, SOD, GSH, GSH-Px) of the liver, kidney, heart, spleen, brain and ovarium tissue and the presence of a protective effect of NAC that is an antioxidant on these tissues were investigated.

Material and Methods

Animals

Twenty one, female fertile Wistar albino rats (200 \pm 10 g) aged between 4–5 months were supplied from the Animal Care Unit of Firat University and were kept in plastic cages with stainless-steel grid tops. The experimental conditions were environmentally controlled in terms of temperature (23 \pm 2 °C), humidity (50 \pm 5%), and light (12 h of light and dark cycle).

The animals were fed with pellet diet and water ad libitum. Three rats were kept together in polypropylene cages containing sterile husk bedding during the experiment. The experiments were carried out after the approval of the Local Ethics Committee of the Veterinary Research Institute (Official form date and number: 18.04.2013 and 2013/4-1) in Elazığ.

Irradiation of the rats

A γ -ray source was used to perform whole-body irradiation. The animals were placed in Plexiglass[®] cages and irradiated in groups of seven rats, simultaneously. The source-to-skin distance was 291 cm with a dose of 0.0233 Gy/s (Benkovic et al., 2008) and absorbed dose of 9 Gy. They were irradiated by a 160 MLC LINAC (Siemens Artiste linear accelerator, using 6 MV photons). The rats were irradiated under continuous isoflurane anesthesia in a specially fabricated plexiglas chamber radiating out from the center.

Experimental design

The rats were seperated into three groups including 7 rats in each.

Control group; rats did not receive any treatment.

Irradiation group; rats were treated with intraperitoneal injection (i.p.) containing a physiologic saline solution for three days. All the rats in this group were irradiated with gamma-rays at dose of 9 Gy.

Irradiation + NAC group; the rats were treated with i.p. injection containing NAC at dose of 300 mg/kg body weight (Kilciksiz et al., 2008) for 3 consecutive days. Then, all the rats were irradiated with gamma-rays at dose of 9 Gy.

Ketamine (ketamine hydrochloride, 50 mg/kg [Ketalar[®] 5%, Parke-Davis] and xylazine 8 mg/kg [Rompun[®] 2%, Bayer]) mixture was done intraperitoneally in order to anesthetize the rats. All the rats were sacrificed at 24th hour after irradiation exposure. After decapitation, whole liver, spleen, kidney, brain, heart and ovarium tissues were rapidly resected. The tissues were stored at -80°C.

Biochemical analyses in tissues

The tissues were homogenized by using a Teflon-glass homogenizer with 1.15% KCl in order to obtain 1:10 (w /v) homogenate. Malondialdehyde and GSH levels of tissue homogenates were determined spectrophotometrically according to the methods of Placer et al. (1966) and Sedlak et al. (1968), respectively. GSH-Px and SOD activities were measured spectrophotometrically according to the methods of Lawrence and Burk (1976) and Sun et al. (1988), respectively. Homogenate protein levels were performed

based on the method of Lowry et al. (1951).

Statistical analysis

The SPSS statistical software (SPSS for windows, version 22.0) was used for all statistical analyses. All the data were presented in mean (\pm) and standard error (SE). Analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan test was used to determine whether there were significant differences among the groups. The 5% level of significance was used to establish differences.

Results

As a result of irradiation, a significant increase was determined in MDA of liver, kidney ($P < 0.001$), and brain ($P < 0.05$) tissues of the rats. Also, there was a significant decrease in GSH-Px activity of all the tissues and SOD activity in the liver ($P < 0.01$). On the other hand, GSH level increased significantly in the kidney and ovarian tissues ($P < 0.001$) (Table 1).

While NAC administration return the MDA levels, increasing in the kidney ($P < 0.001$) and brain ($P < 0.05$) as a result of the irradiation, to normal levels, it was found that there was a significant decrease in MDA levels increasing in the liver tissue ($P < 0.001$), but, it could not significantly bring them to the control level. Malondialdehyde values of heart, spleen and ovarium tissues significantly decreased as a result of the addition of NAC compared to both control and irradiation groups ($P < 0.001$) (Table 1).

While NAC addition led to a significant increase in GSH levels of the liver, heart, spleen, brain and ovarium tissues compared to both control and irradiation groups, it caused a significant decrease in the kidney tissue compared to irradiation group ($P < 0.001$). As a result of NAC addition, a significant decrease was determined in spleen GSH-Px activity and heart and ovarium SOD activity compared to control and irradiation groups ($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1. The effect of N-acetylcysteine on oxidant/antioxidant status in the tissues of irradiated rats

	Control	Irradiation	Irradiation + NAC	P
LIVER				
MDA (nmol/g prot)	4.56 \pm 0.38 ^c	12.57 \pm 0.56 ^a	8.93 \pm 0.74 ^b	***
GSH-Px (U/g prot)	2.12 \pm 0.33 ^a	0.75 \pm 0.16 ^b	0.6 \pm 0.10 ^b	***
GSH (nmol/g prot)	0.59 \pm 0.05 ^b	0.35 \pm 0.04 ^b	2.13 \pm 0.11 ^a	***
SOD (U/g prot)	1.8 \pm 0.19 ^a	1.12 \pm 0.04 ^b	1.31 \pm 0.07 ^b	**
KIDNEY				
MDA (nmol/g prot)	9.10 \pm 0.42 ^b	22.57 \pm 2.86 ^a	14.48 \pm 1.45 ^b	***
GSH-Px (U/g prot)	2.54 \pm 0.27 ^a	1.10 \pm 0.17 ^b	0.92 \pm 0.30 ^b	***
GSH (nmol/g prot)	0.41 \pm 0.02 ^b	1.92 \pm 0.43 ^a	0.53 \pm 0.03 ^b	***
SOD (U/g prot)	1.52 \pm 0.11	1.63 \pm 0.09	1.45 \pm 0.12	NS
HEART				
MDA (nmol/g prot)	12.24 \pm 0.98 ^a	15.02 \pm 1.37 ^a	6.68 \pm 1.23 ^b	*
GSH-Px (U/g prot)	45.29 \pm 1.58 ^a	22.61 \pm 1.56 ^b	13.95 \pm 3.17 ^b	***
GSH (nmol/g prot)	0.73 \pm 0.06 ^b	0.82 \pm 0.09 ^b	2.31 \pm 0.20 ^a	***
SOD (U/g prot)	3.36 \pm 0.33 ^a	2.76 \pm 0.24 ^{ab}	2.00 \pm 0.26 ^b	*
SPLEEN				
MDA (nmol/g prot)	14.09 \pm 1.15 ^a	16.76 \pm 0.70 ^a	7.64 \pm 0.93 ^b	***
GSH-Px (U/g prot)	18.35 \pm 1.12 ^a	11.23 \pm 1.11 ^b	5.75 \pm 1.72 ^c	***
GSH (nmol/g prot)	0.41 \pm 0.01 ^b	0.55 \pm 0.05 ^b	2.21 \pm 0.19 ^a	***
SOD (U/g prot)	1.4 \pm 0.05	1.5 \pm 0.13	1.30 \pm 0.14	NS
BRAIN				
MDA (nmol/g prot)	13.07 \pm 0.86 ^b	21.65 \pm 2.02 ^a	18.79 \pm 2.49 ^{ab}	*
GSH-Px (U/g prot)	38.41 \pm 1.98 ^a	21.36 \pm 1.77 ^b	20.94 \pm 4.45 ^b	***
GSH (nmol/g prot)	0.5 \pm 0.1 ^b	0.67 \pm 0.04 ^b	2.13 \pm 0.02 ^a	***
SOD (U/g prot)	1.97 \pm 0.14	1.97 \pm 0.11	1.79 \pm 0.22	NS
OVARIUM				
MDA (nmol/g prot)	12.93 \pm 0.82 ^a	14.64 \pm 1.4 ^a	6.56 \pm 1.31 ^b	***
GSH-Px (U/g prot)	57.76 \pm 2.99 ^a	38.74 \pm 0.97 ^b	29.93 \pm 1.69 ^b	**
GSH (nmol/g prot)	0.82 \pm 0.02 ^c	1.33 \pm 0.15 ^b	2.49 \pm 0.29 ^a	***
SOD (U/g prot)	3.78 \pm 0.15 ^a	4.01 \pm 0.24 ^a	3.06 \pm 0.11 ^b	**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **NS**: No Significant

^{abc}Mean values with different superscripts within a row were significantly different.

Discussion

Comprehensive evidence has revealed that irradiation causes intracellular generation of ROS (Kilciksiz et al., 2008; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008). When ROS reacts with the unsaturated free fatty acids of membrane lipids, MDA levels elevate, which means the activation of lipid peroxidation. MDA has been commonly accepted as a sensitive marker for lipid peroxidation (Patton and Kurtz, 1951). Furthermore, MDA determinations ensure a good measure for peroxidation, one of the main mechanisms of cell damage causing necrosis or apoptosis (Comporti, 1985; De Ferreyra et al., 1989). It is a known fact that irradiation exposure leads to the liver damage (Khattab et al., 2017; Kilciksiz et al., 2008; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008). It is also stated that γ -radiation results in multiple organ dysfunction particularly in the liver and elevates MDA levels in various tissues based on the time and dose (Karami et al., 2018; Kilciksiz et al., 2008; Mansour et al., 2008; Simsek et al., 2012; Xie et al., 2014;). In this study, γ -radiation significantly increased MDA in the kidney, brain, and liver tissues but led to an insignificant increase in heart, spleen, and ovarium tissues. Irradiation is seen to result in damage in more than one tissues. Liver, which is a radiosensitive organ, has a higher susceptibility against radiation damage (Radwan and Mohamed, 2018). This situation is confirmed by the fact that the increased MDA levels in the liver was 3-fold compared to the kidney and brain (2-folds).

Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems allow cells protect themselves against oxidative damage. As the first-line of antioxidant defense against the detrimental effects of ROS, SOD acts to turn $\cdot\text{O}_2^-$ into H_2O_2 (Liu et al., 2007). Additionally, GSH-Px takes part significantly in the protection against oxidative damage by providing the conversion of H_2O_2 to H_2O and O_2 and using GSH as a substrate (Scibior et al., 2008). The exposure to irradiation makes changes in the balance of endogenous antioxidant enzymes. In this study, the MDA concentrations in the liver, kidney, and brain increased upon irradiation; whereas the SOD and GSH-Px activities in the liver and GSH-Px activity in the brain and kidney significantly decreased. The decreased SOD activity is associated with inhibition of the enzyme due to rised superoxide radical production or H_2O_2 increasing as a result of decreasing of GSH-Px activity, which degrades H_2O_2 (Ashry et al., 2017; El-Gazzar et al., 2016). There were significant decreases in the GSH-Px activity in heart, spleen, and ovarium tissues in which MDA insignificantly increased after the irradiation. Inactivation of GSH-Px activity through lipid peroxidation byproducts in irradiated rats may significantly decrease GSH-Px activity (Mansour et al.,

2008). The decreased GSH-Px activity in the tissues examined after the irradiation indicated that the first enzyme affected by the irradiation was GSH-Px. Various studies revealed that irradiation decreased SOD, GSH, and GSH-Px levels in the liver (Ashry et al., 2017; Khattab et al., 2017; Kilciksiz et al., 2008; Mansour et al., 2008; Radwan and Mohamed, 2018). The antioxidant enzymes reduced because of the depletion of enzymes during oxidative stress caused by the irradiation (Khattab et al., 2017; Mansour et al., 2008). In contrast to studies indicating the decreased GSH in the kidney (Cosar et al., 2012; Ekici et al., 2016), the present study showed that GSH concentrations significantly increased in the kidney and ovarium as a result of γ -radiation. Being a main intracellular antioxidant, GSH takes part in the defense system of cells against oxidative damage, directly as a free radical scavenger or indirectly by repairing initial damage to macromolecules and could maintain protein and non-protein SH group in a reduced way (Scibior et al., 2008). The fact that GSH levels were observed to increase in irradiated rats may be related to the radiation adaptive response. Simsek et al. (2012) stated that irradiation did not lead to a change in the ovarium MDA but it resulted in an increase in GSH-Px and CAT activities.

It is obvious that radiation leads to oxidative stress. Exogenous antioxidants may effectively counteract the oxidative-stress state. N-Acetylcysteine was shown to scavenge oxidants directly and to increase intracellular GSH, which has a great importance in protecting from oxidative stress associated with ROS (Aruoma et al., 1989; Burgunder et al., 1989; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008). In this study, it was revealed that the significant increase in MDA in the kidney and brain tissues due to γ -radiation could reach the control values as a result of the addition of NAC; however, even though MDA levels in the liver significantly decreased, they could not return to the control values. This pointed out that although NAC protected the kidney and brain, NAC administration was insufficient for the liver. As a result of NAC administration, MDA significantly decreased in the heart, spleen, and ovarium tissues compared to control and radiation groups. This may be caused by strong antioxidant characteristic of NAC. In various studies, it has been determined that the addition of NAC reduces the increased MDA levels in the rat serum (Demir et al., 2011), mice and rat liver (Kilciksiz et al., 2008; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008) and the brain of guinea pigs (Gulbahar et al., 2009) as a result of the irradiation and also increases the decreasing antioxidant levels such as GSH-Px, SOD, GSH. NAC is both a potent antioxidant and a precursor of the reduced glutathione (GSH) (Aruoma et al., 1989; Burgunder et al., 1989; Liu et al., 2007; Mansour et al., 2008). In the present study, a significant increase was determined in the GSH concentra-

tions with the addition of NAC in all the studied tissues except for kidney compared to control and irradiation groups. N-Acetylcysteine serves as a cysteine donor and maintains or even increases the intracellular levels of glutathione, a tripeptide which protects cells from free radicals (Burgunder et al., 1989; Liu et al., 2007). Moreover, NAC is the most common intracellular antioxidant in vivo, where it scavenges ROS such as H₂O₂ and HO• (Zafarullah et al., 2003). Decreased GSH-Px activity in the heart, spleen, and ovarium tissues and decreased SOD activity in the heart and ovarium as a result of the addition of NAC can be associated with the fact that the need for antioxidant enzymes decreased due to its direct ROS scavenging characteristic. It can be asserted that especially GSH increasing due to the effect of NAC administered was the main antioxidant taking part in reducing oxidative stress, induced by irradiation.

Consequently, in the examination of the MDA values; it was found that NAC reduced the increased MDA contents in the kidney and brain but although it decreased MDA content in the liver, it cannot return them to the control values. It was determined that NAC addition significantly increased GSH levels in the studied other tissues except for kidney. When examining its effect on liver, NAC at the dose used during radiotherapy or for reducing the oxidative damage caused by irradiation may remain insufficient. Therefore, there is a need for further studies examining different doses of NAC to reduce the effect of irradiation on liver.

References

- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-7.
- Ashry OM, Hussein EM, Abd El-Azime AS. Restorative role of persimmon leaf (*Diospyros kaki*) to gamma irradiation-induced oxidative stress and tissue injury in rats. *Int J Radiat Biol* 2017; 93(3): 324-9.
- Benkovic V, Knezevica AH, Dikic D, Lisicic D, Orsolcic N, Basic I, Kosalec I, Kopjar N. Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* 2008; 15: 851-8.
- Burgunder JM, Varriale A, Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36:127-31.
- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599-623.
- Cosar R, Yurut-Caloglu V, Eskiocak S, Ozen A, Altaner S, Ibis K, Turan N, Denizli B, Uzal C, Saynak M, Parlar S, Caloglu M, Uregen B, Kocak Z. Radiation-induced chronic oxidative renal damage can be reduced by amifostine. *Med Oncol* 2012; 29 (2):768-75.
- De Ferreyra E, Villarruel M, Fernandez G, De Fenos O, Bernacchi A, De Castro C, Castro J. Further studies on the mechanism of the late protective effects of phenylmethylsulfonyl fluoride on carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Exp Mol Pathol* 1989; 5: 253-69.
- Demir EO, Cakmak GK, Bakkal H, Turkcu UO, Kandemir N, Demir AS, Tascilar O. N-acetyl-cysteine improves anastomotic wound healing after radiotherapy in rats. *J Invest Surg* 2011; 24 (4): 151-8.
- Demirkol O, Adams C, Ercal N. Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (26): 8151-4.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56 (6): 1291-5.
- Ekici K, Temelli O, Parlakpinar H, Samdanci E, Polat A, Beytur A, Tanbek K, Ekici C, Dursun IH. Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia* 2016; 48 (6): 683-92.
- El-Gazzar MG, Zaher NH, El-Hossary EM, Ismail AFM. Radio-protective effect of some new curcumin analogues. *J Photochem Photobiol B* 2016; 162: 694-702.
- Gulbahar O, Aricioglu A, Akmansu M, Turkozer Z. Effects of radiation on protein oxidation and lipid peroxidation in the brain tissue. *Transplant Proc* 2009; 41 (10): 4394-6.
- Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. Five cysteine containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 2004; 134: 149-52.
- Karami M, Asri-Rezaei S, Dormanesh B, Nazarizadeh A. Comparative study of radioprotective effects of selenium nanoparticles and sodium selenite in irradiation-induced nephropathy of mice model. *Int J Radiat Biol* 2018; 94 (1): 17-27.
- Khattab HAH, Abdallah IZA, Yousef FM, Huwait EA. Efficiency of borage seeds oil against gamma irradiation-induced hepatotoxicity in male rats: possible antioxidant activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2017; 14(4): 169-79.
- Kilciksiz S, Demirel C, Erdal N, Gürgül S, Tamer L, Ayaz L, Ors Y. The effect of N-acetylcysteine on

- biomarkers for radiation-induced oxidative damage in a rat model. *Acta Med Okayama* 2008; 62 (6): 403-9.
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, et al. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer* 2008; 100 (11): 773-83.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71 (4): 952-8.
- Liu Y, Zhang H, Zhang L, Zhou Q, Wang X, Long., Dong T, Zhao W. Antioxidant N-acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 575 (1-3): 142-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 (1): 265-75.
- Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 2008; 75 (3): 773-80.
- Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic Biol Med* 2003, 34 (6): 689-95.
- Patton S, Kurtz GW. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J Dairy Sci* 1951; 34: 669-74.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16 (2): 359-64.
- Radwan RR, Mohamed HA. Nigella sativa oil modulates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells against liver injury in irradiated rats. *J Photochem Photobiol B* 2018; 178: 447-56.
- Scibior D, Skrzycki M, Podsiad M, Czeczot H. Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clin Biochem* 2008; 41: 852-8.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25 (1): 192-205.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215 (2): 213-9.
- Simsek Y, Gurocak S, Turkoz Y, Akpolat N, Celik O, Ozer A, Yilmaz E, Turhan U, Ozyalin F. Ameliorative effects of resveratrol on acute ovarian toxicity induced by total body irradiation in young adult rats. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2012; 25 (4): 262-6.
- Sun Y, Oberley WL, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- Thomas SH. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacol Ther* 1993; 60 (1): 91-120.
- Tosetti F, Ferrari N, De Flora, Albini A. Angioprevention: Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J* 2002; 16 (1): 2-14.
- Xie Y, Zhao QY, Li HY, Zhou X, Liu Y, Zhang H. Curcumin ameliorates cognitive deficits heavy ion irradiation-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 126: 181-6.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of Nacetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 6-20.



Nevşehir İlindeki Kesimhanelerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi ve Vankomisin Dirençliliğinin İncelenmesi

Ömer Tolga YILMAZ¹, Harun HIZLISOY²

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Harun HIZLISOY; E-posta: hizlisoy@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-3391-0185

Atıf yapmak için: Yılmaz ÖT, Hızlısoy H. Nevşehir ilindeki kesimhanelerden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının moleküler tiplendirilmesi ve vankomisin dirençliliğinin incelenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 227-234.

Özet: Bu çalışma, kesimhanelerde *Staphylococcus aureus*'un mevcudiyetini, izolatların moleküler tiplendirmesini ve izolatların vankomisin antibiyotiğine duyarlılığını tespit etmeyi amaçlamaktadır. Nevşehir ilindeki üç farklı kesimhane-den sıvap ile alınan; sığır karkası, duvar, bıçak, kesme tahtası yüzeyleri ve kesimhane atık su örnekleri çalışma kapsamında materyal olarak kullanılmıştır. Her bir kesimhaneden; 10 adet sığır karkası yüzeyi, 10 adet duvar yüzeyi, 10 adet bıçak yüzeyi, 10 adet kesme tahtası yüzeyi ve 10 adet atık su olmak üzere, bir kesimhaneden toplam 50 adet; üç kesimhaneden toplam 150 adet numune incelenmiştir. Etken izolasyonunu takiben izolatların identifikasyonu fenotipik ve moleküler yöntemlerle (PCR) yapılmıştır. İzolatların vankomisine duyarlılıkları E test ile test edilmiştir. Ayrıca izolatların genetik yakınlıkları Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmada 150 örnekten 150 izolat elde edilmiş, bu izolatların 65'i (%43.3) fenotipik olarak koagülaz pozitif stafilocok olarak tespit edilmiştir. Bu 65 izolatın 6'sı (%4) ise PCR sonucu *S. aureus* olarak identifiye edilmiştir. Elde edilen *S. aureus* izolatlarının tümünün (duyarlı: ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. ERIC-PCR analizi sonucu izolatların genotipik olarak farklı olduğu saptanmıştır. Hem gıda toksikasyonlarının önüne geçmek hem de karkas kalitesini artırmak ve kırmızı etin raf ömrünü uzatmak için, kesimhanede hijyen koşullarına dikkat edilmelidir. Yapılan antibiyotik duyarlılık test sonucu, direnç tespit edilmemesi olumlu olmakla birlikte, antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımından kaçınılmalı ve kullanımları kontrol altında tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: E test, halk sağlığı, kesimhane, vankomisin, VRSA

Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from Slaughterhouses in Nevşehir Province (Turkey) and Investigation of Vancomycin Resistance of The Isolates

Summary: This study aims to determine the presence of *Staphylococcus aureus* in the slaughter houses, the molecular typing of the isolates and the susceptibility of the isolates to the vancomycin antibiotic. The samples collected from cattle carcass, wall, knife, wastewater and cutting board from three different slaughterhouses in the Province of Nevşehir, in the scope of the study, were used as material. Fifty swab samples of 10 beef carcass surfaces, 10 wall surface, 10 blade surface, 10 cutting board surface and 10 waste water were taken from each slaughterhouse; a total of 150 swab samples were analyzed. The identification of the isolates was performed by phenotypic and molecular methods (PCR) following the isolation of the agents. The susceptibility of the isolates to vancomycin was tested by E test. In addition, genetic proximity of the isolates was investigated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). In this study, 150 isolates were obtained from 150 samples. 65 (43.3%) of these isolates were identified as coagulase positive staphylococci and 6 (4%) of 150 isolates were identified as *S. aureus*. All *S. aureus* isolates (susceptible: ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$; moderately sensitive: 4-8 $\mu\text{g/ml}$; resistant: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) were found to be susceptible to vancomycin. According to the ERIC-PCR analysis, isolates have been determined to be genotypically different. Special attention should be paid to hygiene conditions in slaughterhouses, both to prevent food poisoning and to improve carcass quality, and to extend the shelf life of red meat. Although it is pleasing that no resistance is detected as a result of our antimicrobial susceptibility test; unconscious use of antibiotics should be avoided, and their use should be kept under control.

Key words: E Test, public health, slaughterhouse, vancomycine, VRSA

Giriş

Stafilokoklar, toplum sağlığı açısından önemli pato-

jenlerdir. *Staphylococcus aureus* insanlarda normal biotada bulunmakla birlikte, sağlığı olumsuz yönde etkileyen; endokardit, bakteriyemi ve gıda kaynaklı intoksikasyonların önde gelen nedenlerindendir (Hızlısoy ve ark., 2018). *S. aureus*, insanların % 30'unun mukozalarında bulunurken, bu oranın gıda sektöründe çalışanlarda %26-39.9 arasında olduğu

Geliş Tarihi/Submission Date : 03.09.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.02.2020

*Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2018-7812 nolu Yüksek Lisans Tez projesinden türetilmiştir.

ve bunların da %8-17.4'ünün enterotoksijenik *S. aureus* suşları olduğu belirtilmiştir (Tong ve ark., 2015). Ayrıca, personel hijyeninin değerlendirilmesinde gıdalardaki *S. aureus* kontaminasyonu, indikatör olarak kullanılmaktadır (Yıldırım ve ark., 2017). Çiftlik hayvanlarında yoğun olarak antibiyotik kullanımı, karkas ve sakadatlarda kalıntıya ve mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmaktadır (Gomez-Gil ve ark., 2000). Antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalar gıdalarda da bulunmakta ve bu gıdaların tüketimi sırasında vücuda alınabilmektedir. Bunun sonucu olarak, vücuda giren dirençli mikroorganizmalar insanlarda sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olmakta ve toplum sağlığını tehdit etmektedir (Terzi ve ark., 2015). Penisilin dirençli *S. aureus*'un tedavisi için, 1959 yılında metisilin geliştirilmiş olmasına karşılık; kısa süre içerisinde *S. aureus* metisiline karşı da direnç geliştirmiş ve 1961 yılına gelindiğinde laboratuvar suşunda direnç kaydedilmiştir (Barber, 1961). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde başarı, trisiklik bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin ile sağlanmış ve vankomisin bu tür enfeksiyonların tedavisinde tercih sebebi olmuştur (Sorrell ve ark., 1982). Vankomisinin tekrarlayan ve uzun süre kullanımları sonucu dirençli suşlar gelişmeye başlamıştır (Gardete ve Tomasz, 2014). Bunun sonucunda, önemli bir patojen etken olan, vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), ilk kez 1989 yılında Birleşik Devletler'de bildirilmiştir. İlerleyen zamanlarda ise sırasıyla 1996 yılında Japonya'da, 1997 yılında ise Birleşik Devletler'de vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* (VISA) suşları kayda geçmiştir (Sancak, 2011). VISA, tüm dünyada tanımlanan MRSA izolatları arasında artan sıklıkta bildirilmeye başlanmıştır (Howden ve ark., 2010). MİK değerlerindeki ılımlı artışlarına rağmen, VISA enfeksiyonlarının vankomisin ile tedavisi tedavisi sıklıkla başarısızlıkla son bulmuştur (Gardete ve Tomasz, 2014). Son yıllarda, stafilokokların antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin hızla arttığı belirlenmiş ve yapılan güncel çalışmalarda da gıdalarda bulunan *S. aureus*'un antibiyotik direnç yönünden analizleri önem kazanmıştır (Fijalkowski ve ark., 2016).

Et ve et ürünleri vasıtasıyla yayılabilecek dirençli suşların tespiti ve takibi açısından yapılan bu çalışmada, Nevşehir'de bulunan üç adet kesimhaneden örnekler alınarak, *S. aureus* mevcudiyetinin belirlenmesi, elde edilen izolatlarda vankomisin direncinin saptanması ve bu izolatların moleküler tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Karkas ve kesimhane örnekleri

Bu çalışmada; Ekim-Kasım 2018 tarihleri arasında, Nevşehir ilinde bulunan, üç adet, büyükbaş kesimhanelerinin her birinden 50 adet (10 adet kesim tahtası

yüzeyi, 10 adet bıçak yüzeyi, 10 adet duvar yüzeyi, 10 adet karkas yüzeyi ve 10 adet kesimhane atık suyu), toplamda 150 adet sıvap numunesi alındı. Numuneler; karkaslardan, kesme tahtaları yüzeylerinden ve duvar yüzeylerinden 10X10 cm boyutunda steril metal çerçeve kullanılarak alındı. Numuneler metal çerçevenin içerisinde, 10 kez yukarı aşağıya ve 10 kez de bir kenardan diğerine olacak şekilde alındı (Ertaş Onmaz ve Datlı, 2018). Diğer numuneler ise bıçakların sadece karkasla temas eden metal yüzeyinden ve kesim esnasında akmakta olan atık suya sıvabın daldırılıp çıkarılmasıyla toplandı. Alınan numuneler *S. aureus* varlığı yönünden materyal olarak kullanıldı. Örnekler steril bir şekilde 24 saat içerisinde soğuk zincirde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Laboratuvarı'na getirilerek incelemeye alındı.

Standart suş

Çalışmada, izolasyon, identifikasyon aşamaları ve antibiyotik duyarlılık testi için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 referans suşu kullanıldı.

S. aureus'un izolasyon ve identifikasyonu

İzolasyon amacıyla sıvaplar *S. aureus* için selektif besiyeri olan Egg Yolk Tellüritli Baird Parker agar (Oxoid, İngiltere) (ISO 6888) besiyerine inoküle edildi ve 24-48 saat aerobik koşullarda 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda Baird Parker agar üzerinde siyah koloni etrafında parlak zon oluşturan koloniler seçilerek kanlı agara (Oxoid, İngiltere) inoküle edildi ve 24-48 saat aerobik koşullarda 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucu gelişen koloniler, fenotipik identifikasyon testlerine (Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi, beta hemoliz testi, koagülaz testi) tabi tutuldu. *S. aureus* yönünden pozitif bulunan izolatlar, sonraki testlerde incelenmek amacıyla %10 gliserinli (Merck, Almanya) Brucella Broth (Oxoid, İngiltere) sıvı besiyeri içeren kriyotüplerde -20°C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyonu

Bakteri DNA'sını elde etmek için InstaGene Matrix (Bio-Rad, ABD) ekstraksiyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi için kit protokolünde yer alan direktiflere bağlı kalındı. Kısaca, fenotipik olarak doğrulanan izolatlara ait 24 saatlik sıvı kültürden endorflara yaklaşık 1 mL alındıktan sonra 12.000xrp'm'de 1 dakika santrifüj edildi. Ependorfun üstünde biriken sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırılarak altta kalan pelletin üzerine 200 µL InstaGene Matrix solüsyonundan eklenerek vorteks ile (Velp, İtalya) homojenize edildi ve 56° C'de 15-30 dk. inkübe edildi. Daha sonra bu süspansiyon 10 sn. boyunca yüksek hızda vortekslenerek homojenize edilen süspansiyon 100° C'lik su banyosunda 8 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12.000x rpm'de 2-3 dk süreyle santrifüj edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen süpernatandan 20 µL

alınarak PCR reaksiyonlarında template DNA olarak kullanılmak üzere -20° C'de saklandı.

Moleküler identifikasyon

Karkas ve kesimhane materyallerinden izole edilen ve fenotipik testlerle *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların PCR ile moleküler olarak teyidi yapıldı. PCR analizinde, *S. aureus*'un termostabil nükleazını kodlayan *nuc* geninin amplifikasyonu için *nuc*-F166 ve *nuc*-R565 primerleri kullanıldı (Tablo 1) (Crago ve ark., 2010). PCR reaksiyonu toplam 25 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşimi; her bir primerden 0.2 µM, 200 µM dNTP, 2.5 µL PCR reaksiyon buffer, 3mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polimeraz (ThermoScientific, ABD) ve 1 µL örnek DNA'sından oluşturuldu. Termal döngü; 94° C'de 5 dk ilk denatürasyonu takiben; 30 siklustan oluşan 94° C'de 10 sn denatürasyon, 59° C'de 20 sn primer bağlanması, 72° C'de 10 sn. uzama ve daha sonra tek siklustan oluşan 72° C'de 5 dk. son uzama şeklinde gerçekleştirildi.

kanlı Mueller Hinton Agar'da aerobik ortamda 18-24 saat inkübasyon sonucu üretildi. Oluşan bakteri kolonileri besiyeri üzerinden toplanarak %0.075 NaCl içinde süspansiyon edildi ve bakteri yoğunluğu McFarland No:0.5 (1.5 x 10⁸ CFU/mL) standardına göre ayarlandı. Yoğunluğu ayarlanan bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton agar besiyerine 0.1 mL ekim yapıldı ve steril bağıet ile yayıldı. Takiben E test kartuşları bakteri ekilen bu besiyeri üzerine yerleştirildi. Besiyerleri aerobik ortamda 37° C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekim alanında oluşan eliptik inhibisyon zonlarının keşiştiği nokta MİK değeri olarak kabul edildi ve izolatların duyarlı, orta duyarlı ve dirençlilik durumları CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (CLSI, 2017).

İstatistiksel analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde kesimhanelerdeki *S. aureus* varlığı ile duvar, bıçak, atık su, tahta ve karkaslardan alınan sıvı örneklerini karşılaştırmak amacıyla "ki-kare testi" uygulandı. Ki-kare testi için SPSS (Windows için Sosyal Bilimler için İstatistik

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükler

Primer	Primer Dizilimi (5'--3')	Gen Bölgesi	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
NUC-F166	AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA	<i>nuc</i>	400	Dongyou, (2010)
NUC-R565	TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT			
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC	-	-	Ye ve ark. (2012)
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	-	

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR ile moleküler tiplendirme

S. aureus izolatlarının moleküler tiplendirilmesi amacıyla ERIC-PCR ile yapıldı ve testte ERIC-1(5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC-3') ve ERIC-2(5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') primerleri kullanıldı (Ye ve ark., 2012). PCR bileşimi, 5 µL 10xPCR buffer A, 4 mM MgCl₂, 5 U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, ABD), 0.2 mM dNTP miks, 25 pmol her bir primerden ve 1 µL örnek DNA'sını içeren toplam 50 µL hacimde oluşturuldu. Amplifikasyon; 94° C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben 40 siklustan oluşan 94° C'de 1 dk. denatürasyon, 25° C'de 1 dk. primer bağlanması ve 72° C'de 2 dk. uzama şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerin, %2'lik agaroz jelde elektroforezi yapılmış ve oluşan bantlar jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) incelenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi

E Test: *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test stripleri (MA0102, Oxoid, İngiltere) eşliğinde gerçekleştirildi ve MİK düzeyi ve MİK aralığı tespit edildi. Bunun için; *S. aureus* izolatları %5 defibrine koyun

Paketi) 23.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanıldı.

Bulgular

S. aureus izolasyon sonuçları

Bu çalışmada Nevşehir ilinde bulunan üç ayrı kesimhaneden toplanan 150 adet numune, *S. aureus* yönünden incelendi. Toplanan 150 numuneden 150 adet izolat elde edildi. Elde edilen 150 izolatın; 65'i (%43.3) koagülaz pozitif stafilokok, bu 65 izolatın 6'sı (%4) da *S. aureus* olarak tanımlandı.

S. aureus'un PCR ile tespiti

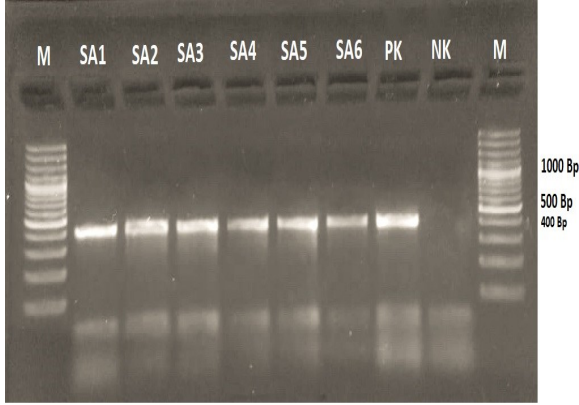
S. aureus'un "*nuc*" geninin amplifikasyonunun hedeflendiği tür spesifik PCR'de 400 bp bant büyüklüğündeki amplifiye ürünler pozitif kabul edildi. Bu yöntemle, fenotipik olarak *S. aureus* şeklinde tanımlanan 6 (%4) izolatın tamamı, PCR ile *S. aureus* olarak doğrulandı. *S. aureus* pozitifliği 1 nolu kesimhanede (2 atık su örneği ve 1 kesme tahtası yüzey örneğinden), 2 nolu kesimhanede (2 duvar yüzeyi ve 1 karkas yüzeyinden) elde edilirken, 3 nolu kesimhanede pozitif izolat tespit edilemedi. Çalışmada kesimhanelerdeki

duvar, bıçak, atık su, tahta ve karkaslardan alınan sıvı örneklerinde ve kesimhanelerdeki *S. aureus* izolasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

sonucunda izolatların 5 ile 14 arasında bant vererek farklı profiller sergilediği görüldü. Bu sonuca göre, izolatların tamamının birbirinden farklı olduğu tespit edildi.

Tablo 2. Kesimhane bazlı *S. aureus* izolasyon ve identifikasyon bulguları

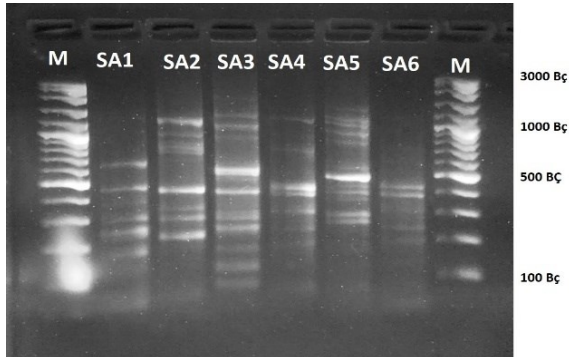
Örnek	Kesimhane 1 n=50	Kesimhane 2 n=50	Kesimhane 3 n=50	Yüzde %
Kesim tahtası yüzeyi (T) (n=30)	SA1	-	-	%3.3
Bıçak yüzeyi (B) (n=30)	-	-	-	-
Duvar yüzeyi (D) (n=30)	-	SA4-SA5	-	%6.6
Karkas yüzeyi (K) (n=30)	-	SA6	-	%3.3
Kesimhane Atık Suyu (S) (n=30)	SA2-SA3	-	-	%6.6
Toplam	3	3	-	%4.0



Şekil 1. Tür-spesifik PCR'ye ait amplifiye ürünlerin % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 400 bp'lik amplifiye ürünler *S. aureus* spesifiktir. PK: Pozitif Kontrol (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), NK: Negatif Kontrol (Distile su), M: Marker (SM0321, Generuler, 100Bp plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, ABD), SA1-6: *S. aureus* izolatları

ERIC-PCR sonuçları

S. aureus izolatları üzerine uygulanan ERIC-PCR



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarının %2'lik agaroz jeldeki ERIC-PCR paternleri. M: Marker (SM0321, Generuler, 100Bp plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, ABD), SA1-6: *S. aureus* izolatları

Antibiyotik duyarlılık testi

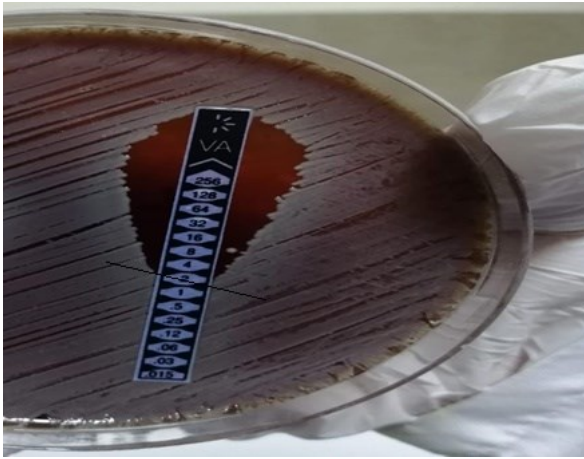
E Test sonuçları: Vankomisin, *Staphylococcus aureus* izolatlarına özgü MİK düzeylerini belirlemek amacıyla uygulanan E test sonucunda, tüm izolatlar CLSI kriterlerine göre (duyarlı: ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; orta duyarlı: 4-8 $\mu\text{g/ml}$; dirençli: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Buna göre MİK düzeyleri iki izolat için 0.5 $\mu\text{g/ml}$, bir izolatta 1 $\mu\text{g/ml}$, üç izolatta ise 2 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde bulunmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Stafilokoklar toplum sağlığı açısından son derece önemli patojen mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. *S. aureus*, insanlarda normal biyotada bulunmakla birlikte, sağlığı olumsuz yönde etkileyen; endokardit, bakteriyemi ve gıda kaynaklı intoksikasyonların önde gelen sebeplerinden birisi olarak tespit edilmiştir (Hızlısoy ve ark., 2018). Aynı zamanda *S. aureus*, birçok ülkede resmi kayıtlara göre gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların üçüncü en yaygın sorumlusu olarak belirtilmiştir (Veras ve ark., 2008). Stafilocokal gıda zehirlenmesi, enterotoksijenik stafilocokların besinlerde 10⁶ kob/g seviyesinin üzerinde olması ve ürettikleri enterotoksinlerin sindirim yoluyla alınmasını takiben şekillenmektedir. Bunun yanı sıra, stafilocokal enterotoksinler (SE) artrit, alerjik reaksiyonlara, toksik şok benzeri sendroma ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (Cha ve ark., 2006). Çeşitli çalışmalarda değişik kaynaklardan ayrılan *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %15-80'inin SE üretebildiği bildirilmiştir. Stafilocokal enterotoksin A (SEA), en sık stafilocokal gıda kaynaklı salgınlarla ilişkili enterotoksindir ve bunu stafilocokal enterotoksin (SED) takip etmektedir (Yıldırım ve ark., 2019). Kesim işlemi esnasında karkas, hayvanların derilerindeki ve sindirim sistemindeki *S. aureus*'la kolaylıkla kontamine olabilmektedir. Ayrıca personelin hijyen noksanlığı da karkası kontamine edebilmektedir (Keyvan, 2014). Bu çalışmada alınan örneklerden 65'inde (%43.3) koagülaz pozitif stafilocok tespit edilmiştir. Sığır karkaslarından koagülaz pozitif stafilocok mevcudiyeti yönünde daha önce yapılan çalışmalardan farklı seviyelerde sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları (CLSI, 2017)
(S: Duyarlı I: Orta duyarlı R: Dirençli MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon)

VAN-KOMİ SIN	S	I	R	Örnek	MİK (µg/mL)
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA1	0.5 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA2	2 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA3	2 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA4	1 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA5	0.5 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA6	2 S



Şekil 3. *S. aureus* izolatının vankomisin duyarlılığının E test ile saptanması (İzolatin eliptik inhibisyon zonlarının keşiştiği nokta (MİK değeri) ≤2 µL/mL)

Keyvan ve Özdemir (2016), Ankara'da yaptıkları çalışma neticesinde, toplam 120 sığır karkasından sünger sıvap yöntemi ile alınan örneklerin 32'sinde (% 26.6) koagülaz pozitif stafilocok bulunduğunu belirtmişlerdir. Özdemir ve ark. (2010), tarafından yapılan bir diğer çalışmada 120 sığır karkasından toplanan örneklerin 46'sının (%38.3) koagülaz pozitif stafilocok yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen izolasyon oranının, daha önce yapılan çalışmalarda saptanan oranlara nazaran yüksek olduğu görülmekte olup; bu durumun çalışma alanının kontaminasyonunun daha fazla olmasından kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir. Bu çalışmadaki izolasyon oranlarına benzer veya daha yüksek oranlar da bildirilmiştir. Beyene ve ark. (2017), tarafından yapılan bir çalışmada ise materyal olarak kesimhanede kullanılan bıçak, kesim hattı ekipmanları ve karkas yüzeyi sıvap örnekleri toplamış, yapılan analizlerde %43.47 düzeyinde koagülaz pozitif stafilocok bulunduğu tespit edilmiştir. Desmarchelier ve ark. (1999), üç farklı kesimhaneden topladıkları sığır karkaslarında sırasıyla %62, %85 ve %89 düzeylerinde koagülaz pozitif stafilocok tespit etmişlerdir. Araştırmanın bulguları, birinci kesimhane hariç, bu çalışmadaki izolasyon oranına göre oldukça yüksek saptanmıştır. Bu durumun kontaminasyonunun fazla olmasın-

dan kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca, kesimhanelerin fiziki yapı farklılıkları, kesilen hayvan türü, örneklem alanları, örnekleme materyalleri, örnekleme tarzları ve hatta kültürel işlem/besiyeride etken yaygınlığındaki farklılıkların diğer olası nedenleri olabilir.

Bu çalışmada izole edilen koagülaz pozitif stafilocokların fenotipik ve moleküler testleri sonucunda izolatların 6'sı (%4.0) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Kesimhanelerde *S. aureus* tespitine yönelik birçok çalışma bildirilmiştir.

Keyvan ve Özdemir (2016) çalışmalarında, toplam 120 sığır karkasından sünger sıvap yöntemi ile alınan örneklerin 15'inde (%12.5) *S. aureus* tespit etmişlerdir. Yılmaz ve Gümüş (2004) tarafından yapılan çalışmada, kesimhaneden alınan 150 karkas sıvap örneği incelenmiş ve %30 oranında *S. aureus* saptanmıştır. Türkiye'de yapılan bu çalışmalarda tespit edilen *S. aureus* oranlarının, bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak; numune alma yöntemindeki ve kesimhane şartlarındaki farklılıklar, kesim öncesi hayvanların derilerindeki mikrobiyal yükün fazlalığı ve bunun kesim esnasında karkasa bulaşma olasılığı kaynaklı olabileceği şeklinde düşünülmektedir. Tanih ve ark. (2015) tarafından Güney Afrika'da üç farklı kesimhaneden kesilen sığır karkaslarından alınan 112 adet sıvap örneği fenotipik olarak incelenmiş ve bunların 30'u (%26.7) *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur. Adugna ve ark. (2018), Etiyopya'da bir kesimhanede kullanılan kesme tahtası ve bıçak yüzeyi sıvap örneklerinden (40'ar adet) sırasıyla 6 (%15.0) ve 9 (%22.5) *S. aureus* tanımlanmıştır. Bersisa ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 16'şar karkas yüzeyi, kesme tahtası yüzeyi ve bıçak yüzeyi sıvap örneklerinden sırasıyla, 4'ü (%25), 7'si (%43.75) ve 5'i (%31.25) *S. aureus* yönünden pozitif olarak bildirilmiş ve karkas yıkama suyundan aldıkları örneklerde yapılan çalışmada *S. aureus*'a rastlanmadığı belirtilmiştir. Gowda Tanuja ve ark. (2017), 4 farklı kesimhaneden aldıkları, sığır karkas yüzeyi (152), bıçak yüzeyi (109), kesme tahtası yüzeyi (104) sıvap örneklerinin analizi sonucunda, sırasıyla %59.9, %51.4 ve %50 düzeylerinde *S. aureus* bulunduğunu aktarmışlardır. Beyene ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada %13.9 oranında *S. aureus* tespit edilmiştir. Birhanu ve ark. (2017) tarafından Etiyopya'da yapılan çalışmada materyal olarak kes-

me tahtası yüzeyi ve bıçak yüzeyi kullanılmış, her birinden 53 adet sıvap örneği alınmış ve sırasıyla 5'inde (%9.43) ve 2'sinde (%3.77) *S. aureus*, tespit edilmiştir. Bıçak yüzeyinden alınan örneklerde tespit edilen oran bu çalışmada saptanan oranla hemen hemen benzerlik göstermektedir. Literatür taraması sonucunda, sığır karkaslarında *S. aureus* oranları bakımından karşılaştırma yapıldığında, bu çalışmadaki oran diğerlerine nazaran düşük saptanmıştır. Bir numaralı kesimhanede; kesim tahtası yüzeyi ve kesimhaneye atık suyunda, iki numaralı kesimhanede ise duvar yüzeyi ve karkas yüzeyinde *S. aureus* tespit edilmiştir. İki numaralı kesimhanede kontaminasyonun duvar ve karkas yüzeyinde olması, duvarlar yüzeylerinin hijyenini sağlamada kesimhaneye sanitasyon prosedürlerinin tam olarak yerine getirilmemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *S. aureus*'un, özellikle insanların normal biotalarında bulunduğu bilinmektedir. Bu oranlar analiz edildiğinde, çalışanların hijyen konusundaki eksiklikleri, karkası ve ekipmanları kontamine ettiği düşünülebilir. Ayrıca, bu sonuçlar, örneklerin alındığı üç kesimhanedeki hijyen prosedürlerinin daha iyi işletildiği anlamına da gelebilir.

Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test yöntemi ile test edilmiş ve tüm izolatların vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır (duyarlı: ?2 µg/ml). *S. aureus*'un vankomisin duyarlılığının araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur.

Aydın ve ark. (2011), Tanih ve ark. (2015) ve Keyvan ve Özdemir (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, elde edilen *S. aureus* izolatlarına uygulanan antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda, tüm izolatlar vankomisine duyarlı bulunmuştur. Tüm bu çalışmalarda *S. aureus* izolatlarının vankomisine duyarlılığı konusunda saptanan bulgular bu çalışmadaki bulgularla benzerlik göstermektedir. Türkiye'de ve dünya genelinde yapılan vankomisin duyarlılık testi sonuçları incelendiğinde, direnç tespiti olmamasının, dünya genelinde vankomisinin veteriner sahadaki kullanım kısıtlılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Şahal, 2012). Buna karşılık, vankomisine karşı direnç tespit edilen çalışmalar da mevcuttur. Adugna ve ark. (2018), %54.5 vancomycin intermediate resistance *Staphylococcus aureus* (VIRSA) ve %45.5 vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* (VRSA), Gowda Tanuja ve ark. (2017), %78 Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* (VSSA), %14 VIRSA ve %8 VRSA, Beyene ve ark. (2017) %65.1 oranında VRSA tespit etmişlerdir.

ERIC-PCR ile *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların moleküler tiplendirilmesi sonucu izolatların 5 ile 14 arasında bant vererek farklı profiller sergilediği ve izolatların tamamının birbirinden farklı olduğu tespit edildi. Pozitif olarak tespit edilen *S. aureus* izolatları arasında klonal bir yakınlığın bulunmaması ile mezbanın farklı kısımlarından izole edilen izolatların,

çapraz kontaminasyon kaynaklı olmadığı ve bir salgın suşunun bulunmadığı sonucuna varılmıştır. *S. aureus* izolatlarının ERIC-PCR ile tiplendirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan Abdollahi ve ark. (2014)'nın bildirdikleri çalışmada 90 *S. aureus* izolatının tiplendirilmesi yapılmıştır. Adwan ve ark. (2015)'in çalışmalarında ERIC-PCR ile SCC mec ve spa tiplendirme birlikte kullanılmıştır. Arslan ve Mutlu (2016)'nın çalışmalarında sığır mastitis olgularından izole edilen 98 *S. aureus* izolatlarının ERIC-PCR ile tiplendirilmesi yapılmış ve 64 farklı ERIC genotipinin bulunduğu ifade edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada, kültürel yöntemlerle izole edilen 65 (%43.3) koagülaz pozitif stafilokokun fenotipik ve PCR temelli moleküler yöntemlerle yapılan analizinde 6'sı (%4) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test stripleri ile analiz edilmiş ve izolatların tamamının vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır (? 2 µg/ml). ERIC-PCR ile yapılan genotiplendirme sonucu altı izolatın hepsinin farklı profil gösterdiği ve böylelikle birbirlerinden farklı genotipe sahip izolatlar oldukları ortaya konulmuştur.

İnsanların ve hayvanların doğal biotasında bulunan *S. aureus*, hijyen eksikliğinin ortaya konmasında gıdalarda indikatör bir role sahiptir. İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan kırmızı etin ilk işlendiği yer olan kesimhanelerde mikroorganizma yükünün minimal düzeyde tutulması gereklidir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testi neticesinde vankomisin *S. aureus*'lar için hala etkili olduğu ortaya konmuştur. Antibiyotik kullanımının sınırlandırılması konusunda WHO tarafından, farkındalığı artırmaya yönelik çalışmalara hız verilmiş durumdadır. Bu durum hayvanların ve insanların maruz kaldığı gereksiz antibiyotik uygulamalarının önüne geçilmesini amaçlamaktadır. Hayvan hastalıklarının önlenmesi, dolayısı ile sağlıklı ve kaliteli içermeyen kırmızı etin tüketiciye ulaşmasındaki altın kural ise koruyucu hekimliktir. Kesimhanelerde hijyen prosedürlerine yüksek bağlılık ve antibiyotik kullanımında hekim, eczacı ve hayvan sahiplerinin duyarlı davranmaları, özellikle veteriner hekimlikte reçetesiz antibiyotik verilmemesi ve bu şekilde antibiyotik talep edilmemesi önem arz etmektedir.

Teşekkür

TYL-2018-7812 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Adugna F, Pal M, Girmay G. Prevalence and antibiogram assessment of *Staphylococcus aureus* in beef at municipal abattoir and but chers hops in Addis Ababa, Ethiopia. Biomed Res Int 2018: 1-7.

- Abdollahi S, Ramazanzadeh R, Kalantar E, Zamani S. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* with ERIC-PCR method. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2014; 3(3): 158-65.
- Adwan G, Shaheen H, Adwan K, Barakat A. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals environments and patients in Northern Palestine. *Epidemiol Biostat Public Health* 2015;12(3): e11183.
- Arslan E, Mutlu EG. Genotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey by using ERIC-PCR method. *Pakistan J Zool* 2016; 48(6): 1747-52.
- Aydin A, Muratoglu K, Sudagidan M, Bostan K, Okulu B, Harsa S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(1): 63-9.
- Barber M. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *J Clin Path* 1961; 14: 385-92.
- Bersisa A, Tulu D, Negera, C. Investigation of bacteriological quality of meat from abattoir and butcher shops in Bishoftu, Central Ethiopia. *Int J Food Microbiol* 2019: 1-8.
- Beyene T, Hayishe H, Gizaw F, Beyi AF, Abunna F, Mammo B, Ayana D, Walktole H, Abdi RD. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes* 2017; 10(1): 171.
- Birhanu W, Weldegebriel S, Bassazin G, Mitku F, Birku L, Tadesse M, Assesment of microbiological quality and meat handling practices in butcher shops and abattoir found in Gondar town, Ethiopia. *Int J Microbiol Res* 2017; 8(2): 59-68.
- Crago B, Ferrato, C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with food borne illness in Alberta, Canada from 2007. *Food Microbiol* 2010; 32(1): 202-5.
- Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol* 2006; 101(4): 864-71.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Seventh Edition. (CLSI supplement M100 Clinicaland Laboratory Standards Institute), Wayne. Pennsylvania, USA, 2017: 56-63.
- Desmarchelier PM, Higgs GM, Mills L, Sullivan AM, Vanderlinde PB. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australia abattoirs. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 222-9.
- Dongyou L. Molecular Detection of Foodborne Pathogens. First Edition. Boca Raton: CRC Press, 2010; p. 245-55.
- Ertaş Onmaz N, Datlı S. Bir büyükbaş hayvan kesimhanesinde *Escherichia coli* O157:H7 varlığının IMS-PZR teknikleri ile araştırılması. *Eurasian J Vet Sci* 2018; 34(1): 49-55.
- Fijalkowski K, Peitler D, Karakulska J. *Staphylococci* isolated from ready-to-eat meat identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *Int J Food Microbiol* 2016; 238: 113-20.
- Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2014;124 (7): 2836-40.
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000; 191: 259-70.
- Gowda Tanuja KGM, Latha C, Sunil B, Van Damme I. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Listeria* species and *Staphylococcus aureus* in cattle slaughterhouses of Kerala, South India. *Foodborne Pathog Dis* 2017; 14(10): 573-9.
- Hızlısoy H, Ertaş Onmaz N, Karadal F, Al S, Yıldırım Y, Gönülalan Z, Kılıç H. Antibiotic resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from foods of animal origin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2018; 24(2): 244-9.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 99-139.
- Keyvan E ve Özdemir H. Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2016; 63(1): 17-23.
- Keyvan E. Sığır Karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, karakterizasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğinin belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara, 2014; s. 11-7.
- Özdemir H, Şireli UT, Can HY. Determination of microbial surface contamination on beef carcasses. *Arch Lebensmittelhyg* 2010; 61(1): 27-30.
- Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik di-

- renci. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 568-71.
- Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med 1982; 97(3): 344-50.
- Şahal M. Süt ve besi hayvancılığında antibiyotik kullanımı. Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyel Direnç Sempozyumu. 18 Ekim, 2012; Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara-Türkiye.
- Tanih NF, Sekwadi E, Ndip RN, Bessong PO. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. Sci World J 2015: 1-8.
- Terzi G, Gücükoğlu A, Çadırcı Ö, Uyanık T, Alışarlı M. Serotyping and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eatfoods in Samsun, Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2015; 39: 211-7.
- Tong, SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3): 603-61.
- Veras, JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, dos Santos DA, Cerqueira MMOP, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerai Brazil. Int J Infect Dis 2008; 12: 410-5.
- Ye Y, Jiang Q, Wu Q, Zhang J, Lu J, Lin L. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotics susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. Foodborne Pathog Dis 2012; 9(2): 168-71.
- Yıldırım Y, Ertuş Onmaz N, Gonulalan Z, Al S, Yıldırım A, Karadal F, Hızlısoy H, Pamuk Ş. Microbiological quality of pastrami and associated surfaces at the point of sale in Kayseri Turkey. Public Health 2017; 146: 152-8.
- Yıldırım T, Sadati F, Kocaman B, Siriken B. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin detection in raw milk and cheese origin coagulase positive isolates. Int J Sci Lett (IJSL) 2019; 1(1): 30-41.
- Yılmaz İ, Gümüş T. Sığır karkaslarının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi, Onuncu Gıda Kongresi. 21-23 Mayıs 2004; Atatürk Üniversitesi, Erzurum-

Türkiye.



Nevşehir İli Süt Sığırcılığı İşletmelerinin Yapısı ve Hayvan Besleme Uygulamaları Yönünden Değerlendirilmesi*

Yunus SEZER¹, Erol BAYTOK², Aytaç AKÇAY³

¹İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Nevşehir-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Erol BAYTOK; E-mail:ebaytok@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-1267-534X

Atıf yapmak için: Sezer Y, Baytok E, Akçay A. Nevşehir ili süt sığırcılığı işletmelerinin yapısı ve hayvan besleme uygulamaları yönünden değerlendirilmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 235-241.

Özet: Bu araştırmanın amacı Nevşehir ili süt sığırcılığının genel durumu ve hayvan besleme alışkanlıklarını belirlemektir. Araştırma kapsamında Nevşehir ilinde süt sığırı yetiştiriciliği yapılan 105 işletme ziyaret edilerek anket çalışması yapılmıştır. Anket formunda işletmeye ve işletme sahibine ait genel bilgiler, buzağı büyütme ve besleme, düvelerin beslenmesi ve tohumlanması, sağmal ineklerin bakım, besleme, sağım, yemleme ve görülen hastalıklara yönelik sorular sorulmuştur. 105 işletmede toplam 9228 hayvan mevcuttur. Yetiştiricilerin %97'sinin ilköğretim mezunu oldukları ve bunların %75'inin sigortalı oldukları belirlenmiştir. İşletmelerin %78.1'inde günde iki öğün yem verildiği ve verilen yemlerin %97.1'inin sağım sonrası verildiği belirlenmiştir. Tüm işletmelerde doğan buzağılara kolostrum verildiği ancak verilme zamanlarının farklı olduğu görülmüştür. Düvelere, sağmal ineklere, kuru dönemdeki ineklere çoğu işletmelerin özel besleme yapmadığı belirlenmiştir. İşletmelerin %56.2'sinde yemlerin karışık verildiği (kaba yem + konsantre yem), yem miktarlarını ise ölçülmeden tecrübeye dayanarak verildiği belirlenmiştir. İşletmelerin çoğunda kaba yem üretimi yapıldığı belirlenmiştir. İşletmelerin %23.8'inde asidozis ve ketozis, %64.8'inde abomasum deplasmanı, %9.5'inde süt humması, %2.9'unda laminitis görüldüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırma yapılan işletme sahiplerinin hayvan bakım ve besleme konusunda yeterli kadar bilgi sahibi olmadıkları, buzağı beslemede kolostrum ve süt içirme konusunda dikkatli oldukları ancak kaba ve kesif yem verme hususuna dikkat etmedikleri için buzağı gelişiminde sıkıntılar olduğu gözlenmiştir. İşletmede düve, gebe düve ve sağmal ineklerin beslenmesine dikkat edilmediği görülmüştür. Kaba yem üretimi bakımından da çoğunlukla dışa bağımlı oldukları anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Hayvan besleme uygulamaları, Nevşehir, süt sığırcılığı

Evaluation of Structure of Dairy Cattle Farms and Animal Nutritional Practices in Nevşehir Province

Summary: The purpose of this study was to determine the general condition and animal feeding habits of dairy cattle in Nevşehir. Within the scope of the research, 105 farms in Nevşehir, were visited and a survey was conducted. General information about the farm and the owner, calf growing and feeding, feeding and insemination of heifers, care, feeding, milking, diseases of dairy cows was collected through questionnaires. There were 9228 animals in 105 farms. It has been determined that 97% of the breeders were primary school graduates and 75% of them were insured. It was determined that 78.1% of the farms were fed twice a day and 97.1% of the feeds were given after milking. It was observed that calves born in all farms were given colostrum, but their timing was different. It has been determined that most of the farms did not feed specially to heifers, dairy cows and dry cows. In 56.2% of the farms, it was determined that the feeds were given mixed and the feed amounts were given by the rule of thumb. It was determined that roughage production was made in most of the farms. Acidosis and ketosis in 23.8% of businesses, abomasum displacement in 64.8%, milk fever in 9.5%, laminitis in 2.9%. As a result, it has been observed that there were problems in calf development since the owners of the researched research were not sufficiently knowledgeable about animal care and feeding, are careful about colostrum and milk drinking in calf feeding, but do not pay attention to giving rough and dense feed. Since heifers were fed without paying attention to the heifers, pregnant heifers and dairy cows, the yield was not achieved at the desired rates and the profitability was low. In terms of roughage production, it was understood that they were mostly dependent on the outside.

Key words: Animal nutrition applications, Nevşehir, dairy cattle

Geliş Tarihi/Submission Date : 30.06.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 10.08.2020

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen Nevşehir İli Süt Sığırcılığının Genel Durumu ve Hayvan Besleme Alışkanlıkları adlı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Giriş

Dünya nüfusunun hızla artması, kaliteli gıdalara olan ihtiyacı da arttırmış ve uluslararası boyutta stratejik önem kazanmıştır (Denli ve Demirel, 2016). Artan nüfusun dengeli beslenmesi için bitkisel ürünlerin yanında hayvansal ürünler de çok önemlidir (Özkan

ve Demirbağ, 2016). Dünya sağlık örgütü insanın kg ağırlığı başına günlük 1gr protein tüketmesi, bunun da %42'sinin hayvansal kökenli protein olması gerektiğini açıklamaktadır. Türkiye'de çoğunlukla sanayi sektörünün gelişmediği ve kırsal nüfusun fazla olduğu bölgelerde tarımsal üretim yapılmaktadır. Tarımsal üretimin içerisinde yer alan hayvansal üretim önemli bir yere sahiptir (Ünalın ve ark., 2013). Hayvancılık sektöründen elde edilen ürünler sanayi sektörüne ham madde sağladığı (kozmetik, tekstil ve ilaç sektörü) gibi sanayi sektöründe istihdamı da arttırmaktadır (TİGEM, 2019). Ülkemizin coğrafi ve iklim özellikleri büyükbaş, küçükbaş, kanatlı vb. hayvan yetiştiriciliği için oldukça uygun olmasına rağmen bitkisel üretimin gerisinde kalmıştır (Bayındır, 2008).

Hem dünyada hem de ülkemizde hayvancılığın en önemli alt sektörlerinden birisi sığır yetiştiriciliğidir (Şahin ve ark., 2011). Sığır yetiştiriciliği hayvansal kaynaklı gıda üretiminde önemli paya sahiptir (Yaylak ve ark., 2015). Ülkemizde büyükbaş ve küçükbaş hayvanlardan üretilen ürünlere bakıldığında ilk sırayı sığır ürünleri almaktadır (Mayda, 2016). Ülkemizdeki süt üretiminin yaklaşık %92'si, kırmızı et üretiminin de yaklaşık %78'i sığırlardan elde edilmektedir (Şahin ve ark., 2011). Sığır yetiştiriciliği ülkemiz açısından ürettiği et ve süt miktarının yanında insan tüketimine uygun olmayan kalitesiz bitkisel ürünleri geniş getirmesi sayesinde tüketerek kaliteli ürünler (et, süt) vermesinden dolayı da çok önemlidir (Bakır ve Han, 2014). Ülkemizde süt sığırcılığı çoğunlukla aile işletmesi olarak yapıyor olsa da son zamanlarda Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu ile Tarım ve Orman Bakanlığı'nın vermiş olduğu destekleme programlarından dolayı büyük işletme sayısında artış olmuştur (USK, 2019). Desteklemelere rağmen ülkemizde süt sığırcılığının; hayvan bakımı ve beslenmesi konusunda yetiştiricilerin yeterli bilgisi olmaması, ülkemize adapte olmuş yerli ırkların düşük verimli olması, yüksek verimli kültür ırklarına uygun bakım ve beslemenin yapılamaması sonucu hayvan kayıplarının yüksek olması, işletmelerin ihtiyacı olan kaba yemi üretecek arazi olmadığı için kaba yemin satın alınması, üretilen sütün kalite standartlarının altında kalması, suni tohumlamada yeteri kadar başarının elde edilememesi, süt fiyatının düşük ve yem fiyatının yüksek olması gibi temel ve önemli sorunları vardır (Gültekin 2014).

Nevşehir ili genel arazi varlığı verilerine göre (2019) Nevşehir ilinin nüfusu 292 657 kişi olup bunun % 40.23'ü kırsal kesimde yaşamaktadır. Toplam arazisi 538.630,0 hektar (ha) olan Nevşehir ilinin ekilebilir arazi varlığı 352 217,8 ha (%65.4), orman arazisi 13 664,6 ha (%2.5), çayır mera alanı 71 624,3 ha (% 13.3) ve tarıma elverişli olmayan arazi 101 123,3 ha (%18.8)'dir. Nevşehir ili büyükbaş hayvan sayılarına bakıldığında toplam 79.346 adet büyükbaş hayvan varlığına sahiptir. Bunların 48 361'i kültür ırkı, 30 383'ü melez, 602'si ise yerli sığırdan oluşmaktadır.

Bu araştırma ilimizde süt sığırcılığının genel durumu ve hayvan besleme alışkanlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma İç Anadolu Bölgesinin önemli turizm şehri olan Nevşehir ilinin süt sığırcılığına sosyo-ekonomik durumunu, yetiştirme modellerin, hayvan besleme alışkanlıklarını ve kullanılan yemleri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Araştırma kapsamında Nevşehir ilinde süt sığırcılığı yapan merkez ve merkeze bağlı köylerden tesadüfen 105 adet işletme belirlenmiştir. Nevşehir ili süt sığırcılığının genel durumu ve hayvan besleme alışkanlıklarının belirlenmesi adına işletme sahipleriyle anket çalışması yapılmıştır. Anket formunda; işletmelere ait bilgiler, hayvanlara ait bilgiler, yemlere ve yemlemeye ait bilgilere yönelik sorular yer almıştır.

Anket verileri işletmelerin genel durumu ve hayvan besleme alışkanlıklarına göre hazırlanarak oluşturulan veri küütüğü üzerinde tanımlayıcı istatistik yöntemleri (Alpar, 2010) ile işletmelerde durum tespiti yapılmıştır.

Bulgular

Çalışma yapılan 105 adet işletmede toplam 9228 adet hayvan olduğu belirlenmiştir. Yetiştirilen ırklar incelendiğinde işletmelerin %50.5'inde holstein, % 36.2'sinde holstein ve simental ırkının birlikte yetiştirildiği saptanmıştır. İşletmelerin %82.9'unun kapalı ahır olduğu gözlemlenmiştir. Yetiştiricilerin % 52.4'ünün 31-40 yaş aralığında oldukları, eğitim düzeylerinin ilkökul (%99'u) seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Üreticilerin %75.2'sinin sigorta yaptırdıkları görülmüştür. Üreticilerden %59'unun hayvancılığı ek iş olarak yaptıkları ve %62.9'unun hayvan yetiştiriciliği hakkında hiçbir eğitim almadan geleneksel usullere göre yaptıkları belirlenmiştir. Ayrıca işletmelerin % 72.4'ünde aile, %25.7'sinde işçi çalıştığı tespit edilmiştir. İşletmelerde günlük 2 sağım yapıldığı; sağım da %56.2 oranında seyyar sağım makinesi kullanıldığı belirlenmiştir. İşletmelerin %78.1'inin günde 2 öğün yemleme yaptığı ve bu işletmelerin %97.1'inin yemlemeyi sağım sonrası yaptıkları tespit edilmiştir (Tablo 1).

Buzağı beslemesinde; süt günde 2 öğün olmak üzere biberon ile (%90.5) içirilmektedir. İşletmelerin % 95.2'si buzağıları 3-4 aylık olduklarında süttten kesmekte ve kesif yem ile kaba yem (yonca) vermektedirler. Düveler 16-17 aylık olduklarında ilk tohumlama yapılmakta ve bu düvelerin %72.4'üne özel bir besleme programı uygulanmamaktadır. Sağmal ineklerin %82.9'unun laktasyon dönemine ve süt verimine göre besleme programı uygulanmadığı, doğum yapan ineklere işletmelerin %95.2'sinin doğumdan 2 ay sonra tohumlama yaptırdığı tespit edilmiştir. İşletmelerde

Tablo 1. İşletmelerdeki yetiştiricilere ve sağım ve yemleme sistemine ait bilgiler

Yetiştiriciler			
Değişkenler	Değişken Sınırları	N	%
Yaş	20-30	2	1.9
	31-40	34	52.4
	41-50	40	38.1
	51-60	25	23.8
	>61	4	3.8
Eğitim Düzeyi	İlkokul	104	99.0
	İlkokul Üzeri	1	1.0
Sigorta Durumu	Evet	79	75.2
	Hayır	12	11.4
Hayvancılık Dışı İş	Evet	62	59.0
	Hayır	43	41.0
Hayvan Yetiştiriciliği Eğitimi Alma Durumu	Evet	39	37.1
	Hayır	66	62.9
Sağım ve Yemleme Programı			
Değişkenler	Değişken Sınırları	N	%
Sağım Sayısı	1 Sağım	-	-
	2 Sağım	105	100
Sağım Şekli	Seyyar Makine	59	56.2
	Sağım Ünitesi	46	43.8
Yemleme Programı	1 Öğün	3	2.9
	2 Öğün	82	78.1
	3 Öğün	20	19.0
Yem Verilme Zamanı	Sağım Sonrası	102	97.1
	Sağım Esnası	1	1.0
	Sağım Öncesi	2	1.9

beslenmeye bağlı hastalıkların en başında %64.8 oranında abomasum deplasmanı gelmekte; bunu % 23.8 ile asidozis ve ketosis takip etmektedir (Tablo 2).

İşletmelerin %56.2'sinin kaba ve kesif yemi ayrı ayrı verdiği, verilen bu yemleri de %42'sinin göz kararı, % 38.1'inin tecrübesine göre verdiği ve yem katkı maddelerinin %86.7 oranında kullanıldığı belirlenmiştir. Ayrıca işletmelerin %91.4'ünün yonca, %83.8'inin silajlık mısır ve %96.2'sinin saman ürettikleri; % 98.1'inin dışardan kaba yem temin ettiği görülmüştür. Kesif yemin %69.5'inin yem bayilerinden, %21.0'inin de kooperatiflerden alındığı tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

İşletme sahibine ait veriler incelendiğinde yetiştiricilerin %32.4'ünün 31-40 yaş, %38.1'inin 41-50 yaş, % 23.8'inin 51-60 yaş aralığında olduğunu belirlenmiştir. Aşkan ve Dağdemir (2016), yaptıkları çalışmada yetiştiricilerin yaş ortalamasını 51.22 olarak tespit etmişlerdir. Yetiştiricilerin %100'ünün okuryazar oldukları bunun %99'unun ilkökul, mezunu olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada yetiştiricilerin %74'ünün ilkökul, %21.1'inin ortaokul, %3.5'inin lise mezunu oldukları belirlenmiştir. Önal ve Özder (2008), üreticilerin % 75.2'sinin sigortalı olduklarını belirlemiştir. Yapılan bir çalışmada yetiştiricilerin %6'sının SSK'lı, %74'ünün Bağ-Kur'lu oldukları, %4'ünün yeşil kart sahibi olduğu belirlenmiştir (Tümer ve Kumbasaroğlu, 2008). Yetiş-

tiricilerin %59'unun hayvansal üretim dışı işlerle uğraştığı belirlenmiştir. Şeker ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada yetiştiricilerin %48.0'inin hayvancılık dışı işlerle uğraştığını saptamıştır. Yetiştiricilerin % 62.9'unun süt sığıru yetiştiriciliği hakkında eğitim almadığı belirlenmiştir. Köseman ve Şeker (2016), yaptıkları çalışmada yetiştiricilerin %64.6'sının eğitim almadıklarını belirlemiştir. Yaptığımız çalışmadan ve diğer çalışmalardan elde edilen verilerin incelendiğinde sonuçlarda rakamsal farklılık olmasına rağmen birbirine yakın çıktığı görülmüştür.

Anket çalışması yapılan 105 adet işletmenin % 100'ünün günlük 2 sağım yaptığı ve bu sağımın % 56.2'sinin seyyar makine ile yapıldığı belirlenmiştir. Demir ve ark. (2014), yaptıkları bir çalışmada işletmelerin %95.7'sinin günde iki kez sağım yaptığını ve işletmelerin %78.4'ünün elle, %21.6'sının seyyar makine ile sağım yaptığını tespit etmiştir.

Yemlemenin işletmelerin %78.1'inde günde iki öğün olmak üzere %97.1'inde sağım sonrası yapıldığı belirlendi. Yapılan bir çalışmada işletmelerin % 63.2'sinin günde iki yemleme yaptığı, %31.6'sının da günde üç yemleme yaptığı tespit edilmiştir (Önal ve Özder, 2008). Araştırma sonucu elde edilen veriler ile diğer çalışmaların verilerinin benzer olduğu görülmektedir.

İşletmelerin %90.5'inde buzağılara sütün biberonla

Tablo 2. İşletmelerdeki hayvanlara ait yetiştirme, besleme ve hastalıklarla ilgili bilgiler

Buzağılar				
Değişkenler	Değişken Sınırları	N	%	
Süt İçirilmesi	Biberon	95	90.5	
	Kova	10	9.5	
Süt Verme	2 Öğün	105	100	
Sütten Kesim Yaşı	1-2 Ay	5	4.8	
	3-4 Ay	100	95.2	
Kesif Yem Verilmesi	Evet	103	98.1	
	Hayır	2	2.9	
Kaba Yem Verilmesi	Evet	105	100	
	Hayır	-	-	
Düve ve Sağmal İnekler				
Değişkenler	Değişken Sınırları	N	%	
Düvelerin Tohumlama Yaşı(Ay)	15	9	8.57	
	16	53	50.48	
	17	28	26.67	
	18	15	14.28	
Düvelere Besleme Programı	Evet	29	27.6	
	Hayır	76	72.4	
Laktasyon Dönemine Göre Besleme Durumu	Evet	18	17.1	
	Hayır	87	82.9	
Doğum Sonrası Tohumlama Yaşı (Ay)	1	2	1.9	
	2	100	95.2	
	3	3	2.9	
Beslenme Kaynaklı Hastalıklar				
Değişkenler	Değişken Sınırları	N	%	
Asidozis, Ketozis	Evet	25	23.8	
	Hayır	80	76.2	
Laminitis	Evet	11	2.9	
	Hayır	94	89.5	
Süt Humması	Evet	10	9.5	
	Hayır	95	90.5	
Abomasum Deplasmanı	Evet	68	64.8	
	Hayır	37	35.2	

içirildiği ve tamamında iki öğünde verildiği tespit edilmiştir. Burdur ve Trakya'da yapılan çalışmalarda, sütün işletmelerin %97.4 ve %98'inde biberonla, %1.3 ve %2'sinde annesini emzirme yolu ile verildiği tespit edilmiştir. Burdur'da buzağuların %1.3'ünün kova ile süt içtikleri belirlenmiştir (Elmaz ve ark., 2010; Bintaş, 2011). Buzağuların sütten kesim yaşının işletmelerin %95.2'sinde 3-4 ay olduğunu saptamışlardır. Adana ilinde buzağuların sütten kesim yaşlarının işletmelerin %39'unda 2 aylık ve daha önce, %56'sında 3-4 aylık yaşta, %5'inde 4 ay ve üzeri yaşta olduğu belirlenmiştir (Pirinççi, 2015).

Buzağuların beslenmesinde kesif yemi işletmelerin %98.1'inin, kaba yemi de %100'ünün kullandığı belirlenmiştir. Bayındır (2008), Van ilindeki çalışmasında işletmelerin %8.7'sinde buzağı büyütme yemi kullanılırken, %91.3'ünde buzağı büyütme yemi kullanılmadığını tespit etmiştir. Köse (2006), Uşak ilinde yapmış olduğu çalışmada işletmelerin %14'ünün 1-10 günde,

%36'sının 11-20 günde, %32'sinin 21-30 günde, %4'ünün 31-50 günde, %14'ünün 51 gün ve üzerinde kaba yem verdiklerini tespit etmiştir. Yapılan bu çalışmanın bulgularının bahsi geçen araştırmaların bulguları ile aynı doğrultuda olduğu görülmüştür.

İşletmelerde düvelerin %50.48'inin 16 aylık, %26.67'sinin 17 aylık yaşlarda tohumlandığı tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde düvelerin tohumlanma yaşının 15.93 ay olduğu belirlenmiştir (Ünal ve ark., 2013).

İşletmelerin %72.4'ünün düvelere özel besleme programı uygulamadıkları, sağmal ineklerde ise laktasyon dönemlerine göre besleme programının %82.9'unda yapılmadığı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada işletmelerin %94'ünde düvelere besleme programı yapılmadığı, başka bir çalışmada işletmelerin %56'sının sağmal inekleri verim düzeylerine göre gruplandırarak besleme yapmadıkları belirlenmiştir (Bayındır, 2008; Köse, 2006). İşletmelerin %95.2'sinin doğum

Tablo 3. İşletmelerdeki yemleme, yem üretimi ve teminine ait bilgiler

Değişkenler	Yemleme		N	%
	Değişken Sınırları			
Kaba ve Kesif Yem Verilme Şekli	Karışık		46	43.8
	Ayrı Ayrı		59	56.2
Yem Miktarının Belirlenmesi	Profesyonel		20	19.0
	Tecrübe		40	38.1
	Göz Kararı		45	42.9
Yem Katkı Maddesi Kullanımı	Evet		91	86.7
	Hayır		14	13.3
Değişkenler	Yem Üretimi		N	%
	Değişken Sınırları			
Yonca	Evet		96	91.4
	Hayır		9	8.6
Silajlık Mısır	Evet		88	83.8
	Hayır		17	16.2
Yulaf	Evet		35	33.3
	Hayır		70	66.7
Fiğ	Evet		38	36.2
	Hayır		67	63.8
Saman	Evet		101	96.2
	Hayır		4	3.8
Değişkenler	Yem Temini		N	%
	Değişken Sınırları			
Kaba Yem Satın Alma	Evet		103	98.1
	Hayır		2	1.9
Kesif Yem Temin Edilme Yeri	Fabrikalar		7	6.7
	Kooperatifler		22	21.0
	Yem Bayileri		73	69.5
	Süt Toplama Merkezi		3	2.8

sonrası ikinci ayında tohumlama yaptırdıkları belirlenmiştir. Önal ve Özder (2008), yaptıkları çalışmada doğum yapan ineklerin % 50.9'unun doğumdan 90 gün, % 28.1'inin 75 gün sonra tohumlandığını belirlemişlerdir. Hayvanların verim düzeylerine göre gruplandırma yapılarak besleme programı yapılmadığını araştırma sonuçları ortaya koymaktadır. Diyarbakır ilinde yapılan bir çalışmada işletmelerin %56'sının hayvanları verim düzeyine göre gruplandırma yapmadan besleme programı uyguladığı, başka bir çalışmada işletmelerin %68'inin süt sığırlarında verim düzeylerine besleme yaptığı tespit edilmiştir (Denli ve ark., 2014; Oğuz ve ark. 2013).

Beslenmeye bağlı hastalıklar incelendiğinde işletmelerin %23.8'inde asidozis ve ketozis, %2.9'unda laminitis, %9.5'inde süt humması, %64.8'inde abomasum deplasmanı görüldüğü tespit edilmiştir. Burdur ilinde yapılan bir çalışmada işletmelerin 5,4+-7,6, hipokalsemi 0,5+-0,8, ketozis 0,3+-0,6, abomasum deplasmanı 0,7+-0,9, asidozis 2,8+-8,9, Laminitis 5,6+-14,1 şeklinde görülmektedir (Oğuz ve ark., 2013). Yetiştiricilerin hayvan beslemeden kaynaklı hastalıklar hakkında bilgi sahibi olmadıkları da görülmüştür.

Kaba ve kesif yemi işletmelerin %56.2'sinin ayrı ayrı verdikleri belirlenmiştir. Akkuş (2009), Konya'da işlet-

melerin %70.56'sinin kaba yem ile karma yemi karışık verdiklerini, %22.90'ının önce kaba yem sonra karma yem verdiklerini, %6.54'ünün ise önce karma yem sonra kaba yem verdiklerini tespit etmiştir. Verilen bu yem miktarlarını da işletmelerin %42.9'unun göz kararı, %38.1'inin tecrübesine göre verdiği tespit edilmiştir. Elmaz ve ark. (2010), Burdur ilinde yaptığı çalışmada hayvanlara yem verilme miktarını işletmelerin %92.6'sında yetiştiricinin belirlediğini, % 5.6'sında yem aldığı fabrikadan faydalandığını, % 2.8'inin ise veteriner hekimlerden destek alarak tespit ettiklerini bildirmiştir. Yem katkı maddesini işletmelerin %86.7'sinin yalama tuzu olarak kullandığı görülmüştür. Oğuz ve ark. (2013), Burdur ilinde yaptıkları çalışmada işletmelerin %60'ının yem katkı maddesi kullandığını, %40'ının kullanmadığını tespit etmiştir.

Çalışmamızda kaba ve kesif yemlerin ayrı ayrı verildiği oran çok olmasına rağmen Elmaz ve ark. (2010), yemlemenin karışık verilme oranını yüksek olduğunu tespit etmiştir

İşletmelerin %91.4'ünün yonca, %83.8'inin silajlık mısır, %33.3'ünün yulaf, %36.2'sinin fiğ ve % 96.2'sinin saman ürettiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada işletmelerin %73.2'sinin mısır, %20.6'sının yonca, %20.4'ünün arpa, %17.7'sinin fiğ, %4.6'sının

korunga, %2.1'inin çavdar üretimi yaptıkları belirlenmiştir (Tugay ve Bakır, 2008). İşletmeler büyüklüklerine veya imkânlarına göre kaba yem üretimi yaptıkları çalışmalardan elde edilen veriler ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmada işletmelerin %98.1'inin kaba yemi satın aldıkları belirlenmiştir. Kaba yem üretimini işletmelerin %82'sinin hem üretim yaptığı hem de satın aldığı, %10'unun kendi ürettiği, %8'inin satın aldığı tespit edilmiştir (Oğuz ve ark., 2013). Kesif yemi işletmelerin %65.5'inin yem bayilerinden, %21'inin kooperatiflerden, %6.7'sinin yem fabrikalarından, %2.8'inin süt toplama merkezlerinden temin ettikleri belirlendi. Bayındır (2008), Van ilinde yaptığı çalışmada işletmelerin %74.2'sinin özel bayilerden, %14.6'sinin yem fabrikalarından, %1.1'inin kooperatiflerden, %10.1'inin özel bayilerin yanında fabrikalardan aldığını tespit etmiştir. İşletmeler ihtiyacı olan kaba yemin tamamını kendisinin üretmediği için dışa bağımlı olduğu yapılan çalışmalardan görülmektedir.

Sonuç olarak işletmelerde yetiştiricilerin ilkökul mezunu orta yaş grubundaki insanların olduğu görülmektedir. Yetiştiricilerin sigorta yaptırması, sağım sayısı, sağım şekli yemleme programı ve yem verileme zamanları çalışmada elde edilen olumlu sonuçlar arasındadır. İşletmelerin genelinde iki öğün yemlemenin ağırlıklı olduğu, buzağı beslemede kolostrum, süt ve kaba/kesif yemlerin öneminin bilindiği anlaşılmıştır. Gebe düvelerin ve yeni doğum yapmış ineklerin beslenmesine işletmelerin önemli bir kısmında gereken özenin gösterilmediği saptanmıştır. İşletmelerde düve ve doğum sonrası ineklerin tohumlama zamanlarına dikkat edildiği sonucuna varılmıştır. Beslenmeye bağlı hastalıkları konusunda yetiştiricilerin bilgisinin olmadığı için önlem alınmadığı saptanmıştır. İşletmelerin ihtiyacı olan kaba yemelerin üretimini yapamadığı için dışa bağımlı oldukları belirlenmiştir.

Teşekkür

TYL/2018-8346 kodlu proje ile tez çalışmasına maddi katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Akkuş Z. Konya ilindeki süt sığırcılığı işletmelerinin yapısal özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniv Fen Bil Ens, Konya 2009; s. 39.
- Alpar R. Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik-Güvenirlik; Altıncı Baskı. Detay Yayıncılık, 2010; s. 75-114.
- Aşkan E, Dağdemir V. TRA1 düzey 2 bölgesinde destek ve teşvik alan süt sığırcılığı işletmelerinde süt üretim maliyeti ve karlılık durumu. TEAD 2016; 2(1): 1-12.
- Bakır G, Han F, Yalova ilindeki süt sığırcılığı işletmelerinin yapısal özelliklerini etkileyen faktörler: yem

ve besleme alışkanlıkları. Türk Tarımsal Araş Derg 2014; 1: 55-62.

Bayındır A. Van ilinde büyükbaş hayvan işletmelerinde bakım besleme yöntemlerinin belirlenmesi ve çiftçilerin hayvan besleme hakkındaki bilgi düzeylerinin tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniv Fen Bil Ens, Van 2008; s. 91.

Bintaş H. Trakya Bölgesindeki süt sığırcılığı işletmelerinin yapısal ve ekonomik sorunları, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniv Fen Bil Ens, Tekirdağ 2011; s. 61.

Demir P, Işık Adıgüze S, Sarı M, Ayvazoğlu C. Kars Merkez ilçedeki süt sığırcılık işletmelerinin genel yapısı ve ekonomik boyutu. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2014; 28 (1): 9-13.

Denli M, Demirel R. Diyarbakır ili sığır yetiştiriciliği işletmelerindeki yem kullanımı ve beslenme uygulamaları. YYÜ Tar Bil Derg 2016; 26(4): 495-9.

Denli M, Tutkun M. Sessiz A. Diyarbakır ili süt sığırcılığı işletmelerindeki besleme uygulamaları. Hay Üretim Derg 2014; 55(2): 22-6.

Elmaz Ö, Burdur İli süt sığırcılığı ve özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniv Sağ Bil Ens, Burdur 2010; s. 106.

Gültekin C. Trakya Bölgesinde büyükbaş hayvancılık işletmelerinin üretim-pazarlama sorunları ve çözüm önerileri, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniv Sos Bil Ens, Edirne 2014; s. 119.

Hayvancılık Sektör Raporu. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM) 2019. <https://www.tigem.gov.tr>; Erişim Tarihi:10.01.2020.

Köse K. Uşak İli Damızlık Sığır Yetiştiriciler Birliğine kayıtlı işletmelerin genel yapısı, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniv Fen Bil Ens, Tekirdağ 2006; s. 70.

Köseman A, Şeker İ. Malatya ilinde sığırcılık işletmelerinin mevcut durumu: I. yapısal özellikler. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2016; 30(1): 5-12.

Mayda F. İzmir ilinde süt sığırcılığı yapan işletmelerin ekonomik analizi ve sütün pazar arzı, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniv Fen Bil Ens, Kahramanmaraş 2016; s. 95.

Nevşehir İli Genel Arazi Varlığı 2019. <https://nevşehir.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Istatistikler>; Erişim Tarihi: 10.10.2019.

Oğuz FK, Oğuz MN, Sipahi C. Burdur ili süt sığırcılık işletmelerinde hayvan besleme ve beslenme hastalıklarına ilişkin yapısal durum. Vet Hekim Der Derg 2013; 84(2): 7-19.

- Oğuz MN, Karakaş Oğuz F, Sipahi C. Burdur'da süt üretiminde maliyet durum tespiti ve eğitim faaliyeti 2. kısım: Barınak ve yem kullanımına ilişkin özellikler. Vet Hek Der Derg 2013; 84(1): 1-8.
- Önal AR, Özder M. Edirne İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine üye işletmelerin yapısal özellikleri. Tekirdağ Zir Fak Derg 2008; 5(2): 197-203.
- Özkan U, Şahin Demirbağ N. Türkiye'de kaliteli kaba yem kaynaklarını mevcut durumu. Türk Bil Der Derg 2016; 9(1): 23-7.
- Prinççi E, Adana ili Pozantı ilçesi süt sığırcılığı işletmelerinin genel yapısı, sorunları ve çözüm önerileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv Fen Bil Ens, Adana 2015; s. 97.
- Şahin A, Ulutaş Z, Yıldırım A. Şirin E, Aksoy Y. Türkiye hayvancılığı. GOÜ Zir Fak Derg 2011; 28(2): 159-69.
- Şeker İ, Tasalı H, Güler H. Muş ilinde sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerin yapısal özellikleri FÜ Sağ Bil Vet Derg 2012; 26(1): 9-16.
- Tugay A, Bakır G. Giresun yöresindeki sığırcılık işletmelerinde kullanılan yem çeşitleri ve hayvan besleme alışkanlıkları. Atatürk Üniv Zir Fak Derg 2008; 39(2): 231-9.
- Tümer E, Kumbasaroğlu H. Tokat ili Turhal ilçesinde hayvan sigortası yaptıran ve yaptırmayan işletmelerde inek sütü maliyetlerinin hesaplanması. Atatürk Üniv Zir Fak Derg 2008; 39(2): 187-94.
- Ulusal Süt Konseyi Raporu (USK) 2016. <https://www.ulusalsutkonseyi.org.tr>; Erişim Tarihi: 07.08.2019
- Ünalın A, Serbester U, Çınar M, Ceyhan A, Akyol E, Şekeroğlu A, Erdem T, Yılmaz S. Niğde ili süt sığırcılığı işletmelerinin mevcut durumu, başlıca sorunları ve çözüm önerileri. Türk Tar Gıda Bil Tekn Derg 2013; 1(2): 67-72.
- Yaylak E, Yavuz M, Yener C. Balıkesir ili Gönen ilçesinde süt sığırını yetiştiriciliği. İç Anadolu Bölgesi İkinci Tarım ve Gıda Kongresi. Nisan, 28-30, 2015; Nevşehir-Türkiye.



Kedi ve Köpek Dokularının Farklı Fiksatiflerle Tespiti ve Histolojik Görünümlerinin Karşılaştırılması*

Hazal ÖZTÜRK GÜRGEN, Funda YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Hazal ÖZTÜRK GÜRGEN; E-posta: hazal.ozturk@istanbul.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2748-6189

Atıf yapmak için: Öztürk Gürgen H, Yıldırım F. Kedi ve Köpek dokularının farklı fiksatiflerle tespiti ve histolojik görünümünün karşılaştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 242-247.

Özet: Tespit işlemi, hücre ve doku komponentlerinin ölüm sonrasında morfolojik özelliklerinin canlıdaki durumuna en yakın şekilde sabitleyip, histolojik olarak incelenmesine olanak tanır. Tespit işleminde kullanılan kimyasal ajanlara fiksatif denir. Yirminci yüzyıldan günümüze kadar rutin doku tespit işleminde formaldehit çözeltisi kullanılmaktadır. Her fiksatif doku tespit işlemi süresince doku histomorfolojisinin incelenmesi adına avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle tespit işlemi için amaca yönelik doğru fiksatif ile çalışılması gerekir. Bu çalışmada hedef, 3 farklı fiksatif ile hazırlanan 4 çözeltinin, diğer faktörler optimum seviyede tutularak, doku tespit işlemi sürecinde nasıl etkilere sahip olduklarını belirlemek ve tespit özelliklerine göre en ideal kullanım amaçlarını ortaya çıkarmaktır. Bu amaçla, çalışmada doku tespit işlemi sırasında fiksatiflerin dezavantajlarından etkilenen ve hücre morfolojisinin incelenmesinde zorluklarla karşılaşılan dalak ve böbrek dokuları üzerinde çalışıldı. Yaklaşık 0.5 cm kalınlığındaki doku örnekleri hazırlanan % 3.7'lik, %10'luk formaldehit ve Hollande çözeltilerinde 16 saat, Carnoy çözeltisinde ise 4 saat süre ile tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra alınan doku kesitleri H&E ile boyandı. Bu dokuların histomorfolojik incelemeleri yapıldığında hücre sitoplazma boyanması için en uygun fiksatifin %3.7'lik formaldehit çözeltisi olduğu, hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin morfolojisini ortaya koymada ise Carnoy ve Hollande çözeltilerin kullanımlarının ideal olduğu, ancak Carnoy çözeltisinin eritrositlerde ileri düzeyde lizise yol açtığı gözlemlendi. Sonuç olarak, doku tespit işleminde %3.7'lik formaldehit çözeltisinin kullanımı ideal bulunurken, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin ise hücre çekirdeklerindeki histomorfolojik değişikliklerin detaylı incelenmesini gerektiren hastalıklarda etkili bir kullanım oluşturacakları ön görüldü.

Anahtar kelimeler: Carnoy, formaldehit, Hollande, tespit işlemi

Fixation and Comparative Histologic Evaluation of Cat and Dog Tissues using Different Fixatives

Summary: Fixation is a procedure that allows histological evaluation of cells and tissue components by fixing them to their closest morphological features in life-like state after death. Formaldehyde solution has been in use since the 20th century. During the tissue fixation, each fixatives represent their own advantages and disadvantages on the examination of histomorphological properties of the tissues. So that, the fixation has to be performed with the appropriate fixative depending on the research aim. The aim of this study was to determine the effects of four solutions, prepared by 3 different fixatives, on the tissue fixation process by keeping the other factors at an optimum level and to determine the most ideal use according to the fixation properties. For this purpose, the spleen and kidney tissues were studied, since they are generally affected by the disadvantages of fixatives during the tissue fixation process and lead to difficulties in examining cell morphology. Tissue samples of 0.5 cm thickness were fixed in the 3.7%, 10% formaldehyde and Hollande solutions for 16 hours and Carnoy solution for 4 hours. Thereafter, tissue samples were routinely proceeded, and sections were stained by H&E. The histomorphological examinations of these tissues revealed that the most suitable fixative for cytoplasmic staining was 3.7% formaldehyde solution, while the use of Carnoy and Hollande solutions was ideal in revealing the morphology of the nucleus and nucleolus. However the Carnoy solution caused high lysis in erythrocytes. As a result, it was concluded that the 3.7% formaldehyde solution could be ideally used in tissue fixation process, whereas Carnoy and Hollande solutions were seen to be effective in diseases that require detailed examination of histomorphological changes in nucleus and nucleolus.

Key words: Carnoy, fixation, formaldehyde, Hollande

Giriş

Tespit işlemi, çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle dokuların ölüm sonrasında yaşamsal dönemindeki haline en yakın şekilde korunmasını sağlayarak, mik-

roanatomik yapılarını en ideal düzeyde inceleyebilmek için uygulanan bir seri işlemin ilk basamağını oluşturur (Grizzle, 2001). Tespit işlemi sırasında dokular otolize yol açan bir takım enzimsel ve bakteriyel faktörlerden, enfeksiyöz ajanlardan korunur, hücreler ve hücreler arası komponentler stabilize olur (Fox ve ark., 1985; Eltoum ve ark., 2001; Grizzle, 2009). Bunların yanı sıra, tespit işleminin dokularda büzülme, şişme, sertleşme ve hatta moleküler kayıplar gibi

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.02.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.08.2020

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa 20. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

histokimyasal çalışmaların kalitesini etkileyebilecek dezavantajları da bulunmaktadır (Eltoum ve ark., 2001).

Doku tespit işlemi kimyasal ve fiziksel yöntemlerle yapılabilir. Fiziksel yöntemler arasında; mikrodalg kullanımı gibi ısı işlem uygulamaları ve -40°C'de dondurma metotları bulunmaktadır. Beşeri ve veteriner patolojide en sık tercih edilenler ise kimyasal yöntemlerdir (Eltoum ve ark., 2001). Kimyasal yöntemlerde dokunun "fiksatif" olarak adlandırılan çözeltilerde bekletilmesi söz konusudur. Fiksatifler çözelti içerisindeki çözünür proteinler üzerindeki etkilerine göre; koagülan ve non koagülan fiksatifler olmak üzere sınıflandırılır (Eltoum ve ark., 2001). Çalışma prensiplerine bakıldığında koagülatif fiksatiflerin proteinleri çöktürerek jel haline getirdiği, koagülatif olmayan fiksatiflerin ise proteinlerle çapraz bağlar oluşturduğu bildirilmiştir (Eltoum ve ark., 2001; Doğan, 2005). Çözünür proteinler çözülmemeyen proteinler haline getirilir, böylece dokular in vivo şartlardaki en yakın vaziyetine benzer şekilde sabitlenir ve dokuların yapısı korunur (Doğan, 2005). Bu kapsamda, fiksatif ajanların tek başlarına değil de karışım halinde kullanılmasının daha iyi sonuç verdiğinin fark edilmesiyle, yeni bir sınıflandırma önerilmiştir: Aldehitler (formaldehit, glüteraldehit), oksitleyiciler (osmium tetraoksit, potasyum permanganat), protein denatüre ediciler veya koagülanlar (asetik asit, metil alkol), çapraz bağ yapan diğer ajanlar (karbodiiminler), fiziksel ajanlar ve diğerleri (civa klorür, pikrik asit) (Baker ve Silvertone, 1976). Histopatoloji ve patoloji laboratuvarlarında 20. yy'den bu yana mikroskopik incelemeler için %3.7'lik formaldehit çözeltisi (veya %10'luk formalin) rutin olarak kullanılmaktadır (Grizzle, 2001). Fakat iyi bir tespit işlemi için seçilen fiksatifler amaca yönelik olmalıdır, bu da uygun bir fiksatif veya karma fiksatifleri kullanmakla mümkündür (Baker ve Silvertone, 1976). Fiksatifin seçimi kadar, tespit işleminde kullanılan fiksatifin pH'sı, fiksatifte bekletilme süresi, tespit işlemindeki sıcaklık değeri, fiksatifin konsantrasyonu, ozmolaritesi ve iyon kompozisyonu, ek elektrolit ilavesi gibi unsurların optimum düzeylerde olması ve uygun fiksatifin seçilmesi tespit işleminin kalitesini etkileyen diğer faktörler arasında yer almaktadır (Eltoum ve ark., 2001).

Bu çalışmada, %3.7'lik ve %10'luk formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltileri olmak üzere 3 farklı fiksatif ile hazırlanan 4 çözeltinin, çevresel faktörler optimum seviyede tutularak, doku tespit sürecinde nasıl etkilere sahip olduklarını belirlemek ve tespit özelliklerine göre en ideal kullanımını ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılacak fiksatif çözeltiler anabilim dalı laboratuvarımızda aşağıdaki formülasyonlara göre hazırlandı: %3.7'lik formaldehit çözeltisi (%37'lik for-

malin ve distile su- %10'luk karışım); %10'luk formaldehit çözeltisi (%37'lik formaldehit ve distile su- %25'lik karışım); Carnoy çözeltisi (absolüt alkol 60 ml, kloroform 30 ml ve asetik asit 10 ml); Hollande çözeltisi (70 g bakır asetat, 120 gr pikrik asit, 3.75 ml glacial asidik asit, 300 ml formalin, 3 lt distile su). İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'na rutin uygulamalar çerçevesinde getirilen, 5 kedi ve 5 köpeğe uygulanan nekropsilerden elde edilen toplam 10 adet böbrek ve 10 adet dalak dokusu örnekleri %3.7'lik ve %10'luk formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltileri, çevresel faktörler optimum seviyede tutularak, formaldehit ve Hollande çözeltilerinde yaklaşık 16 saat, Carnoy çözeltisinde ise 4 saat süre ile tespit edildi. Fiksasyon sonrası çeşme suyu altında yıkanan doku örnekleri rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirildi ve parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak H&E ile boyandı. H&E boyama için kesitler; sırasıyla %100'lük, %90'lık, %70'lik alkol serisine daldırma, 1 defa çeşme suyuna daldırma, Hematoksilin'de 5 dk bekletme, 15 dk çeşme suyunda bekletme, 2 dk Eozin'de bekletme ve sırasıyla %70'lik, %90'lık, %100'lük alkol serisine daldırma, ksilole daldırma ve yapıştırıcı ile lamel kapatılması prosedüründen geçirilmiştir.

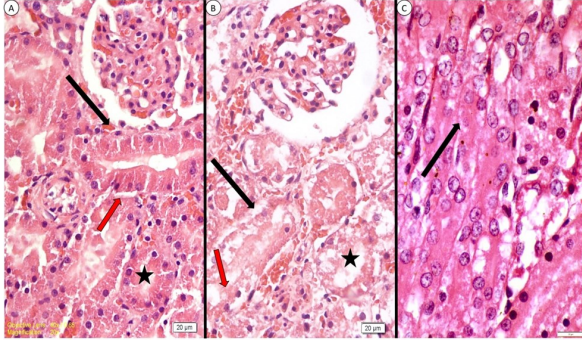
Örnekler ışık mikroskopunda (Olympus BX50) incelendi. Histolojik görünümü değerlendirmek üzere çekirdek, çekirdekçik, sitoplazma boyanmaları ve morfolojik özellikleri, çekirdek ve hücresel düzeyde büzüşme, çekirdek ve hücresel bileşenlerin bozulması ile birlikte eritrositlerin boyanma durumları değerlendirme parametreleri olarak seçildi. Parametreler görüntü kalitesi açısından çok iyi (+++), iyi (++) ve zayıf (+) olmak üzere derecelendirildi.

Bulgular

Kedi ve köpek nekropsilerinden alınan dalak ve böbrek dokularının tespit işleminin ardından, %3.7'lik formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltilerinde dokuların dilimlenebilir kıvamda olduğu gözlemlendi. Örnekler doku takip kasetine alınırken ve parafin doku bloklarından mikrotomla kesit alınması sırasında herhangi bir parçalanma gözlenmedi. Ancak %10'luk formaldehit çözeltisi ile tespit edilen dokularda parafin kesitlerinin alınması sırasında, bu dokuların hafif kırılğan olduğu ve yer yer parçalandığı gözlemlendi.

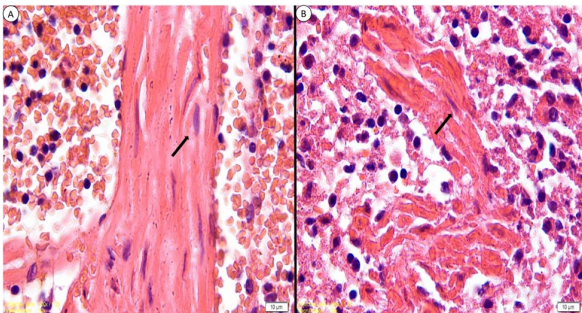
Mikroskopik incelemede böbrek tubul epitel hücrelerine bakıldığında, %3.7'lik formaldehit çözeltisinde hücrelerin optimal düzeyde boya aldığı, sitoplazma ve sitoplazma-çekirdek sınırlarının çok iyi olmasının yanı sıra hücrelerin bazal membran sınırında kaldığı gözlemlendi (Şekil 1A). Ancak %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerin eozinle açık pembe renge boyandığı ve hücrelerin sitoplazmalarında vakuoler değişiklikler olduğu, ayrıca çoğu alanda tubulusların bazal membrandan ayrıldığı ve epitellerde dökülme

olduğu izlendi (Şekil 1B). Hollade (Şekil 1C) ve Carnoy çözeltilerinde ise tubul epitellerinin sitoplazmalarında yoğun eozinofilik boyanma ve hücrelerde şişkinlik gözlemlendi.



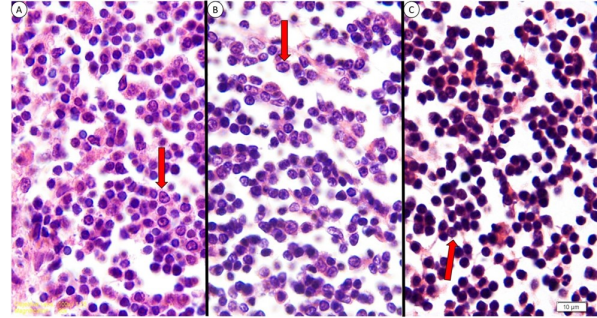
Şekil 1. Böbrek tubul epitel hücreleri. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde tubul epitellerinin hem boyanma (yıldız), hem de hücre sitoplazma ve sitoplazma-çekirdek (kırmızı ok) ve bazal membran sınırları optimum düzeyde (siyah ok). **B.** %10'luk formaldehit çözeltisinde tubul epitel hücrelerinin sitoplazma ve sitoplazma-çekirdek sınırlarının iyi korunmadığı (kırmızı ok) ve epitel hücrelerde vakuoler değişiklikler (yıldız) olduğu, hücrelerin bazal membrandan ayrıldığı (siyah ok) gözleniyor. **C.** Hollade çözeltisi ile yoğun hücre sitoplazmalarında yoğun eozinofilik boyanma ve şişkinlik, ancak bazal membran sınırları optimum düzeyde (siyah ok)

%3.7'lik formaldehit çözeltisinde dalak trabekül miyositlerinde sarkoplazma ve sarkoplazma-çekirdek sınırlarının çok iyi korunduğu (Şekil 2A), ancak %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerde ileri dereceli dehidrasyon ve büzümeye yol açtığı, sitoplazmalarının yoğun hiyalinize görünümde olduğu izlendi (Şekil 2B). Farklı çözeltilerin sitoplazma boyanması ve histomorfolojik incelemeye katkısı Tablo 1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2. Dalak trabeküler kas hücreleri. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisi ile tespit edilen dalak trabeküler kas hücrelerinde, hücrelerin sarkoplazma ve sarkoplazma-çekirdek sınırları (ok). **B.** %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerde ileri dereceli dehidrasyon ve büzümeye efekti ile birlikte, sitoplazmalarında yoğun hiyalinizasyon görüntüsü (ok)

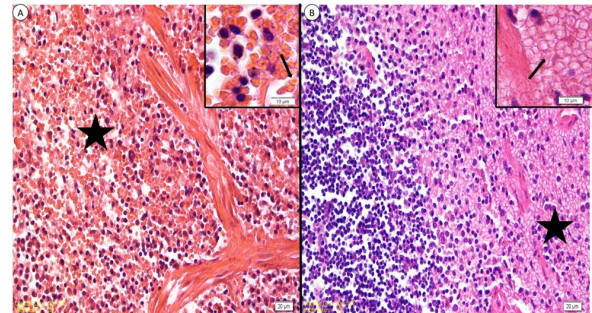
Dalak ve böbrek dokularındaki hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin boyanma durumları histolojik olarak değerlendirildiğinde; en iyi morfolojik strüktür Hollade ve Carnoy çözeltilerinde gözlemlendi (Şekil 3A, B). %3.7'lik formaldehit çözeltisinde ise çekirdekte daha yoğun (hiperkromazik) bir boyanmaya yol açtığı saptandı (Şekil 3C).



Şekil 3. Dalak doku örnekleri lenfositlerdeki hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin histomorfolojik incelenmesi. **A** ve **B.** Hücre çekirdek ve çekirdekçik detayları Hollade (**A**) ve Carnoy (**B**) çözeltilerinde belirgin (kırmızı oklar) **C.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde çekirdekte daha yoğun (hiperkromazi) boyanma (kırmızı ok)

Derecelendirme yapıldığında Hollade ve Carnoy çözeltilerinin çekirdek morfolojileri %3.7'lik ve %10'luk formaldehit çözeltilerine göre daha detaylı incelenebilir oldukları, %3.7'lik formaldehit çözeltisinin ise %10'luk formaldehit çözeltisine oranla daha iyi olduğu izlendi (Tablo 1).

Eritrositlerin durumu incelendiğinde ise, %3.7'lik formaldehit çözeltisinde eritrositlerin morfolojik yapısı ve boyanması çok iyi gözlenirken (Şekil 4A), Carnoy çözeltisinde eritrositlerde belirgin lizis izlendi (Şekil



Şekil 4. Eritrositlerin histolojik görünümü. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde eritrositlerin morfolojik yapısı (yıldız). Ek resim, daha yüksek büyütmede izlenen eritrositlerin boyanması optimum düzeyde ve merkezlerindeki konkav görünüm belirgin (ok). **B.** Carnoy çözeltisinde eritrositlerde belirgin lizis (yıldız). Ek resimde eritrositler daha yüksek büyütmede, hücre kenarları ince kontörle çizilmiş gibi ve merkezleri solgun boyanma ile karakterize (ok)

4B). Hollande çözeltisinde eritrositlerdeki lizis zayıf iken, %10`luk formaldehit çözeltisinde lizis görülmedi, ancak eritrositlerin morfolojik yapısı ve boyanması %3.7`lik formaldehit çözeltisine kıyasla daha soluk izlendi (Tablo 1).

mine tabi tutulduğunda, fiksatifin lenf yumrularına nüfus ederek onları formaldehit çözeltisine göre daha görünür kıldığı, böylece saptanan lenf nodu sayısında belirgin artış izlendiği ve bunun sonucunda da gastrointestinal bölge tümörlerinin evrelendirme sistemine

Tablo 1. %3.7`lik ve %10`luk formaldehit çözeltileri, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin dalak ve böbrek dokuları üzerindeki fiksatif etkileri

Kullanılan fiksatif	Çekirdek ve çekirdekçik boyanması	Sitoplazma boyanması	Eritrosit boyanması
%3.7`lik F	++	+++	+++
%10`luk F	+	+	++
Hollande	+++	+	+
Carnoy	+++	++	+

(F: Formaldehit çözeltisi)

Tartışma ve Sonuç

Diagnostik patolojide rutin fiksatif olarak yüz yılı aşkın süredir %3.7`lik formaldehit çözeltisi (%10`luk formalin) kullanılmaktadır (Grizzle, 2001). Bunun en önemli nedenleri, formaldehit çözeltisinin pahalı olmaması, kolay uygulanabilmesi ve iyi mikroskopik görüntü elde edilebilmesi gibi avantajlar sağlamasıdır (Coleman ve Tsancolis, 2006). Fakat formaldehitin bilinen en büyük dezavantajı yüksek kanserojen etkiye sahip olmasıdır. Yapılan bir çalışmada yüksek miktarda formaldehite maruz kalan ilgili iş grubundaki insanlarda lenfohematopoetik malignitelerin artış gösterdiği (Freeman ve ark. 2009), respiratuvar sistem ve göz için irritan nitelikte olduğu (Drury ve Wallington, 1980) bildirilmiştir. Formaldehit fiksatiflerinin bu tip dezavantajları ve doku üzerindeki olumsuz etkilerine karşılık, formaldehit içermeyen etanol bazlı fiksatiflerin kullanılmasına yönelik girişimler yapılmıştır (Warmington ve ark. 2000; Gillespie, ve ark., 2002). Warmington ve ark. (2000) formaldehite alternatif olarak etanol bazlı bir fiksatif önerirken, Ahmed ve ark. (2010) alternatif olarak, etanol bazlı Carnoy fiksatifinin rutin olarak formaldehit yerine kullanılamayacağını öne sürmüşlerdir.

Rutin formaldehit çözeltisi yerine amaçlarına uygun seçilen farklı fiksatiflerin patolojik tanıya yönelik daha iyi makroskopik (Luz ve ark., 2008) ve mikroskopik (Grizzle, 2001) değerlendirme imkânı sağladığı bildirilmiştir. Bu durum, özellikle kanser olgularının evrelendirilmesinde (staging), prognoz tayinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Kanser olgularında lenf nodu metastazlarının değerlendirilmesi, tümör evrelendirme sisteminin bir parçasıdır. Bununla ilgili olarak, insan hekimliğinde gastrointestinal sistem lenf nodlarının gözden kaçabildiği, dolayısıyla kolon ve rektal kanserlerine yönelik evrelendirme sisteminde zorluk oluşturduğu bildirilmiştir (Resch, 2013). Bir araştırmada, kadavralar üzerinden gastrointestinal sistemde yer alan lenf yumruları Carnoy çözeltisi ile tespit işle-

daha iyi uygunluk gösterdiği rapor edilmiştir (Luz ve ark., 2008).

Doku takip prosedürlerinde diğer önemli bir kriter ise kesit alma sırasında iyi tespit işleme tabi tutulmaması örneklerin parçalanmasıdır (Singhal ve ark., 2016). Doku büyüklüğü, oda sıcaklığı, çözelti pH'sı koşullarından bağımsız olarak, fiksatif türüne göre dokuların çözelti içerisinde tespit olma süreleri farklılık gösterir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Formaldehit çözeltisi için optimum süre 12 - 24 saat olarak belirlenmiştir (Fox, 1985). Başka bir formalin türevi fiksatif olan Hollande çözeltisi için tespit işlem süresinin 4 - 18 saat aralığında olduğu bildirilmiştir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Alkol bazlı fiksatiflerin ise tespit işlem süresi daha kısadır, bunun nedeni alkolün dokulara hızlı bir şekilde nüfus etmesidir (Bancroft ve Gamble, 2008). Bu fiksatiflerin arasında yer alan Carnoy çözeltisi hızlı tespit edebilme özelliği sayesinde, hemen sonuç verilmesi gereken durumlarda tercih edilir (Bancroft ve Gamble, 2008). Bu çözelti ile tespit işlemi için 1 - 4 saatlik bir zaman diliminin yeterli olduğu bildirilmiştir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Buna karşılık, yapılan başka bir çalışmada ise Carnoy fiksatif için en ideal süre 6 saat olarak belirlenmiştir (Singhal ve ark., 2016). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak, bu çalışmadaki tespit işlemi farklı yüzdelerdeki formaldehit ve Hollande çözeltileri için 16 saat, ve Carnoy çözeltisi için ise 4 saat süre zarfında yapıldı. Tespit işlemi sonrasında, doku kesitleri alınırken izlenen doku parçalanma durumu az miktarda da olsa %10`luk formaldehit çözeltisi sırasında oluştu. Diğer tespit çözeltilerinde dokularda herhangi bir parçalanma durumunun gözlenmemesi daha önce bu çözeltiler için bildirilen optimum süreleri doğrular nitelikte bulundu.

Tespit çözeltilerinin hücre morfolojisi üzerine etkileri daha önce hem çözeltiler hem de tespit işlem süreleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir (Benerini Gatta ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda temel prensip tespit çözeltilerinin rutinde kullanılan H&E boyama

yöntemine göre farklı doku ve hücrelerdeki sitoplazma ve çekirdek boyanmalarını, hücrelerin büzüşme ve bozulma durumlarını değerlendirmek yönünde olmuştur (Pereira ve ark., 2015, Singhal ve ark., 2016). Rutin kullanımdaki %3.7'lik formaldehit çözeltisinin, sitoplazma ve çekirdekte büzüşme, hücreler arasında ayrılmalar izlenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Doğan, 2005). Bunun nedenleri arasında formaldehitin stokta bekledikçe pH'nin asidik duruma gelmesi, ve hücre sitoplazma ve çekirdek morfolojinin değerlendirilmesinde artefaktal görümlere yol açabilmesi sayılabilmektedir (Crawford ve Barer, 1951). Ayrıca, aldehit grubu fiksatifler proteinler ile daha zayıf olan metilen ve karbon bağları oluşturmaktadır, bu da yeterli düzeyde bir fiksasyon sağlamadığı için parafin ile yapılan ileri takip aşamalarında sitoplazma ve çekirdek boyanmasında artefaktlara yol açmaktadır (Doğan, 2005). Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlu (%10) formaldehit çözeltisinde benzer artefaktal bulgular izlendi.

Hücre morfolojisinin tanıda önemlilik arz ettiği hematopatoloji ve sitopatoloji dallarında formalin ile protein presipitan özellikleri bir arada içeren karma fiksatiflerin kullanımı önerilmektedir. Bunlar arasında bulunan Hollande çözeltisi tespit işleminde H&E kesitlerinde çekirdek morfolojisinin daha ayrıntılı incelemesine olanak tanır (Doğan, 2005). Benzer şekilde, çekirdek morfolojisinin iyi incelenmesini gerektiren birçok tümör şüpheli olguda; çekirdek büyüklüğü, çekirdek sitoplazma oranı ve çekirdekçiğin büyüklüğü, rengi ve sayısı gibi morfolojik detaylar tanıda oldukça önemlidir (Grizzle, 2009). Hücre çekirdek morfolojisinin iyi gözlemlendiği başka bir diğer fiksatif olarak Carnoy çözeltisi bildirilmektedir (Bancroft ve Gamble, 2008). Çalışmamızda, hücre çekirdek morfolojisinin detayları daha açık renkli boyanma ile en iyi şekilde Carnoy ve Hollande çözeltisinde gözlenmesi literatürler bilgileriyle uyumlu bulundu. Formaldehit çözeltisi çalışma boyunca taze olarak hazırlandığı için, formaldehit çözeltisi ile tespit işleminde izlenen daha yoğun çekirdek boyanmasının olası pH değişikliğinden değil, daha önce de belirtildiği gibi, bu çözeltinin tek başına iyi bir protein presipitan özellikte olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dokulara boya bağlanma prensiplerine göre presipite proteinlerde boya moleküllerinin bağlanacağı yüzeyler azaldığı için, presipitan özelliği yüksek fiksatiflerle daha açık tonlarda boyanma ile gerçekleşmektedir.

Carnoy çözeltisinin dezavantajı olarak bildirilen eritrolizis bulgusu (Baker ve Silvertone, 1976), çalışmamızda da izlenmiştir. Çalışmamızda eritrositlerde optimum tespit için % 3.7'lik formaldehit çözeltisi ile gerçekleştiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda rutin olarak kullanılan % 3.7'lik çözeltisi ile birlikte %10'luk formaldehit, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin dalak ve böbrek dokuları üzerindeki tespit etkileri karşılaştırılmalı olarak

incelendi. Bu bulgular neticesinde, rutin histopatolojik inceleme prosedürlerinde %3.7'lik formaldehit çözeltisinin doku tespit işleminde daha etkili kullanılabileceği belirlendi. Ancak Carnoy ve Hollande çözeltilerinin hücre çekirdeklerindeki histopatolojik değişikliklerin detaylı incelenmesini gerektiren durumlarda, özellikle neoplastik hastalıklarda ve lenfoid sistem patolojisinde, etkili bir kullanım oluşturulacağı ön görüldü. % 10'luk hazırlanan formaldehit çözeltisinin ise dokular da kostik etkiye sebep olduğu ve fiksatif kullanıma uygun olmayacağı tespit edildi.

Teşekkür

Çalışmamıza yapmış olduğu katkılarından dolayı Veteriner Hekim Merve Moral'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Ahmed HG, Mohammed AI, Hussein MOM. A comparison study of histochemical staining of various tissues after Carnoy's and formalin fixation. *Sud J Med Sc* 2010; 5(4): 277-83.
- Baker FJ, Silvertone RE. *Introduction to Medical Laboratory Technology*. Fifth Edition. London: Butterworth & Co Ltd. 1976; p. 312
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Sixth Edition. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier, 2008; p. 53-75.
- Benerini Gatta L, Cadei M, Balzarini P, Castriciano S, Paroni R, Verzeletti A, Cortellini V, De Ferrari F, Grigolato P. Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *Eur J Histochem* 2012; 56(2): e12.
- Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Second Edition. New Jersey: Humana Press, Clifton, 2006; p. 204.
- Crawford NC, Barer R. The action of formaldehyde on living cells as studied by phase-contrast microscopy. *Q J Microsc Sci* 1951; 3(20): 403-452.
- Doğan, Ö. Histopatolojik tanı sürecinde standardizasyon. *APJ* 2005; 2: 8-28.
- Drury RAB, Wallington EA. *Carleton Histological Techniques*. Fifth Edition. London: Oxford University Press, 1980; p. 36-44.
- Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 173-90.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(8): 845-53.

- Freeman LEB, Blair A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Hoover RN, Hauptmann M. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries: The national cancer institute cohort. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101 (10): 751-61.
- Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, Ahrum M, Gathright YB, Merino MJ, Strausberg RL, Epstein JI, Hamilton SR, Gannot G, Baibakova GV, Calvert VS, Flaig MJ, Chuaqui RF, Herring JC, Pfeifer J, Petricoin EF, Linehan WM, Duray PH, Bova GS, Emmert-Buck MR. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol* 2002; 160(2):449-57.
- Grizzle WE. The use of fixatives in diagnostic pathology. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 151-2.
- Grizzle WE. Models of fixation and tissue processing. *Biotech Histochem* 2009; 84(5): 185-93.
- Kahyaoğlu F, Gökçimen A. Light microscopic determination of tissue. *East J Med* 2017; 22(3): 120-4.
- Luz DABP, Ribeiro U Jr, Chassot C, Collet E, De Salles Collet e Silva F, Ceconello I, Corbett CE. Carnoy's solution enhances lymph node detection: An anatomical dissection study in cadavers. *Histopathology* 2008; 53(6): 740-2.
- Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, Cirqueira Cdos S, Tomitao MT, Nahas SC, Ribeiro U Jr, de Mello ES. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology* 2015; 66(3): 388-97.
- Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol* 2013; 19(46): 8515-26.
- Singhal P, Singh NN, Sreedhar G, Banerjee S, Batra M, Garg A. Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture in relation to alteration in fixation protocol - an invitro study. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(8): 28-32.
- Warmington AR, Wilkinson JM, Riley CB. Evaluation of ethanol-based fixatives as a substitute for formalin in diagnostic clinical laboratories. *J Histotechnol* 2000; 23(4): 299-308.



The Comparison of Saturated and Unsaturated Fatty Acid Compositions in Safflower Herbage and Safflower Straw as Alternative Forage for Ruminant

Kanber KARA¹

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Kayseri-TURKEY

Corresponding author: Kanber KARA; E-mail: karakanber@hotmail.com; kanberkara@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-9867-1344

How to cite: Kara K. The comparison of saturated and unsaturated fatty acid compositions in safflower herbage and safflower straw as alternative forage for ruminant. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 248-254.

Summary: In this study, it was aimed to investigate the saturated and unsaturated fatty acid compositions in herbage and straw of safflower (*Carthamus tinctorius* L. Dinçer; thornless) plant as alternative forage for ruminant. Major fatty acids in safflower herbage and safflower straw were determined as linoleic, palmitic, oleic and stearic acids. The proportions of myristic, pentadecanoic, *cis*-10-pentadecenoic, palmitic, palmitoleic, *cis*-10-pentadecenoic, α -linolenic, *cis*-eicosatrienoic, erucic, *cis*-docosahexaenoic, tricosanoic and lignoceric acids in total fat acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw ($P<0.01$). The proportions of margaric, stearic, elaidic, oleic, linoleic, *cis*-11-eicoenoic, arachidonic, *cis*-eicosapentaenoic and nervonic acids in total fatty acids of safflower herbage were lower than those of safflower straw ($P<0.001$). The proportions of saturated fatty acid (SFA), medium-chain fatty acids (MCFA), very-long-chain fatty acids (VLCFA) and w-3, and w-3/w-6 ratio for fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw ($P<0.001$). The proportions of unsaturated fatty acid (UFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), w-6, w-9 and long-chain fatty acids (LCFA) in total fatty acids of safflower straw were higher than those of safflower herbage ($P<0.001$). Palmitic, stearic, oleic and linoleic acids contents as mg/g in dry matter (DM) of safflower herbage were lower than those of safflower straw. As a result, safflower herbage and safflower straw had a rich fatty acid content in mg/g DM. The proportions and amounts of essential fatty acids in safflower straw, which have important biological activity, were higher than safflower herbage. In general, these feedstuffs stand out as rich alternative forages in w-3 and w-6 fatty acids.

Key words: Safflower, forage, fatty acids, omega 3, omega 6

Ruminantlar için Alternatif Kaba Yem Olarak Aspir Yeşil Otu ve Aspir Samanının Doymuş ve Doymamış Yağ Asiti Kompozisyonunun Karşılaştırılması

Özet: Bu çalışmada, ruminantlar için alternatif kaba yem olarak aspir (*Carthamus tinctorius* L. Dinçer; dikensiz) bitkisinin yeşil ot ve samanındaki doymuş ve doymamış yağ asidi bileşenlerinin araştırılmasını amaçlanmıştır. Aspir yeşil otu ve samanındaki en yüksek oranda bulunan yağ asitleri linoleik, palmitik, oleik ve stearik asit olarak belirlendi. Aspir yeşil otunun toplam yağ asitleri içindeki miristik, pentadekanik, *cis*-10-pentadekanik, palmitik, palmitoleik, *cis*-10-pentadekanik, α -linolenik, *cis*-eikosatrienoik, erüsik, *cis*-dokosaheksaenoik, tricosanoik ve lignoserik asitlerin oranları aspir samanındakinden yüksekti ($P<0.01$). Aspir yeşil otunun toplam yağ asitleri içinde margarik, stearik, elaidik, oleik, linoleik, *cis*-11-eikoenonik, araşidonik, *cis*-eikosapentaenoik ve nervonik asitlerin oranları aspir samanınınkinden daha düşüktü ($P<0.001$). Aspir yeşil otunun toplam asitlerinde doymuş yağ asidi (SFA), orta zincirli yağ asitleri (MCFA), çok uzun zincirli yağ asitleri (VLCFA) ve w-3 oranları ile w-3/w-6 oranı aspir samanından daha yüksekti ($P<0.001$). Aspir samanının toplam yağ asitlerindeki doymamış yağ asidi (UFA), tekli doymamış yağ asidi (MUFA), çoklu doymamış yağ asidi (PUFA), w-6, w-9 ve uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) oranları aspir yeşil otununkinden daha yüksekti ($P<0.001$). Aspir otunun kuru maddesinde (KM) mg/g olarak palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit içerikleri, aspir samanından daha düşüktü. Sonuç olarak, aspir yeşil otu ve aspir samanı (mg/g KM) zengin bir yağ asidi içeriğine sahipti. Aspir samanının önemli biyolojik aktiviteye sahip olan esansiyel yağ asitlerin oranı ve miktarı aspir yeşil otundan daha yüksekti. Genel olarak, bu yemler w-3 ve w-6 yağ asitleri bakımından zengin alternatif kaba yemler olarak öne çıkmaktadır.

Anahtar kelimeler: Aspir, kaba yem, omega 3, omega 6, yağ asiti

Introduction

Safflower, which belongs to *Carthamus tinctorius* L species in the Asteraceae family, can be planted in winter or summer, or as a crop rotation plant. This plant is one of the earliest crops used by humans and

can be grown in different climatic conditions and soil types. It is an annual and is stake rooted; and there are thorny and thorn-less species and it is an oil-seed plant which can include 70-80% linoleic acid or 80% oleic acid in oils (Landau et al., 2004; Baumler et al., 2006; Gilbert, 2008). Safflower, which has attracted attention as a food crop resistant to drought, is of extreme importance today due to the effects of global

warming (Altin et al., 2012). Previous researcher identified that the safflower herbage included 8.0-13.8% crude protein (CP), 39-42% neutral detergent fibre (NDF), 4.75-6.67% lignin, 0.4-0.7% tannin, 0.2-0.4% non-protein nitrogen in total nitrogen and 2040 kcal metabolic energy (ME) /kg DM for ruminant (Asgharzadeh et al., 2013; Cagri and Kara 2018) and safflower straw included about 4% CP 50% NDF, 6.6% lignin and 1628 kcal ME/kg DM for ruminant (Cagri and Kara 2018). The previously mentioned nutrient content of safflower herbage shows that it is a mid-quality roughage. Despite its thorny leaves, it can be consumed by sheep and goats. In previous study, it has been shown that the preference of safflower straw by sheep and dairy cattle was very close to that of wheat straw (Landau et al., 2005). The safflower herbage and safflower straw has been used as forage in the diets of cows in Australia and sheep in Italy (Landau et al., 2004 and 2005). Cagri and Kara (2018) stated that safflower herbage and safflower straw at 5%–20% ratio in a horse's diet had a positive effect on the *in vitro* gas production, metabolic energy, short chain fatty acid, and gas yield at 24 h. The use of up to 20% safflower herbage and safflower straw in ration had no negative effect on the digestion parameters of ruminant and horse (Cagri and Kara, 2018). These researchers concluded that using safflower herbage and safflower straw in ration up to 20% has the potential to be good forage sources in the diets of horses and ruminants.

The planting area of safflower in Turkey has reached to 200 000 decares/year from 1000 decares/year for the last 10 years (TUIK, 2020). As a result of the increase in safflower cultivation, the use of safflower by-products, hay and other roughage elements, in the feeding of animals has gained importance. While constructing this study, we were curious whether the fatty acid profile in the ingredients of this alternative oilseed by-product is roughage. The aim of this study was to determine the proportions (as % in total fatty acids) and amounts (as mg/g DM) of 37 different fatty acid of safflower herbage and safflower straw samples.

Material and Methods

The samples of safflower herbage and safflower straw

The safflower (*Carthamus tinctorius* L. Dinçer) samples used in the present study were collected from the province of Kırşehir, Turkey. The Dinçer type safflower is without thorns. Kırşehir Province has arid conditions and desert-like steppe vegetation due to temperature and rainfall (Altin et al., 2012). The safflower herbage samples were chopped 1 cm above the soil, included the aerial parts (leaf, stem, pre-flowering bud) at pre-flowering stage. The safflower straw samples were taken from the mature plant resi-

due after the plant was harvested for the grain. Approximately 500 g of samples of safflower herbage and safflower straw were used for fatty acid analyses.

The determination of fatty acid compositions

The samples of safflower herbage and safflower straw were dried at thermostatically controlled cabinet. The fat extractions of samples were carried out according to soxhlet process (AOAC, 1995). For fatty acid analyses, the fat samples of feedstuffs were methylated with the three-stage modified (Kara, 2020) procedure of Wang et al. (2015). According to this procedure, 40 µL of fat in falcon tubes with 15 mL volumes were mixed with 0.7 ml of KOH (10 M) and 5.3 mL of methanol and was vortexed. The mixture was incubated for 45 min at 55°C in an incubator (Nüve, Turkey) and cooled to 21°C. The mixture was combined with 0.58 mL of H₂SO₄ (10 M) and was vortexed. After this mixture was incubated for 45 min at 55°C, was added 3 mL of n-hexane. The tubes were centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The supernatants (fatty acids in n-hexane) were taken in a 1.5 ml screw neck ND-9 amber vial with 9 mm screw caps (silicone white/PTFE caps) and analyzed in a gas chromatograph (TRACE 1300, Thermo Scientific, USA) with automatic sampling (Thermo AI 1310, Thermo Scientific, USA). FAME mix (37C) standard solution (CL.40.13093.0001) in dichloromethane (Chem-Lab, Zedelgem, Belgium) was used for the identification of peak. The device was studied FAME column (Leigh 60 m, I.D: 0.25 mm, film: 0.25 µm and maximum temperature 250-260°C) and injection split temperature 255°C, colon 140 °C and flow rate 30 ml/min processing method for 42 minutes. Fatty acid identification was performed by comparing the peaks in the chromatogram with the retention times at the standard (Kramer et al., 1997). Saturated fatty acid (SFA), unsaturated fatty acid (UFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), medium-chain fatty acids (MCFA), long-chain fatty acids (LCFA) and very-long-chain fatty acids (VLCFA) were detected.

Statistical analysis

SPSS 17.0 software was used for statistical analysis of the data obtained from the studies. The data were analyzed with the *t*-test. Statistical significance was taken below 0.05 (P<0.05).

Results

The fat content in safflower herbage and safflower straw in the present study were 1.45 and 2.46% in DM, respectively. The proportions of C8:0–C18:0 fatty acids in total fatty acids of safflower herbage and safflower straw had a difference. The proportions of caprylic, capric, undecanoic, lauric, tridecanoic, myristoleic and linoleic acids in total fatty acids of safflower herbage and safflower straw were same

Table 1. The compositions of individual C8:0 – C18:0 fatty acids (as % in total fatty acids) in safflower herbage and safflower straw

Fatty Acids		Safflower herbage	Safflower straw	SEM	SD	P value
Caprylic Acid	C8:0	0.10	0.11	0.002	0.005	P>0.05
Capric Acid	C10:0	0.15	0.13	0.004	0.010	P>0.05
Undecanoic Acid	C11:0	0.06	0.06	0.001	0.001	P>0.05
Lauric Acid	C12:0	0.30	0.22	0.017	0.043	P>0.05
Tridecanoic Acid	C13:0	0.03	0.02	0.002	0.005	P>0.05
Myristic Acid	C14:0	1.68	0.96	0.161	0.394	P<0.001
Myristoleic Acid	C14:1	0.05	0.04	0.002	0.005	P>0.05
Pentadecanoic Acid	C15:0	0.46	0.12	0.076	0.186	P<0.001
<i>cis</i> -10-Pentadecenoic Acid	C15:1	0.02	0.00	0.006	0.015	P<0.001
Palmitic Acid	C16:0	25.95	17.25	1.946	4.768	P<0.001
Palmitoleic Acid	C16:1	1.25	1.09	0.037	0.091	P<0.001
Margaric Acid	C17:0	0.03	0.19	0.037	0.091	P<0.001
<i>cis</i> -10-Heptadecenoic Acid	C17:1	0.39	0.20	0.044	0.107	P<0.001
Stearic Acid	C18:0	5.60	6.93	0.297	0.728	P<0.001
Elaidic Acid	C18:1n9t	0.05	0.08	0.008	0.020	P<0.001
Oleic Acid	C18:1n9c	13.34	20.31	1.560	3.820	P<0.001
Linolelaidic Acid	C18:2n6t	0.28	0.00	0.062	0.153	P>0.05
Linoleic Acid	C18:2n6c	28.11	48.72	4.610	11.292	P<0.001
α -Linolenic Acid	C18:3n3	16.59	0.17	3.673	8.997	P<0.001

SD: Standard Deviation of Means, SEM: Standard Error of Means

(P>0.05). The proportion (1.68%) of myristic acid in total fatty acids of safflower herbage was higher than that (0.96%) of safflower straw (P<0.001). The proportions of pentadecanoic acid, *cis*-10-pentadecenoic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, *cis*-10-pentadecenoic acid, α -linolenic acids in total fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw (P<0.001). The proportions of margaric acid, stearic acid, elaidic acid, oleic acid and linoleic acid in total fatty acids of safflower herbage were lower than those of safflower straw (P<0.001) (Table 1).

The proportions of C20:0 – C24:0 fatty acids (as % in

total fatty acids) in forages in present study has change. The compositions of arachidic acid, *cis*-11,14,17-eicosadienoic acid, heneicosanoic acid and *cis*-13,16-docosadienoic acid in total fatty acids of safflower herbage and safflower straw was not different (P>0.05). The compositions of *cis*-11-eicoenoic acid, arachidonic acid, *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and nervonic acid of safflower straw were higher than those of safflower herbage (P<0.001). The proportions of *cis*-11,14,17-eicosatrienoic acid, erucic acid, *cis*-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoic acid, tricosanoic acid and lignoceric acid in total fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw (P<0.01)

Table 2. The compositions of individual C20:0 – C24:0 fatty acids (as % in total fatty acids) in safflower herbage and safflower straw

Fatty Acids		Safflower herbage	Safflower straw	SEM	SD	P value
Arachidic Acid	C20:0	0.02	0.00	0.004	0.010	P>0.05
<i>cis</i> -11-Eicoenoic Acid	C20:1	0.17	0.27	0.022	0.055	P<0.001
<i>cis</i> -11,14,17-Eicosadienoic Acid	C20:2	0.02	0.07	0.021	0.053	P>0.05
<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic Acid	C20:3n3	0.94	0.13	0.179	0.440	P<0.001
Arachidonic Acid	C20:4n6	0.23	0.26	0.008	0.020	P<0.001
<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid	C20:5n3	0.04	0.80	0.168	0.412	P<0.001
Heneicosanoic Acid	C21:0	0.17	0.23	0.028	0.068	P>0.05
<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic Acid	C22:2	1.23	0.80	0.096	0.235	P>0.05
Erucic Acid	C22:1n9	0.22	0.10	0.029	0.071	P<0.001
<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	C22:6n3	0.09	0.03	0.016	0.039	P<0.01
Tricosanoic Acid	C23:0	0.83	0.08	0.167	0.410	P<0.001
Lignoceric Acid	C24:0	1.43	0.29	0.265	0.650	P<0.01
Nervonic Acid	C24:1	0.06	0.30	0.055	0.135	P<0.001

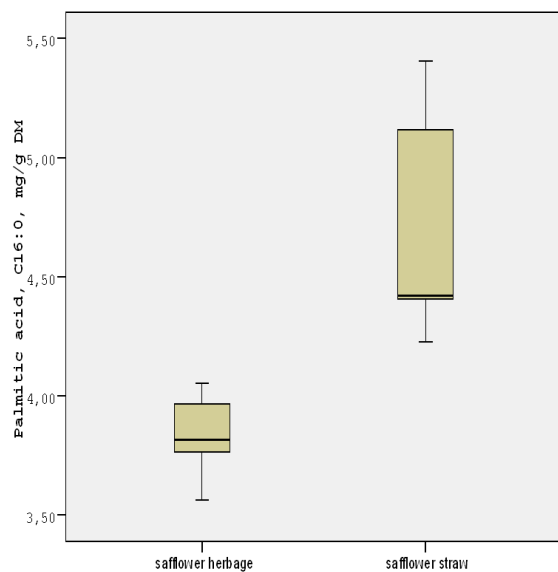
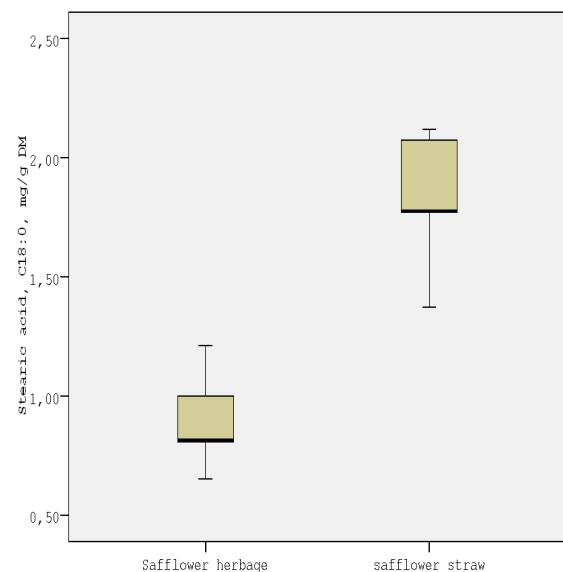
SD: Standard Deviation of Means, SEM: Standard Error of Means

Table 3. Compositions of fatty acids (as % in total fatty acids) of safflower herbage and safflower straw

	Safflower herbage	Safflower straw	SD	SEM	P value
SFA	36.94	26.61	5.65	2.31	P<0.001
UFA	63.12	73.39	5.62	2.29	P<0.001
MUFA	15.57	22.40	3.74	1.52	P<0.001
PUFA	47.55	50.99	0.78	0.05	P<0.001
w-3	17.67	1.13	9.06	3.69	P<0.001
w-6	29.87	49.86	10.94	4.46	P<0.001
w-9	13.83	20.80	3.81	1.55	P<0.001
w-3/w-6	0.59	0.02	0.31	0.12	P<0.001
MCFA	0.66	0.52	0.07	0.03	P<0.001
LCFA	95.26	97.62	1.30	0.53	P<0.001
VLCFA	4.06	1.84	1.23	0.50	P<0.001

SD: Standard Deviation of Means, SEM: Standard Error of Means

LCFA: Long chain fatty acids, MCFA: Medium chain fatty acids, MUFA: Monounsaturated fatty acids, PUFA: Polyunsaturated fatty acids, SFA: Saturated fatty acids, UFA: Unsaturated fatty acids, VLCFA: Very long chain fatty acids

**Figure 1.** Palmitic acid (mg/g DM) content in safflower herbage and safflower straw**Figure 2.** Stearic acid (mg/g DM) content in safflower herbage and safflower straw

(Table 2).

The proportions of SFA, MCFA, VLCFA and w-3, and w-3/w-6 ratio for fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw (P<0.001). The compositions of UFA, MUFA, PUFA, w-6, w-9 and LCFA in total fatty acids of safflower straw were higher than those of safflower herbage (P<0.001) (Table 3).

Palmitic acid contents as mg/g in DM of safflower herbage and safflower straw were 3.76 and 4.42, respectively. Stearic acid contents of safflower herbage and safflower straw were 0.81 and 1.77 mg/g DM, respectively. Palmitic acid contents as mg/g in DM of safflower herbage and safflower straw were 1.93 and 5.20, respectively. Oleic acid contents in DM were 4.07 mg/g safflower herbage and 12.47 mg/g safflower straw (Figures 1-4).

Discussion and Conclusion

The concentration of average total fatty acid in differ-

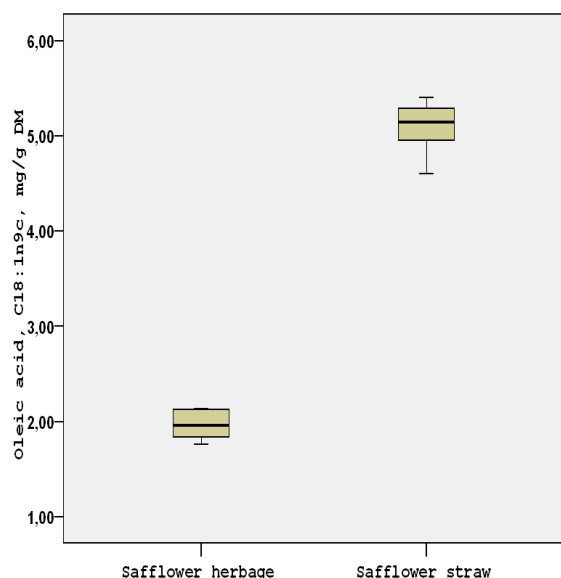


Figure 3. Oleic acid (mg/g DM) content in safflower herbage and safflower straw

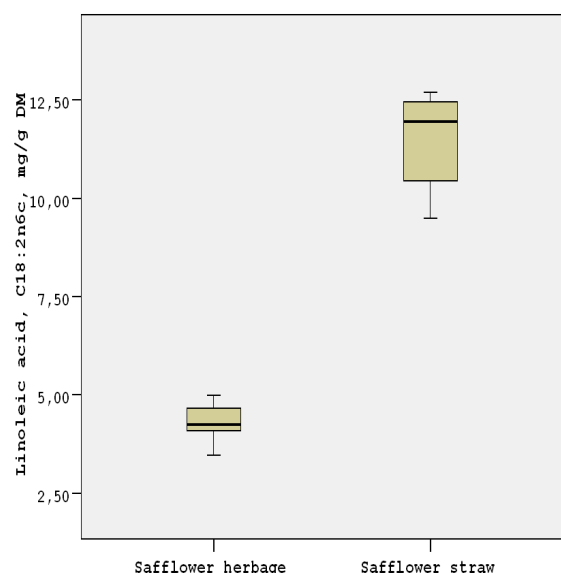


Figure 4. Linoleic acid (mg/g DM) content in safflower herbage and safflower straw

ent forages has been in the range of 2-5% in DM. Forages have often been the major and also the

cheapest and safest source of FAs in ruminant diets. Forages are fibrous feedstuffs that should be present in their rations for healthy rumen physiology and ideal animal product quantity and quality in ruminant feeding (Kalac and Samkova, 2010). The nutrient contents of forages may differ depending on the species of plant (leguminous, cereals or other families), characteristics of the soil on which the plant grows, growth period of plant, feed technology applied to the plant (silage, drying, etc.) and storage time of forage/fresh plant (Dewhurst et al., 2001; Mir et al., 2006; Dierking et al., 2010; Ersahince and Kara 2017; Kara et al., 2018). Especially unsaturated fatty acids are biohydrogenized by bacteria with biological activation in the rumen and their cis/trans configurations are changing. In addition to their biological functions in ruminant organism, these fatty acid metabolisms are the basis of the characteristic fatty acid profile in ruminant meat and milk acetic acid, which is the end product of fermentation, also has an important effect. In this respect, forages, which has both different fatty acids and high structural carbohydrate, also have an effect on animal health and functionality of animal products (Elgersma et al., 2006).

According to results of present study, individual fatty acid composition of safflower herbage and safflower straw, which consist of leaf, stem or bloom/flower, changed by the plant growing stage. The major fatty acids in safflower herbage were listed as follows: linoleic acid, palmitic acid, α -linolenic acid, oleic acid and stearic acid, respectively. These fatty acids of safflower herbage were consisting of about 90% of total fatty acids. The major fatty acids in safflower straw were listed as follows: linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and stearic acid, respectively. These fatty acids of safflower straw were consisting of about 93% of total fatty acids. The saturated fatty acid in highest concentration of safflower herbage (about 26% in total fatty acids) and safflower straw (about 17% in total fatty acids) in the present study was palmitic acid (C16:0). Researchers were determinate that C16:0 proportions in total fatty acids of common forages used in dairy cattle diet ranged from 15 to 30% for alfalfa (fresh, silage or hay), range from 16 to 20% perennial ryegrass, range from 14 to 20% for red clover (fresh, silage or hay), about 16% for white clover and about 16% for corn silage (Vanhatalo et al., 2007; Van Ranst et al., 2009; Dierking et al., 2010; Glasser et al., 2013). The stearic acid (C18:0) proportions of safflower forages in the current study ranged from 5.6 to 6.9. However, previous researchers demonstrated that C18:0 concentrations of legume forages and grasses used in dairy cattle ration were about 2-5% in total fatty acids (Vanhatalo et al., 2007; Van Ranst et al., 2009; Dierking et al., 2010; Glasser et al., 2013). However, increasing the stearic acid level with growth of safflower in this study is compatible with the results of other reseachers for

orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Mir et al., 2006). The palmitic acid contents of safflower forages as mg/g DM in present study were similar to results stated by Dierking et al. (2010) for tall fescue, tall fescue + alfalfa and tall fescue + red clover. The stearic acid contents of safflower forages as mg/g DM in the current study were similar to results of other forages (Dierking et al., 2010). In the present study, it has been observed that the proportions of palmitic acid and SFA in total fatty acids of safflower herbage, which was harvested at the beginning of flowering, decreased with plant growth. The palmitic acid amount in mg/g DM of safflower herbage was lower than that of safflower straw. In addition, proportion of palmitic acid in total fatty acids of safflower herbage was lower than that of safflower straw. These interesting results can be related with increasing crude fat content (1.45 vs. 2.46% in DM) in straw making stage (or seed bulking stage) of safflower plant according to herbage, which harvested at early flowering stage.

The oleic acid (C18:1n9c), which was the highest MUFA in the present study, proportions in total fatty acids of safflower herbage and straw were about 13 and 20%. The oleic acid and MUFA proportions in total fatty acid of safflower straw were higher than those of safflower herbage can be in relation with the lower part of flower and the upper part of flower in achene of safflower plant in seed bulking stage. In accordance with the results of the study, Mir et al. (2006) stated that oleic acid proportions in total fatty acids of orchard grass, perennial ryegrass and tall fescue increased with plant growing stage. The oleic acid contents as mg/g DM of safflower forages in the present study were higher than the results specified by Khan et al. (2015) for some forages (*Trifolium alexandrinum*, *Cichorium intybus*, *Medicago sativa* and *Avena sativa*) at different stages.

The PUFA, MUFA, LCFA, w-3 and w-6 proportions in fatty acids of safflower straw were higher than those of safflower herbage may be related with the lower part of flower and the upper part of flower in achene of safflower plant in seed bulking stage. However, w-3 and α -linolenic acid (C18:3 n3) proportions in total fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw can be relation to the results of Mir et al. (2006), which designated C18:3 concentrations of some pasture plants decreased with plant maturing. Vanhatalo et al. (2007) and Boufaied et al. (2003) identified that C18:3 n3 and PUFA concentrations in green herbage harvested at early stage were higher than those of it harvested late. The concentrations of >C22:0 fatty acids of safflower herbage were higher than those of safflower straw may be related with plant amount and phenological stage of plant. As the plant vegetation period progresses, the cell wall structural carbohydrate substances increase,

and there is a decrease in the easily soluble carbohydrate, fat and protein levels in the endosperm (Kara et al., 2018). In the present study, it is seen that there is a significant change in the essential fatty acid components depending on the plant development period (safflower herbage and safflower straw). The differences in fatty acid profile of safflower forages according to the plant development period may be an important factor in plant type (Mir et al., 2006; Vanhatalo et al., 2007; Boufaied et al., 2003).

The high MUFA, w-9 and LCFA concentrations in safflower herbage and straw in the present study indicate a rich forage in terms of MUFA (oleic acid) and w-9 fatty acids, which have a positive effect on fertility and embryo implantation in uterus of ruminant (Aardema et al., 2011). Aardema et al. (2011) investigated the effect of three fatty acids (saturated palmitic and stearic acid and unsaturated oleic acid) on lipid storage and development of oocytes in vitro and showed that palmitic and stearic acids had inhibitory effects on oocyte development, but oleic acid eliminated this adverse effect and showed positive effect. The low levels (mg/g DM) of palmitic and stearic acids in safflower herbage can reveal its advantage for dairy cattle fertility compared to safflower straw.

Although the crude protein and metabolic energy values of safflower straw were lower than those of safflower herbage, it has been reported that *in vitro* digestibility in beef cattle and horse diet of safflower straw was similar to those of safflower herbage by Cagri and Kara (2018). As a result of study, it is understood that the safflower herbage and safflower straw has a rich fatty acid content. The essential fatty acids, which have important biological activity, in the safflower straw, are high for unit dry matter consumed (as mg/g in DM) shows the advantage of other straws. At the same time, the richness of safflower straw in terms of w-9 fatty acids (% as in total fatty acids) indicates that it can be utilizable as forage for diet of infertility dairy cattle. In general, these forages stand out as rich alternative fibrous sources in w-3 and w-6 fatty acids.

References

- Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BAJ, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB, Gadella BM. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2011; 85: 62-9.
- Altin TB, Barak B, Altin BN. Change in precipitation and temperature amounts over three decades in central Anatolia, Turkey. *Atmosph Clim Sci* 2012; 2: 107-25
- Asgharzadeh F, Nasri MHF, Behdani MA. Effects of nitrogen and phosphorus fertilizers on nutritive value of safflower forage and silage. *J Anim Poult*

- Sci 2013; 3: 66-75.
- Baumler E, Cuniberti A, Nolascoa SM, Riccobene IC. Moisture dependent physical and compression properties of safflower seed. *J Food Eng* 2006; 72: 134-40
- Boufaied H, Chouinard PY, Tremblay GF. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Can J Anim Sci* 2003; 83: 501-11.
- Cagri A, Kara K. The effect of safflower on the *in vitro* digestion parameters and methane production in horse and ruminant. *Acta Vet Eurasia* 2018; 44: 73-84.
- Dewhurst RJ, Scollan ND, Youell SJ. Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass Forage Sci* 2001; 56: 68-74.
- Dierking RM, Kallenbach RL, Roberts CA. Fatty acid profiles of orchardgrass, tall fescue, perennial ryegrass, and alfalfa. *Crop Sci* 2010; 50: 391-402.
- Elgersma A, Dijkstra J, Tamminga S. *Fresh Herbage for Dairy Cattle*. the Netherlands: Springer 2006; pp: 175-94.
- Ersahince AC, Kara K. Nutrient composition and *in vitro* digestion parameters of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) herbage at different maturity stages in horse and ruminant. *J Anim Feed Sci* 2017; 26: 213-25.
- Gilbert J. International safflower production-an overview. 7th International Safflower Conference. November, 3rd-6th, 2008; Wagga Wagga, NSW- Australia.
- Glasser F, Doreau M, Maxin G. Fat and fatty acid content and composition of forages: A meta-analysis. *Anim Feed Sci Tech* 2013; 185: 19-34.
- Kalac P, Samkova E. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J Anim Sci* 2010; 55: 521-37.
- Kara K, Ozkaya S, Baytok E, Guclu BK, Aktug E, Erbas S. Effect of phenological stage on nutrient composition, *in vitro* fermentation and gas production kinetics of *Plantago lanceolata* herbage. *Vet Med (Czech)* 2018; 63: 251-60.
- Kara K. The investigation of milk urea nitrogen and milk fatty acids compositions in dairy cattle with subacute ruminal acidosis. *Vet Med (Czech)* 2020; 65: 1-8.
- Khan NA, Farooq MW, Ali M, Suleman M, Ahmad N, Sulaiman SM, Cone JW, Hendriks WH. Effect of species and harvest maturity on the fatty acids profile of tropical forages. *J Anim Plant Sci* 2015; 25(3); 739-46
- Kramer JK, Feller V, Dugan ME, Sauer FD, Mossoba MM, Yurawecz MP. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* 1997; 32: 1219-28.
- Landau S, Friedman S, Brenner S, Bruckental I, GWeinberg Z, Ashbell G, Hen Y, Dvash L, Leshem Y. The value of safflower (*Carthamus tinctorius*) hay and silage grown under Mediterranean conditions as forage for dairy cattle. *Livest Prod Sci* 2004; 88: 263-71.
- Landau S, Friedman S, Brenner S, Bruckental I, Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Dvash L, Leshem Y. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) as a novel pasture species for dairy sheep in the Mediterranean conditions of Sardinia and Israel. *Small Rum Res* 2005; 59: 239-49.
- Mir PS, Bittman S, Hunt D. Lipid content and fatty acid composition of grasses sampled on different dates through the early part of the growing season. *Can J Anim Sci* 2006; 86: 279-90.
- Official Methods of Analysis (AOAC) Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Arlington, VA. 1995.
- Turkey Statistical Institution (TUIK). Plant Production Statistics. Access address: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 Access date: 25.06.2020
- Van Ranst G, Fievez V, Vandewalle M. Influence of herbage species, cultivar and cutting date on fatty acid composition of herbage and lipid metabolism during ensiling. *Grass Forage Sci* 2009; 64: 196-207.
- Vanhatalo A, Kuoppala K, Toivonen V. Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *Eur J Lipid Sci Tech* 2007; 108: 856-67.
- Wang J, Wu W, Wang X, Wang M, Wu F. An affective GC method for the determination of the fatty acid composition in silkworm pupae oil using a two-step methylation process. *J Serb Chem Soc* 2015; 80: 9-20.



İklim mi Hayvancılık mı Yoksa Hayvancılık mı İklimi Etkiliyor?

Savaş SARIÖZKAN¹, Mehmet KÜÇÜKOFLAZ²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği ABD, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Savaş SARIÖZKAN; E-mail: ssariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2491-5152

Atıf yapmak için: Sariözkan S, Küçükoflaz M. İklim mi hayvancılığı yoksa hayvancılık mı iklimi etkiliyor? Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 255-259.

Özet: Bu çalışmanın amacı, iklim değişikliklerinin hayvancılık sektörüne ve hayvancılığın da iklim değişiklikleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmanın materyalini Türkiye’de 2018 yılı itibarıyla sığır, manda, koyun, keçi ve kanatlılardan (broiler, yumurta tavuğu ve hindi) elde edilen hayvansal üretim miktarlarına ait (kırmızı et, süt, kanatlı eti ve yumurta) resmi veriler oluşturmuştur. Çalışmada çeşitli hayvansal üretim faaliyetleri sonucunda atmosfere salınan sera gazı miktarları karbondioksit eşdeğeri (CO_{2e}) şeklinde hesaplanmıştır. Araştırma bulgularına göre, Türkiye’de hayvancılık kaynaklı 47,8 milyon ton CO_{2e} sera gazı salınımının olduğu belirlenmiştir. Bu değer, Türkiye’deki toplam sera gazı salınımının %9’unu oluşturmaktadır. Sonuç olarak; hayvancılığın yeryüzünde değişen iklimlerden en fazla etkilenecek sektörlerin başında geldiği, Türkiye gibi kırsal ekonomik yapısı ağır basan bir ülkede de hayvancılığın ve bu işle uğraşan üretici kesimin olumsuz etkileneceği aşikârdır. Bir taraftan bu olumsuzluğun giderilmeye çalışılması, diğer taraftan hayvancılık kaynaklı sera gazı salınımının azaltılması yönünde politika tedbirlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Hayvancılık, iklim değişikliği, metan gazı, sera etkisi

Does Climate Effecting the Livestock or Livestock Effecting the Climate?

Summary: The aim of this study was to investigate the effects of climate changes on livestock sector and livestock on climate changes. The material of study was official data of animal production quantities (red meat, milk, poultry meat and eggs) obtained from cattle, buffalo, sheep, goats and poultry (broilers, laying hens and turkeys) for the year 2018. In the study, the amount of greenhouse gas emitted into the atmosphere as a result of various animal production activities has been calculated as carbon dioxide equivalent (CO_{2e}). According to the results, 47.8 million tons CO_{2e} of animal origin greenhouse gas emissions was determined in Turkey. This value constitutes 9% of the total greenhouse gas emissions in Turkey. In conclusion, livestock is one of the sectors that will be most affected by the changing climates on earth, it is obvious that livestock and the producers who are engaged in this field will be adversely affected in a country like Turkey which is rural structure outweighs. On one hand, it is necessary to eliminate this negativity and on the other hand, develop policy measures to reduce greenhouse gas emissions sourced livestock.

Key words: Livestock, climate change, metan gas, greenhouse effect

Giriş

Dünya’da hava sıcaklıklarının, fırtına, sel, kuraklık, çölleşme gibi afetlerin artışı, başta karbondioksit (CO₂) olmak üzere sera gazları salınım oranlarının yükselmesi ve buzulların erimesi gibi olaylar artık herkesin kabulleneceği netlikte küresel iklim değişikliği sorununu ortaya çıkarmıştır. Özellikle 18. ve 19. yüzyıldan sonra sanayi devrimi ile artış eğilimine giren bu sorunla uluslararası boyutta mücadele için ülkeler ilk olarak 1997 yılında Japonya-Kyoto’da görüşmüş ve hazırlanan Kyoto Protokolü 2005 yılında resmen yürürlüğe girmiştir. Bu protokolü imzalayan yaklaşık 160 ülke, iklim ve çevre sorununa neden olan altı sera gazının (karbon dioksit-CO₂, metan-CH₄, nitroz oksit-N₂O, kükürt heksaflorür-SF₆, hidrölorokarbon-HFC ve perflorokarbonlar-PFC) salınımını azaltmayı kabul etmişlerdir. Protokole göre ülkeler, atmosfere saldıkları karbon miktarını %5.2 oranında

azaltarak 1990 yılındaki düzeylere düşürmeyi kabul etmişlerdir (Özmen, 2009). Ancak aradan geçen 30 yıla rağmen bunun tamamen sağlandığını söylemek mümkün değildir.

İklim değişiklikleri; kuraklık, çölleşme, yağışların hızı ve şiddetindeki dengesizlik ve sapmalar, su baskınları, tayfun, fırtına, hortum, kasırga vb. meteorolojik olaylardaki artışlarla kendini gösterir. İklim değişikliği son yıllarda daha çok karşımıza; atmosfere salınan gazların sera etkisi yaratması sonucunda, Dünya yüzeyinde (kara, deniz ve havada) ortalama sıcaklığın artması olarak tanımlanan Küresel Isınma şeklinde çıkmaktadır (Bozoğlu ve ark., 2003; Köknaröğlu ve Akunal, 2010).

Normal şartlarda güneş ışınları, çeşitli gazlardan (azot, oksijen, karbondioksit gibi) oluşan atmosferi geçip yeryüzünü ısıtmaktadır. Bu gazlar sayesinde atmosfer, tarımda kullanılan cam seralar gibi ısıyı tutup (en çok ısı tutan gaz CO₂’dir) ışığı geçirmekte-

dir. İşte atmosferin bu özelliğine (ısıtma-yalıtma) Sera Etkisi denilmektedir (Özmen, 2009).

Yeryüzünde sera gazlarının miktar ve yoğunluğunu artırarak küresel ısınmaya neden olan başlıca faktörler; artan enerji-yakıt tüketimi (%49), tüketim alışkanlıklarının değişmesi ve endüstrileşme (%24), ormanların azalması (%14) ve kırsal üretim (%13) şeklinde sıralanabilir (Özmen, 2009). Artan sera gazlarının sebep olduğu iklim değişikliği; turizm, sağlık, inşaat, dış ticaret, lojistik, sigortacılık gibi sektörleri etkilediği gibi, ülkelerin milli gelirlerinde önemli paya sahip olan tarım-ormancılık ile hayvancılık sektörlerini de etkileyerek ekonomilerine olumsuz yansımaları olmaktadır (Bayraç ve Doğan, 2016).

Mevcut çalışmada Türkiye örneği üzerinden iklim değişikliklerinin hayvancılık sektörüne ve hayvancılığın da iklim değişiklikleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini Türkiye’de sığır, manda, koyun, keçi ve kanatlılardan (broiler, yumurta tavuğu ve hindi) elde edilen hayvansal üretime ait (kırmızı et, süt, kanatlı eti ve yumurta) resmi veriler oluşturmuştur (TÜİK, 2019). Hayvancılık kaynaklı en önemli sera gazları, enterik fermantasyon ve depolanan gübre (dışkı) nedeniyle oluşan metan gazı (CH₄) ile yine gübre kaynaklı nitroz oksit gazıdır (N₂O). Çalışmada çeşitli hayvansal üretim faaliyetleri sonucunda atmosfere salınan metan ve nitroz oksit gibi sera gazı miktarlarının belirlendiği literatür değerleri dikkate alınmış (Model, 2017) ve karbondioksit eşdeğeri (CO_{2e}) şeklinde hesaplanarak verilmiştir. Sera gazı salınım miktarları, genel kabul gören şekliyle “Karbon Ayak İzi” olarak hesaplanmakta, ortak bir değer olması ve karşılaştırmaları kolaylaştırmak bakımından karbondioksit eşdeğerine (CO_{2e}) dönüştürülmektedir. Dolayısıyla CO_{2e} değeri, küresel ısınmanın boyutunu ortaya koymada temel alınan başlıca standart birim olarak kabul edilmektedir (Kılıç ve Amet, 2017; Wiedmann ve Minx, 2008).

Bulgular

Tablo 1. Türkiye’de hayvansal üretim yoluyla oluşan sera gazı miktarları

Hayvansal Ürünler	Üretim miktarı, ton	1 kg üretim için salınan sera gazı miktarı, CO _{2e} ton	Toplam salınım miktarı, CO _{2e} ton
Süt	22120716	0.95	21014680
Kırmızı et	1118695	13.2	14766774
Kanatlı eti	2226205	3.5	7791718
Yumurta*	1227732	3.5	4297062
TOPLAM			47870234

*16 adet yumurta 1 kg alındı.

Yapılan çalışmada Türkiye’de gerçekleştirilen hayvansal üretim faaliyeti süt, kırmızı et, kanatlı eti ve

yumurta şeklinde kategorize edilerek salınan toplam sera gazı miktarları CO_{2e} cinsinden Tablo 1’de verilmiştir.

Mevcut çalışmada Türkiye’de hayvansal üretim rakamlarına göre, toplam 47.870.234 ton CO_{2e} sera gazı salınımının olduğu hesaplanmıştır. Bunun da % 43.9’u süt, %30.8’i kırmızı et, %16.3’ü kanatlı eti ve geri kalan %9’u yumurta üretiminden kaynaklanmaktadır. Sektör olarak düşünüldüğünde sera gazı salınımında ruminantların payının daha fazla (3/4 oranında), kanatlıların ise daha az olduğu (1/4 oranında) görülmektedir (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Sera gazı salınımı ile yeryüzünde iklimler değişmekte ve sıra dışı hava olaylarının sayısı ile sıklığı da artmaktadır. Hayvansal üretim, sera gazı salınımını artıran bir faktör olmakta ve artan sera gazları da yeryüzünde iklim değişikliğine yol açmaktadır. Değişen iklimler (bölgesel/yerel aşırı sıcaklık, ani yağışlar) ise direk (hastalıklar, verim düşüklüğü ve ölüm gibi) veya dolaylı (yem üretiminin azalması gibi) yollardan hayvansal üretimi olumsuz yönde etkilemektedir. Yani iklim değişikliği ve hayvancılık arasında çift yönlü bir etkileşimden söz etmek mümkündür. Hayvancılık sektörü, hayvan kaynaklı sera gazları nedeniyle iklim değişikliğini etkileyen ve bu değişen iklimden de olumsuz anlamda etkilenen bir yapı sergilemektedir (Dellal, 2008; Görgülü ve ark., 2009).

Türkiye’de hayvancılık sektörü, gerek kırsal ekonomik yapının ağır basması gerekse gelişen hayvancılığa dayalı sanayinin olması nedeniyle küresel iklim değişikliğinden en fazla etkilenen sektörlerin başında gelmektedir. Tarım sektörü özellikle bitkisel üretim anlamında direk iklimden etkilenen bir yapıya sahipken, hayvancılık ise yem bitkileri üretimi boyutuyla tarım ile intersektörel etkileşim içerisinde olduğundan dolaylı olarak etkilenmiş olmaktadır. Hayvancılıkta sektörel anlamda bu endirekt etkinin dışında, sıcaklıkların konfor (sığırlarda 13-18°C ve %60-70 nem, kanatlılarda 25-30°C, %60-70 nem) ortamın üzerine çıkmasıyla hayvanlarda stres, verim düşüklüğü, hastalık ve mortalitenin artması, fertilitenin ve refahın azalması

gibi üretimi miktar ve kalite anlamında olumsuz yönde

etkileyen direk sonuçlar doğurmaktadır.

Dünyada artan nüfus nedeniyle hayvansal ürün talebinin de artacak olması, gelecekte daha yaşanabilir Dünya için hayvancılıkta birim başına verimliliğinin artmasını ve sera gazı salınım oranının azalmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çevre standardını yakalayabilmek için halihazırda tek bir prosedür olmamakla birlikte, hayvanların bakım-beslemesinden gübrenin depolanmasına kadar kullanılan yöntemleri gözden geçirerek sera gazı salınım oranlarını azaltan üretime yönelmek ve belirlenen etkin stratejileri uygulamak gerekmektedir.

Türkiye gibi gelişmekte olan ülke ekonomilerinin önemli oranda tarım ve hayvancılık gibi kırsal üretime dayanması, iklim değişikliğinin etkilerinin daha fazla hissedilmesine neden olmaktadır. Hayvancılıkta her ne kadar mekanizasyon, verimlilik ve sağlık gibi konularda belirli iyileşmeler sağlansa da, iklimin düzensizliği ve oturmamış piyasa yapısı sürdürülebilir üretime engel olmakta, karlılığı düşürmekte ve kırsal göçlere yol açmaktadır. Bunun sonucunda da artan üretim maliyetleri nedeniyle hayvancılıkta arzın güvence altına alınması giderek zorlaşmakta ve ürün fiyatları yükselmekte, buna karşılık artan talebi karşılamak için sık sık canlı hayvan ve et ithalatı gündeme gelmektedir.

Ülkemizin, iklim değişikliğinden en fazla etkilenmesi beklenen Akdeniz Havzası'nda bulunması ve kırsal ekonomik yapıda aldığı pay itibarıyla, iklim değişikliğinin hayvancılık sektörü açısından ayrı bir önemi vardır (Başoğlu ve Telatar, 2013). İklim değişikliğinin ekonomik, ekolojik ve sosyolojik etkilerinin kaçınılmaz olduğu ve gelecekte çevre sorunlarının giderek daha fazla ön plana çıkacağı bildirilmektedir (Demir ve Cevger, 2007).

Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli (İPCC) projeksiyonlarına göre, iklim değişikliğinin Türkiye'de beklenen en önemli etkileri; yağışların mevsimsel dağılımında ve şiddetinde değişiklik, ani seller, yaz yağışlarında azalma ve kuraklık artışı şeklinde özetlenebilir. Bu etkilerin Akdeniz Bölgesi ve çevresinde daha şiddetli hissedilebileceği vurgulanmaktadır (Özmen, 2009). Bu nedenlerle Türkiye'de de çoğu ülkelerde alınan tedbirlere benzer olarak sera gazı salınımını azaltma yönünde hedefler belirlenerek uygulamaya konulması gerekmektedir. Yapılan incelemelerde doğaya en fazla olumsuz etkinin enerjiden kaynaklanması, yapılacak işlerin başında bireysel veya insanlık olarak enerji tasarrufunun geldiğini ortaya çıkarmaktadır (Bayraç ve Doğan, 2016). Aksi halde küresel ısınmaya karşı yol haritasının belirlenmesi ve alınacak tedbirlerin ötelenmesi bir kazanç yerine uzun vadede tüm ülkelere ve insanlığa daha fazla finansal yük getirecektir.

Türkiye'de Görgülü ve ark. (2009) tarafından 2001 yılı için yapılan hesaplamada ruminant kaynaklı (sığır,

koyun ve keçi) metan emisyon miktarı 1.024.252 ton olarak bildirilmiştir. Bu değer CO_{2e} olarak 28.7 milyon tona tekabül etmektedir. Mevcut araştırmada 2018 yılı verilerine göre ruminant kaynaklı et ve süt üretimine bağlı CO_{2e} sera gazı salınımı 35.6 milyon ton olarak hesaplanmıştır. Her iki araştırma arasında geçen 17 yıllık sürede Türkiye'nin ruminant kaynaklı sera gazı salınımı %24 oranında artmış olup (yıllık %1.4), yıllık ruminant kaynaklı ortalama 405 bin ton CO_{2e} sera gazı artışının olduğu ortaya çıkmıştır. Resmi rakamlara göre, Türkiye'de toplam sera gazı salınımı 526.3 milyon ton CO_{2e} olup, kişi başına düşen miktarı 6.6 ton civarındadır. Toplam sera gazı salınımının % 11.9'unun (62.6 milyon ton) tarım-hayvancılık kaynaklı olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2018). Mevcut çalışmada yapılan hesaplamalara göre (47.8 milyon ton CO_{2e}) bunun da yaklaşık %75'inin (3/4'ü) hayvansal üretimden geri kalan %25'inin (1/4'ü) bitkisel üretimden kaynaklandığını söylemek mümkündür. Yaklaşık 10 yıl öncesinde Türkiye'de toplam sera gazı salınımının %7'sinden sorumlu olan tarım-hayvancılığın payının giderek arttığını söylemek yanlış olmayacaktır (Özkan, 2013).

Başta insan olmak üzere, canlılar iklimi iklim de başta insan olmak üzere tüm canlıları etkilemektedir. Küresel iklim değişikliğinin yeryüzünde etkileri artan şekilde görülmeye başlanmıştır. Bunlar, son yıllarda yağmur miktarının artması ve kısa süreli sağanaklara dönüşmesi, şiddetli fırtına ve sellerin oluşması, buzulların erimesi ve su seviyesinin yükselmesi ile orman yangınlarının artması şeklinde kendini göstermektedir. Bu değişimin orta ve uzun vadede hayvancılık sektörüne de üretim ve verimliliği azaltacak şekilde yansıtacağı, hatta belirli bölgelerde eradike edilen hastalıkların tekrar görülebileceği, enfeksiyon etkenlerinin daha hızlı yayılma gösterebileceği tahmin edilmektedir. İlaveten, değişen sıcaklıklar hayvanların üreme dönemleri ve göç mevsimlerinin de kaymasına yol açacaktır. Bu durumun hayvanların hastalıklara karşı direncinde ve yaşama gücünde azalmalara yol açacağı ön görülmektedir. Bitkisel üretimin de olumsuz etkilenmesiyle birlikte çayır-meralarda, yem bitkisi ekim alanlarında ve üretiminde azalma, gelecekte hayvancılık sektörünün daha fazla yem sorunu yaşamasına yol açacaktır. Değişen iklim ile birlikte artan sıra dışı hava olayları (aşırı sıcak ve soğuklar, yağışlar, sel, kasırga vb.) hayvanların bakım, besleme ve yetiştirme şartlarını da etkilemektedir. Barınak yapımından tüketilen yem miktarına, dölvüriminden canlı ağırlık kazancına kadar birçok değişiklikler gözlenmektedir. Örneğin ilk akla gelen aşırı sıcak/soğuklar, barınak yapımında izolasyonu ön plana çıkarmakta bu da sabit masrafları artırmaktadır. Optimum şartlardan uzaklaştıkça hayvanların yemden yararlanma oranlarında düşme, besi süresinde uzama, fertilitite oranlarında azalma, ilk buzağılama yaşı ve buzağılama aralığında uzama, gebelik başına tohumlama sayısında artış, salgın hastalıklarda artış, erken embriyonik ölümler ve buzağı mortalite oranında artış gibi

üretim ve verimliliği doğrudan etkileyen ve işletme karlılığını azaltan sonuçlar doğurmaktadır (Demir ve Cevger, 2007; Lacetera ve ark., 2003; Koluman, 2009; Nardone ve ark., 2010; Petrovica ve ark., 2015).

Diğer taraftan iklim değişikliğine bağlı olarak; deniz seviyesinin yükselmesi, artan yağışlar, toprak tuzluluğu, zirai don ve kuraklık neticesinde çayır-mera ve yem bitkisi ekim alanlarının ve verimlerinin azalması, hayvansal üretimde maliyetlerin artmasına yol açacaktır. Bu iklim koşulları ve üretim yapısının devam etmesiyle meydana gelecek yukarıda sayılan muhtemel olumsuzluklar aslında gıda üretimini ve dolayısıyla da insanları etkileyecektir. Entansif üretim şekli insanlarda sağlıksız ve dengesiz beslenme problemlerine öncülük ederken, sağlık harcamalarını da artıracaktır. Bu nedenle, doğal ve organik ürünlere olan talebin tüketicilerin bütçelerine göre artış göstereceği düşünülmektedir.

İnsanoğlunun yeryüzünde gerçekleştirdiği tüm faaliyetlerin olumsuz yansımaları yine başta insan olmak üzere diğer canlıları, doğayı ve iklimi etkilemekte, bunun sonucunda da toprak, su ve havanın içeriği ve kalitesi de giderek bozulmaktadır.

Nüfus artışı, turizm ve şehirleşmenin artması ile gelir düzeyindeki iyileşmeler hayvansal ürünlere olan talebi artırmaktadır. Artan talebe bağlı olarak giderek entansifleşen hayvancılık sektörü sera gazı salınımlarında da önemli bir rol oynamaktadır (Gerber ve ark., 2013; Model, 2017; Grossi ve ark., 2019).

Hayvancılık kaynaklı sera gazı üretiminde asıl sorun metan gazı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Enterik yolla fazla metan gazı salınımı da, rumende besin maddelerinin fermentasyonunun etkin olmamasından ve sindirim sistemi mikrobiyal florasının besin madde gereksiniminin yeterli/dengeli şekilde karşılanamamasından kaynaklanmaktadır. O halde bu sorunun hayvancılık kaynaklı kısmının çözümü aşamasında iki önemli seçenek karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan birisi enterik fermentasyon yoluyla salınan metan gazı miktarının azaltılması ve diğeri de bunu yapamıyorsak, hayvansal ürün tüketiminin azaltılmasıdır ki, ülkemizde zaten hayvansal ürün tüketimi konusunda eksikliklerin olduğu düşünüldüğünde birinci seçeneğin üzerinde yoğunlaşmanın ve çözümü orada aramanın kalıcı olması açısından daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; yeryüzünün dengesinin bozulması, insan eliyle olduğundan yine bunun geri dönüşü de nihayetinde insanlara olmaktadır. Yeryüzüne zarar veren tüm girişimlerin azaltılması ülkelerin ve her bir insanın görevidir. Başkasından beklemek yerine kendimizden başlamak üzere alınması gereken önlemler konusunda bilinçlenerek ve bilinçlendirerek bu sürece katkı verilmesi, gelecek nesillere daha yaşanabilir

Dünya bırakılması açısından zorunlu görülmektedir. Hayvancılığın yeryüzünde değişen iklimlerden en fazla etkilenecek sektörlerin başında geldiği, Türkiye gibi kırsal ekonomik yapısı ağır basan bir ülkede de hayvancılığın ve bu işle uğraşan üretici kesimin olumsuz etkileneceği aşikârdır. Bir taraftan bu olumsuzluğun giderilmeye çalışılması, diğer taraftan hayvancılık kaynaklı sera gazı salınımının azaltılması yönünde politika tedbirlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Baçoğlu A, Telatar OM. İklim değişikliğinin etkileri: Tarım sektörü üzerine ekonometrik bir uygulama. KTÜSBE Derg 2013; 6: 8-16.
- Bayraç HN, Doğan E. Türkiye’de iklim değişikliğinin tarım sektörü üzerine etkileri. OGUİBF Derg 2016; 11(1): 23-48.
- Bozoğlu B, Keskin B, Cavdar S. Küresel ısınma. 6. çevre sorunlarına öğrenci yaklaşımları sempozyumu, Mersin. <http://www.cevre.metu.edu.tr>; Erişim tarihi: 12.01.2020
- Dellal İ. Küresel iklim değişikliği ve enerji kıskacında tarım ve gıda sektörü. İGEME’den Bakış 2008; 35: 103-11.
- Demir P, Cevger Y. Küresel ısınma ve hayvancılık sektörü. Vet Hek Dern Derg 2007; 78(1): 13-6.
- Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Tempio G. Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2013; p. 115.
- Görgülü M, Koluman Darcan N, Göncü Karakök S. Animal husbandry and global warming. Beşinci Ulusal Hayvan Besleme Kongresi. 30 Eylül- 3 Ekim 2009; Çorlu-Türkiye.
- Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams AG. Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. Anim Front 2019; 9(1): 69-76.
- Kılıç İ, Amet B. Bir süt sığırlı işletmesinin karbon ayak izinin tahminlenmesi: Bursa örneği. JAFAG 2017; 34: 134-42.
- Koluman N. Küresel ısınma, iklim değişikliği ve hayvansal üretim, Altıncı Zootekni Bilim Kongresi. 23-25 Haziran 2009; Erzurum-Türkiye.
- Köknaroğlu H, Akünal T. Küresel ısınmada hayvancılığın payı ve zooteknist olarak bizim rolümüz. SDÜ Zir Fak Derg 2010; 5 (1): 67-75.
- Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A.

Physiological and productive consequences of heat stress. The case of dairy ruminants. In Proceedings of the Symposium on interaction between climate and animal production: EAAP Technical Series 2003; 7: 45-60.

Model EA. The global livestock environmental assessment model. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2017; p. 22-6.

Nardone A, Ronchi B, Lacetera N, Ranieri MS, Bernabucci U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. Livest Sci 2010; 130 (1-3): 57-69.

Özkan Ş. Türkiye’de hayvancılık kaynaklı sera gazı üretimi ve azaltma yöntemleri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2013; 10(3): 185-92.

Özmen MT. Sera gazı-küresel ısınma ve Kyoto Protokolü. İMO Derg 2009; 453(1): 42-6.

Petrovica Z, Djordjevic V, Milicevic D, Nastasijevic I, Parunovic N. Meat production and consumption: Environmental consequences. Procedia Food Sci 2015; 5: 235-8.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK, 2018). <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=27675>; Erişim tarihi: 15.01.2020

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK, 2019). http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002; Erişim tarihi: 16.01.2020

Wiedmann T, Minx J. A definition of ‘carbon footprint’. Ecological economics research trends 2008; 1: 1-11.



The Effect of Supplementation of Betaine on Performance, Carcass Yield and Some Blood Parameters in Broilers*

Tarkan ŞAHİN¹, Osman Çağrı ÖZEL², Mükremin ÖLMEZ¹

¹Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Kars-TURKEY

²Kafkas University, Institute of Health Sciences, Kars-TÜRKİYE

Corresponding author: Tarkan ŞAHİN, E-mail: tarkants7@hotmail.com; ORCID: 0000-0003-0155-2707

How to cite: Şahin T, Özel OÇ, Ölmez M. The effect of supplementation of betaine on performance, carcass yield and some blood parameters in broilers. Erciyes Univ Vet FakDerg 2020; 17(3): 260-267.

Summary: This study aims to investigate the effects of betaine, added to broiler rations at different levels, on fattening performance, carcass, some internal organs weights, and serum parameters. 192 mixed-sex one-day-old broiler chicks were used during the experiment. The experiment was conducted with four groups in total, including one control and three experimental groups. All the groups were divided into four sub-groups, each consisting of 12 chicks, and the total number of chicks in each group was determined to be 48. No additives were added to the feeds of the control group throughout the research. 0.3 g/kg (Bet-0.3), 0.5 g/kg (Bet-0.5) and 0.8 g/kg (Bet-0.8) betaine (Betamar®) were added to the rations of the experimental groups, respectively. Rations were prepared as isocaloric and isonitrogenic. The animals were given feed and water ad-libitum. In the study, The rations containing crude protein (CP) of 23% and 3000 kcal/kg metabolic energy (ME) until the day 1-21 and CP of 20% and 3224 kcal/kg ME until the day 22-42 days were given in the treatment groups. At the end of the study, statistically significant differences were observed in the experimental groups in terms of body weight (BW) and body weight gain (BWG) when compared with the control group. The highest BW and the highest BWG were observed in the Bet-0.8 experimental group. No statistically significant difference was found in terms of feed consumption, feed conversion ratio, carcass characteristics, weights of some internal organs, and serum blood parameters ($P>0.05$). It was concluded that adding 0.8 g/kg betaine to broiler rations increase fattening performance and can be used safely.

Key words: Betaine, blood parameters, broiler, carcass, fattening performance

Broylerlerde Betain İlavésinin Performans, Karkas Verimi ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi

Özet: Bu araştırma broyler rasyonlarına farklı düzeylerde ilave edilen betainin besi performansı, karkas, bazı iç organ ağırlıkları ve serum parametreleri üzerine etkilerini araştırmak amacı ile yapılmıştır. Deneme boyunca 1 günlük 192 adet karışık cinsiyette broyler civciv kullanılmıştır. Deneme 1 kontrol ve 3 deneme grubu olmak üzere toplam 4 grupta yürütülmüştür. Tüm gruplar 12 civcivden oluşan 4 alt gruba bölünmüş, her grubun toplam civciv sayısı 48 olarak belirlenmiştir. Araştırmada boyunca kontrol grubu yemlerine bir katkı ilave edilmemiştir. Deneme grupları rasyonlarına sırasıyla 0.3 g/kg (Bet-0.3), 0.5 g/kg (Bet-0.5) ve 0.8 (Bet-0.8) g/kg betain (Betamar®) ilave edilmiştir. Deneme rasyonları izokalorik ve izonitrojenik olarak hazırlanmıştır. Hayvanlara yem ve su ad-libitum verilmiştir. Araştırmada deneme gruplarına 1-21. güne kadar %23 ham protein (HP): 3000 kcal/kg metabolik enerji (ME), 21- 42.güne kadar ise %20HP ve 3224 kcal/kg ME içeren rasyonlar verilmiştir. Araştırma sonunda, kontrol grubuna göre, deneme gruplarında canlı ağırlık (CA) ve canlı ağırlık artışı (CAA) bakımından istatistiksel farklılık görülmüştür ($P<0.05$). En yüksek canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışının rasyonlarına 0.8 g/kg betain ilavesi yapılan grupta olduğu belirlenmiştir. Deneme sonu itibarı ile yem tüketimi, yemden yararlanma oranı, karkas özellikleri, bazı iç organ ağırlıkları ve serum kan parametreleri bakımından istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Sonuç olarak; broyler karma yemlerine 0.8 g/kg betain ilavesinin besi performansını olumlu etkileyebileceği ve güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Besi performansı, betain, broyler, kan parametreleri, karkas

Introduction

After the ban on antibiotics that were used for many years in increasing growth performance in the European Union from January 1, 2006, several feed additives that can be considered an alternative have been used, greatly supporting the developments in the poultry industry (Eklund et al., 2005; Özsoy et al., 2017).

Betaine is a derivative of a commonly found, long-chain glycine amino acid, and it has three methyl groups. It was firstly discovered in sugar beet, and then, found to exist in other plants, animals, and sea-food. Many purified forms of betaine (anhydrite monophosphate and hydrochloric betaine) are used today (Eklund et al., 2005). Betaine, a source of methyl, is both taken with feeds and forms as a result of oxidation of choline. As poultry rations are usually formulated to be corn and soybean residues-based, methionine is deficient in poultry animals fed with

Geliş Tarihi/Submission Date : 16.06.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.09.2020

*Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.06.2019 tarih ve 15/275 sayılı kararıyla Kabul edilen Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir.

these rations and it becomes necessary to receive it from outside (Eklund et al., 2005). Betaine taken extracellularly or synthesized from choline enables the osmolyte balance of a cell. Also, it enables it to convert into methionine or cysteine by transsulfuration by giving methyl group to homocysteine formed by methionine metabolism (DasSarma et al., 2006; Howe et al., 2008). Another function of betaine is to serve as the donor of methyl groups that are required during the conversion of homocysteine into methionine (Lever and Slow, 2010). Betaine, choline, and methionine are the 3-methyl group providers in the rations of livestock animals. Methionine is primarily used in protein synthesis, while the rest is used for methyl group reactions. After choline is used in the synthesis of acetylcholine, the rest of it can be transformed into the betaine molecule (Niculescu and Zeisel, 2002).

Betaine increased the total body weight and carcass weight by enhancing mineral absorption and retention and enhancing the water retention capacity of the muscle tissue (Esteve-Garcia and Mack, 2000). It was reported that betaine affected carcass quality by reducing the inhibitory effect of pH on enzyme activities (Eklund et al., 2005) and had positive impacts on

performance in poultry if used together with methionine (Esteve-Garcia and Mack, 2000; Schutte et al., 1997). It was also reported that the performance values in broilers increased linearly with adding methionine and betaine (El-Husseiny et al., 2007), on the contrary, McDevitt et al. (2000) reported that the interchangeable use of betaine and methionine in poultry animals would not impact the performance and they could not be used in that way.

This study aimed to evaluate the effects of feed-additive betaine, added to broiler rations at different amounts, on fattening performance, carcass characteristics, internal organ weights and blood parameters and contribute to the literature.

Materials and Method

This study was conducted based on the approval of the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Kafkas University dated October 25, 2018, and numbered KAÜ-HADYEK/2018/089. The research was conducted at the poultry unit of Research Farm of the Faculty of Veterinary, Kafkas University. 192 daily Ross-308 broiler chicks were used as the ani-

Table 1. Composition and chemical analysis of experimental diets

Ingredients (%)	Starter Diet (d 1 to 21)	Finisher Diet (d 22 to 42)
Corn grain	50.58	52.75
Soybean meal	30.40	16.75
Wheat grain	6.00	5.00
Bonkalite	5.50	5.50
CDDGS	-	4.10
Corn protein	2.01	4.20
Rice bran	-	4.62
Vegetable oil	1.02	3.00
Di calcium phosphate	1.00	0.60
Meat-Bone meal	2.30	2.30
L-lysine	0.40	0.40
DL-methionine	0.30	0.30
Sodium Bi-carbonate	0.09	0.09
Salt	0.15	0.14
Vitamin-Mineral mix*	0.25	0.25
Multi-Enzyme	0.09	-
Chemical Analyses (%)		
Dry matter	88.15	88.24
Crude protein	23.00	19.99
Crude fiber	2.96	2.72
Crude fat	4.48	4.49
Crude ash	6.13	4.90
Metabolic Energy**(kcal/kg)	3000.10	3224.90
Calcium**	0.98	0.79
Phosphorus**	0.50	0.58

*KAVIMIX VM 214: Vit A: 12000000 IU; Vit D3: 1500000 IU; Vit E: 30000 mg; Vit K3: 5000 mg; Vit B1: 3000 mg; Vit B2: 6000 mg; Vit B12: 30 mg; Folic Acid: 750 mg; Cal. D.Panth: 10000 mg; D Biotin: 75 mg; Cholin Chloride: 375000 mg; Nicotinamid: 40000 mg; Mn: 80.000 mg; F: 40000 mg; Zn: 60000 mg; Cu: 5000 mg; Sn: 100 mg; I: 400 mg; S: 150 mg; Antioxidant: 10000 mg (per 2.5 kg);

**Calculated nutritional values.

CDDGS: Corn dried distiller's grainssolubles.

mal material. The chicks were divided into four main groups including one control and three experimental groups, and each main group was divided into four sub-groups, each of which consisted of 12 chicks. The experiment lasted for 42 days as 7 days of adaptation and 35 days of feeding period. Each group was fed with broiler chick feed (23% CP, 3000 kcal/kg ME) during 0-21st days chick and broiler feed (20% CP, 3224 kcal/kg ME) during 22-42nd days. The nutrients and chemical composition of rations are shown in Table 1. The animals were subjected to group feeding. Feed and drinking water were *ad-libitum*. While no additive was added to the feed of the C group, 0.3 g/kg (Bet-0.3), 0.5 g/kg (Bet-0.5) and 0.8 g/kg (Bet-0.8) betaine were added to the feeds of the experimental groups, respectively. Betaine (Betamar[®]) used in the study was obtained from the VIMAR A.Ş./İstanbul Corporation. The product contained a minimum 98% Betaine HCL in its chemical composition according to the certified analysis results reported by the producer company (Table 2).

Electric radiant heaters were used to heat the poultry house throughout the study. The temperature of the

and their BWG were calculated. In order to calculate feed consumption (FC), the amounts of feed that animals in each subgroup could consume were put into the feeders and their amounts were recorded. The amount of feed remaining in the feeders in the weekly weights was subtracted from the total feed given to each subgroup and the amount of feed consumed by each subgroup in the previous week was found. This amount was divided by the current number of animals in the subgroups and groups and by the number of days, and FC's were calculated as weekly FC per animal in the groups and subgroups. Feed conversion ratios (FCR) of the groups were calculated by dividing the average amount of feed they consumed between two weighing by the average increase in body weights.

The animals were weighed individually and slaughtered at the end of the study. The chickens were beheaded and the slaughter was performed in this way. After the slaughter, the feathers of the animals were plucked with a plucking machine; the feet and the internal organs were removed. After the slaughter process, carcass weights were determined. Carcass

Table 2. The composition of betaine used in the research

Ingredients	Standard	Result
Appearance		White crystalline powder
Dry Weight (%)	≤0.5	0.37
Hydrochloric acid (%)	≥%95-98	95.53
Heavy metals (Pb) (%)	≤0.001	≤0.001
Arsenic (As) (%)	≤0.002	≤0.002
Silica %	3	3
pH (25%W/V L/gr, water)	0.8-1.2	1.0

poultry house was kept at 35 °C (± 1) in the first week. Then, it was reduced to 25 °C gradually. The temperature was reduced to 20 °C in the last two weeks of the study and kept at 20 °C until the end of the study. Wood shavings were used as the base material. 24-hours illumination was provided by also utilizing sunlight. The experimental area was divided into equal partitions (1.40 x 1.09 m²) for each subgroup. Wood shavings with a depth of 6 to 8 cm were used as the base material. Chick feeders and drinkers were placed into the partitions during the period of the first 14 days. Then, chick feeders were removed and hanging chicken feeders were placed in the following periods and these feeders and drinkers were used until the end of the experiment. The animals that died throughout the experiment were recorded daily. The amounts of crude nutrients of the rations used in the beginning and end periods of the research were determined according to the methods reported by the AOAC (1990).

The animals were weighed individually at the start of the experiment and in the following weeks. A precision balance (±10 mg) was used in all weighing. The differences between the weights were determined

weights were divided by pre-slaughter weights and carcass yields were calculated. The slaughter process was carried out removing the internal organs of the chickens and weighing the internal organs of each animal using precision balances (± 10 mg). The liver, heart, gizzard, and spleen weights were calculated and recorded.

Statistical analyses

BW, BWG, FC, FCR, performance characteristics, carcass parameters, internal organs, and blood values were analyzed by one-way ANOVA (SPSS 18 portable). Differences between the subgroups were analyzed by Duncan's test.

Results

The weekly body weights and the body weight gain in the study are given in Tables 3. At the end of the experiment, statistically significant differences were found between the BW and average BWG values of the control and the experimental groups in which 0.3 g/kg (Bet-0.3), 0.5 g/kg (Bet-0.5) and 0.8 g/kg (Bet-0.8) betaine was added to the feed (P<0.05).

The mean daily (FC) values of the research groups weekly and the FCR are given in Tables 4. The differences observed in the FC and FCR during the 7-14th

sera of the betaine added mixed feeds are shown in Table 6. The total protein, albumin, globulin, glucose, and uric acid levels in the blood serum were not af-

Table 3. The effect of betaine supplementation on BW and BWG of broiler chicks

BW (g/chick)						
Groups	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	42 days
Control	175.79±0.60	424.50±3.79	828.39±10.28	1311.80±12.95	2068.91±65.27	2591.22±20.44 ^b
Bet-0.3	179.06 ±1.02	436.87±6.09	844.87±5.49	1286.58±23.89	2136.59±73.00	2678.68±53.90 ^{ab}
Bet-0.5	177.18±1.59	425.76±7.46	825.94±13.05	1280.54±24.65	2003.31±2.90	2551.20±53.55 ^b
Bet-0.8	176.66±0.65	430.35±3.68	860.03±19.45	1363.84±32.75	2085.58±32.87	2817.39±88.18 ^a
P	0.079	0.410	0.265	0.121	0.468	0.035
BWG (g/day/chick)						
Groups	7-14. days	14-21. days	21-28. days	28-35. days	35-42. days	0-42. days
Control	35.52±0.60	57.70±1.14	69.05±2.12	108.17±9.03	226.82±5.10	69.01±0.57 ^b
Bet-0.3	36.83±0.75	58.28±0.25	63.1 ±3.91	121.43±8.27	214.44±20.65	71.41±1.56 ^{ab}
Bet-0.5	35.51±0.94	57.16±1.13	64.94±3.44	103.25±3.33	201.70±4.67	67.82±1.55 ^b
Bet-0.8	36.53±0.47	61.43±3.29	71.92±3.06	109.95±8.30	201.04±17.24	75.50±2.25 ^a
P	0.465	0.395	0.253	0.415	0.126	0.036

BW, body weight; BWG, body weight gain.

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Differences among groups were not statistically significant (P >0.05)

Groups that were statistically different were indicated by a letter (* P<0.05)

days of the research were eliminated at the end of the experiment and were not found statistically significant.

ected by the betaine addition (P>0.05).

The carcass parameters and liver, heart, spleen, and gizzard weights are given in Table 5. Accordingly, no

Table 4. The effect of betaine supplementation on FC and FCR of broiler chicks

FC (g)						
Groups	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	42 days
Control	76.50±1.32 ^{ab}	123.29±14.77	164.16±4.20	1182.06±9.88	226.82±5.10	154.57±5.13
Bet-0.3	71.57±2.86 ^{bc}	107.05±7.45	168.37±0.18	197.75±5.66	214.44±20.65	151.83±4.55
Bet-0.5	68.56±3.96 ^c	114.12±6.87	163.01±5.17	196.34±3.71	201.70±4.67	148.74±3.78
Bet-0.8	79.61±1.86 ^a	118.38±10.09	161.34±4.23	194.24±12.14	201.04±17.24	150.92±8.34
P	0.02	0.723	0.641	.0566	0.530	0.910
FCR						
Groups	7-14. days	14-21. days	21-28. days	28-35. days	35-42. days	0-42. days
Control	2.15±0.04 ^a	2.12±0.23	2.38±0.12	1.72±0.20	3.22±0.53	2.15±0.04 ^a
Bet-0.3	1.94±0.07 ^b	1.83±0.13	2.70±0.18	1.64±0.09	2.87±0.50	1.94±0.07 ^b
Bet-0.5	1.92±0.06 ^b	1.99±0.08	2.52±0.06	1.90±0.66	2.63±0.24	1.92±0.06 ^b
Bet-0.8	2.18±0.04 ^a	1.93±0.13	2.26±0.15	1.77±0.87	2.08±0.20	2.18±0.04 ^a
P	0.013	0.626	0.196	0.531	0.285	0.013

FC, feed consumption, FCR, feed conversion ratio.

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Groups that were statistically different were indicated by a letter (* P<0.05)

significant difference was found between the experimental groups in terms of slaughter, carcass weight, hot carcass yields, and internal organ weights (P>0.05).

Statistical evaluations on the total protein, albumin, globulin, glucose, and uric acid levels in the blood

Table 5. The effect of betaine supplementation on carcass parameters of broiler chicks

Groups	CarcassParameters						
	SW (g)	WC (g)	DP (%)	Liver (g)	Heart (g)	Spleen (g)	Gizzard (g)
Control	3016.00±65.24	2285.18±39.70	75.82±0.55	49.50±2.32	14.36±0.97	2.22±0.97	38.40±2.95
Bet-0.3	3058.37±26.95	2356.18±24.24	77.04±0.40	52.20±1.89	13.95±0.57	1.95±0.57	36.61±2.21
Bet-0.5	2899.62±59.25	2235.12±40.17	77.12±0.61	57.09±2.99	14.43±0.94	1.88±0.17	37.08±1.64
Bet-0.8	3009.21±28.29	2337.06±43.35	76.41±0.25	55.22±2.89	15.82±0.43	1.88±0.18	38.60±1.57
P	-	-	-	-	-	-	-
	0.149	0.123	0.257	0.191	0.474	0.550	0.895

SW: Slaughter weight; WC: Warm carcass; DP: Dressing percentage; Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Differences among the groups were not statistically significant (P >0.05).

Table 6. The effect of betaine supplementation on blood parameters of broiler chicks

	Blood Parameters (mg/dl)				
	Total Protein	Albumin	Globulin	Glucose	Uric Acid
Control	3.00±0.04	0.96±0.22	2.06±0.31	220.10±8.96	6.78±0.56
Bet-0.3	2.94±0.09	0.95±0.04	1.97±0.63	228.20±3.97	6.09±0.47
Bet-0.5	3.01±0.10	1.03±0.20	2.11±0.33	227.70±6.19	6.65±0.32
Bet-0.8	2.92±0.12	1.02±0.03	2.00±0.52	222.00±14.24	7.82±0.37
P	0.874	0.116	0.158	0.898	0.065

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Differences among the groups were not statistically significant (P >0.05).

Discussion and Conclusion

At the end of the study, statistically significant differences were found between the growth performances of the control and experimental groups. The highest increase in body weight was observed in the Bet-0.8 experimental group, in which 0.8 g/kg betaine was added to the rations. The results of this study are consistent with those of the study on the effects of adding only betaine or together with methionine to the broiler rations on performance parameters (Hassan et al., 2005; Honarbakhsh et al., 2007; Zhan et al., 2006). Hoşgör (2005) reported that a 500-mg/kg betaine addition to the drinking water of broilers had no effect on BW on the 12th day; however, it provided an increase in BW on the 47th day. Besides, the findings on the increase in body weights obtained in the study are similar to the findings of several other studies (Attia et al., 2005; El-Husseiny et al., 2007; Virtanen 1995). Sakomura et al. (2013) reported that the betaine addition improves the characteristic and structural functions of the intestinal epithelial cells and in this way, nutrients can be more easily digested. Chand et al. (2017) reported that betaine addition to the rations of broilers significantly affected body weight gain, the highest body weight was observed in the group in which 2 g/kg betaine was added to the rations, and the more the dose of betaine the more the body weights increase compared with the control group. The researchers stated that the increase in

body weight was because of the fact that betaine increased the digestibility of specific nutrients as stated by Eklund et al. (2006).

On the other hand, this research is not consistent with the studies in which betaine was used together with ionophore anticoccidials (Matthews et al., 1997; Waldenstedt et al., 1999) and the studies reporting that betaine addition did not have any effect on BW and BWG (Esteve-Garcia and Mack, 2000; Pirompu et al., 2005; Uzunoğlu and Yalçın, 2019).

Although betaine increases energy availability, it needs energy for its excretion as it contains nitrogen. Fernández-Fígares et al. (2002) stated that there was a positive linear correlation between the levels and impacts of betaine. Xu et al. (1999) emphasized that the addition of betaine over 0.08% to the rations reduced its effectiveness. The addition of pure betaine to the betaine-rich mixed feeds had a positive effect on growth performance (Cromwell et al., 1999). The reason for the difference in the effects of betaine was attributed to many factors (Esteve-Garcia and Mack, 2000; Matthews et al., 1997). Regarding the results of the present study and some other studies, the difference between them is thought to originate from the composition of betaine, its usage, its applications at different doses, and using different breeds of animals in the studies.

In this study in which betaine was added to the rations at different amounts, a statistically significant difference was observed between the FC and FCR values in only between 7-14th days. However, this difference disappeared during the following weeks of the experiment and no statistically significant difference was found. Our study is consistent with the results of the reported researchers (El-Husseiny et al., 2007; Esteve-Garcia and Mack, 2000; Jahanian and Rahmani, 2008; Pirompu et al., 2005; Uzunoğlu and Yalçın, 2019) and El-Husseiny et al. (2007) results showing that betaine addition (0.5, 0.75, and 1 mg/kg) to the rations that contained methionine at different rates did not affect feed consumption in broilers. However, these experimental results differ from those of the studies reporting increased feed consumption, when compared with the control group (Awad et al., 2014; Sakomura et al., 2013). Similarly, they do not comply with the reports stating that betaine increases FC and FCR (Attia et al., 2005; Chand et al., 2017; Hassan et al., 2005; Honarbakhsh et al., 2007).

In consequence of the findings obtained at the end of the experiment, no statistically significant difference was found between the groups in terms of carcass parameters, and heart, liver, spleen, and gizzard weights in the control and experimental groups. The present study is similar to those by (El-Shinnawy 2015; Honarbakhsh et al., 2007; Uzunoğlu and Yalçın, 2019) reporting that betaine addition did not affect carcass yield and heart, liver, spleen, and gizzard weights.

However, it was reported that betaine addition to broiler rations at a lower level (1 g/kg) did not affect the carcass yield when compared with the control group, yield ratio increased significantly with the increase in the dose (1.5 and 2.0 g/kg), this increase was caused by the osmotic effect of betaine, which increased dropsy (Chand et al., 2017). In especially some studies, betaine was reported to have a positive impact on the breast meat yield (Attia et al., 2005; Esteve-Garcia and Mack, 2000; Noll et al., 2002; Remus 2001). In the same way, betaine addition was reported to increase carcass yield and muscle tissue protein ratio in poultry (El-Shinnawy 2015; Hassan et al., 2005; Jahanian and Rahmani, 2008; Wang et al., 2004). Betaine takes effect by reducing carcass fat content and enhancing carcass lean meat percentage. The positive effects of betaine addition on carcass yield are thought to depend on the methyl donor function in protein metabolism.

In the experiment, serum, total protein, albumin, globulin, glucose, and uric acid levels of the groups were not affected by the betaine addition. The results of the experiment are similar to those of the studies reporting that betaine addition to rations does not affect blood serum parameters in broilers (Attia et al.,

2005; Baghaei et al., 2011). In some studies conducted with betaine addition, it was reported that serum triglyceride level was lower than the other groups (Uzunoğlu and Yalçın, 2019), betaine significantly reduced plasma triglyceride levels, did not affect plasma cholesterol and LDL levels, and increased HDL levels (Jahanian and Rahmani, 2008). This decrease in triglycerides was reported to be because of the use of betaine in the synthesis of carnitine and lecithin molecules (Saunderson and Mackinlay, 1990). Also, Hassan et al. (2005) contradict the statement that betaine addition at different levels in broilers increased serum total protein and albumin levels when compared with the control groups. The researchers reported that this result proved that betaine is a methyl donor in protein metabolism. Zhan et al. (2006) reported that betaine significantly reduced serum uric acid concentration in broilers. El-Husseiny et al. (2007) stated that the increase in doses of betaine addition to the mixed feeds of broilers increased serum total protein and globulin levels, and plasma components except for total protein were not affected in the second trial.

It was concluded that betaine addition to the mixed feeds took positive effects on performance and could be used at an amount of 0.8 g/kg.

References

- AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists Arlington, Virginia; 1990.
- Attia Y, Hassan R, Shehatta M, Abd-El-Hady SB. Growth, carcass quality and serum constituents of slow growing chicks as affected by betaine addition to diets containing 2. Different levels of methionine. *Int J Poult Sci* 2005; 4(11): 856-65.
- Awad A, Fahim H, Ibrahim A, Beshara M. Effect of dietary betaine supplementation on productive and reproductive performance of Domyati ducks under summer conditions. *Egyptian Poult Sci J* 2014; 34(2): 453-74.
- Baghaei M, Eslami M, Chaji M, Mamoue M, Bojarpour M. Effect of different levels of dl-methionine replaced with betain on some of blood parameters on broiler chickens. *J Anim Vet Adv* 2011; 10(6): 777-9.
- Chand N, Naz S, Maris H, Khan RU, Khan S, Qureshi MS. Effect of betaine supplementation on the performance and immune response of heat stressed broilers. *Pak J Zool* 2017; 49(5): 1857-62
- Cromwell G, Lindemann M, Randolph J, Monegue H, Laurent K, Parker G. Efficacy of betaine as a carcass modifier in finishing pigs fed normal and reduced energy diets. *J Anim Sci* 1999; 77: 179.

- DasSarma S, Berquist BR, Coker JA, DasSarma P, Müller JA. Post-genomics of the model haloarchaeon *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Syst* 2006; 2 (1): 3.
- Eklund M, Bauer E, Wamatu J, Mosenthin R. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutr Res Rev* 2005; 18(1): 31-48.
- Eklund M, Mosenthin R, Tafaj M, Wamatu J. Effects of betaine and condensed molasses solubles on nitrogen balance and nutrient digestibility in piglets fed diets deficient in methionine and low in compatible osmolytes. *Arch Anim Nutr* 2006; 60(4): 289-300.
- El-Husseiny OM, A A-E-EM, Abd-Elsamee MO, Magda MO, Abd-Elfattah M. Response of broilers performance to dietary betaine and folic acid at different methionine levels. *Int J Poult Sci* 2007; 6(7): 515-23.
- El-Shinnawy A. Effect of betaine supplementation to methionine adequate diet on growth performance, carcass characteristics, some blood parameters and economic efficiency of broilers. *J Anim Poult Prod* 2015; 6(1): 27-41.
- Esteve-Garcia E, Mack S. The effect of DL-methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. *Anim Feed Sci Tech* 2000; 87(1-2): 85-93.
- Fernández-Fígares I, Wray-Cahen D, Steele N, Campbell R, Hall D, Virtanen E, Caperna T. Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed-restricted pig. *J Anim Sci* 2002; 80(2): 421-8.
- Hassan R, Attia Y, El-Ganzory E. Growth, carcass quality and serum constituents of slow growing chicks as affected by betaine addition to diets containing 1. Different levels of choline. *Int J Poult Sci* 2005; 4(11): 840-50.
- Honarbaksh S, Zaghari M, Shivayad M. Interactive effects of dietary betaine and saline water on carcass traits of broiler chicks. *J Biol Sci* 2007; 7: 1208-14.
- Hoşgör İ. İçme sularına katılan betainin broyler besi performansı ve gövde eti parça oranları üzerine etkisi, Doktora tezi, Uludağ Üniv Sağ Bil Ens, Bursa 2003.
- Howe JC, Williams JR, Holden JM, Zeisel SH, Mar MH. USDA database for the choline content of common foods. Maryland: Department of Agriculture Agricultural Research Service, 2008; p.17.
- Jahanian R, Rahmani H. The effect of dietary fat level on the response of broiler chicks to betaine and choline supplements. *J Biol Sci* 2008; 8(2): 362-7.
- Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem* 2010; 43(9): 732-44.
- Matthews J, Ward T, Southern L. Interactive effects of betaine and monensin in uninfected and *Eimeria acervulina*-infected chicks. *Poult Sci* 1997; 76(7): 1014-9.
- McDevitt R, Mack S, Wallis I. Can betaine partially replace or enhance the effect of methionine by improving broiler growth and carcass characteristics? *Br Poultry Sci* 2000; 41(4): 473-80.
- Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folic acid, methionine and choline. *J Nutr* 2002; 132(8): 2333-5.
- Noll S, Stangeland V, Speers G, Brannon J, Kalbfleisch J. Betaine and breast meat yield in turkeys. *Proc. Multistate Poultry Nutrition and Feeding Conf. May, 2002; Indianapolis-USA.*
- Özsoy B, Ölmez M, Karadağoğlu Ö, Şahin T. Determination of the effect of mixture of essential oil and organic acid containing at different levels on broiler rations on fattening performance, carcass parameters and some internal organ weights. *Lalahan Hayv Arařt Enst Derg* 2017; 57(2): 77-82.
- Pirompud P, Attamangkune S, Bunchasak C, Promboon A. Effect of feeding betaine to broilers reared under tropical conditions on performance and carcass traits. *Proceedings of Forty Third Kasetsart University Annual Conference. February, 1-4, -2005; Bangkok-Thailand.*
- Remus J. Betaine for increased breast meat yield in turkeys. *World Poult* 2001; 17: 14-5.
- Sakomura NK, Barbosa NA, Da Silva EP, Longo FA, Kawachi IM, Fernandes JB. Efeito da suplementação de betaína em dietas de frangos de corte em condições de termoneutralidade. *Agrária* 2013; 8(2): 336-41.
- Saunderson CL, Mackinlay J. Changes in bodyweight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *Br J Nutr* 1990; 63(2): 339-49.
- Schutte J, De Jong J, Smink W, Pack M. Replacement value of betaine for DL-methionine in male broiler chicks. *Poult Sci* 1997; 76(2): 321-5.

- Uzunoğlu K, Yalçın S. Effects of dietary supplementation of betaine and sepiolite supplementation on performance and intestinal health in broilers. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2019; 66(3): 221-30.
- Virtanen E. Effects of betaine on methionine requirement of broilers under various environmental conditions. *Proceedings, Australian Poultry Science Symposium*; 1995; 7: 88-92.
- Waldenstedt L, Elwinger K, Thebo P, UgglA A. Effect of betaine supplement on broiler performance during an experimental coccidial infection. *Poult Sci* 1999; 78(2): 182-9.
- Wang Y, Xu Z, Feng J. The effect of betaine and DL-methionine on growth performance and carcass characteristics in meat ducks. *Anim Feed Sci Tech* 2004; 116(1-2): 151-9.
- Xu Z, Yu D, Wang Y. The effects of betaine on weaning piglets and its mechanism. *J Zhejiang Univ-Sc* 1999; 25: 543-6.
- Zhan X, Li J, Xu Z, Zhao R. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *Br Poultry Sci* 2006; 47(5): 576-80.



Determination of the Opinions about Physiology Education of the Kırıkkale University Faculty of Veterinary Students

Ruhi KABAKÇI¹, Ayşe Arzu YIĞIT¹

¹Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology Kırıkkale-TURKEY

Corresponding author: Ayşe Arzu YIĞIT; E-mail: aarzuyigit@kku.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5837-6877

How to cite: Kabakçı R, Yiğit AA. Determination of the opinions about physiology education of the Kırıkkale University Faculty of Veterinary students. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 268-274.

Summary: This study was conducted to determine the attitudes and behaviors of 2-5th grade students who have taken the physiology course at Kırıkkale University Faculty of Veterinary Medicine, towards the course and how they evaluate it in terms of general, teaching method, professional competence and postgraduate education. Some demographic information and opinions of totally 233 students on physiology were gathered voluntarily through questionnaire. Accordingly, most of the students (62.7%) found it appropriate to be given physiology in 2nd grade, while about 53% of them found the theory and practice lecture hours sufficient. Students who considered physiology as necessary for their profession (83.7%) thought that following the lesson (81.1%) in the class and the use of were necessary for learning physiology (90.1%), and it was determined that they allocated fewer than 4 hours per week to physiology while taking the course (89.3%). Although more than half of them (58.4%) stated that they did not have difficulty in learning physiology, the rate of those who really understand the subject was 39.9%. In addition, it was observed that 24% of them could consider specializing in physiology. As a result, it was revealed that most of the students consider the physiology course as one of the basic courses for veterinary education, they prefer visual education, the course meets their expectations, and most of them who want to pursue a doctorate pay attention to postgraduate education in this field. Based on these thoughts of the students, it has been concluded that understanding the importance of the homeostatic mechanisms, given in physiology classes, in preventive and curative medicine practices has been effective.

Key words: Education, student attitude, survey, teaching method, veterinary physiology

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Fizyoloji Eğitimi Hakkındaki Düşüncelerinin Belirlenmesi

Özet: Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde fizyoloji dersini almış olan 2-5. sınıf öğrencilerinin fizyoloji dersine karşı tutum ve davranışlarını ve dersi genel, öğretim yöntemi, mesleki yeterlilik ve lisansüstü eğitim açısından nasıl değerlendirdiklerini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmaya katılan toplam 233 öğrenciye gönüllülük esasına göre doldurtulan anket formunda bazı demografik bilgiler ve fizyoloji dersi ile ilgili görüşler alındı. Buna göre, öğrencilerin çoğu (%62.7) fizyoloji dersinin 2. sınıfta verilmesini uygun görürken, yaklaşık %53'ü teorik ve uygulama ders saatlerini yeterli buldu. Fizyoloji dersini meslekleri açısından gerekli gören öğrencilerin (%83.7), dersi derste takip etmenin (%81.1) ve anlatımda görselliğin kullanımının fizyoloji öğrenimi açısından gerekli olduğunu (%90.1) düşündükleri, dersi aldıkları süreçte ise fizyolojiye haftada 4 saatten az zaman ayırdıkları (%89.3) belirlendi. Öğrencilerin yarısından fazlası (%58.4) fizyoloji öğreniminde zorlanmadıklarını belirtse de dersten konuyu anlayarak çıkarlarının oranının %39.9 olduğu gözlemlendi. Ayrıca, öğrencilerin %24'ünün fizyoloji alanında uzmanlaşmayı düşünebilecekleri görüldü. Sonuç olarak, öğrencilerin çoğunun fizyoloji dersini veteriner hekimlik eğitimi için temel derslerden biri olarak gördükleri ve görsel eğitimi tercih ettikleri, dersin beklentilerini karşıladığı ve doktora yapmak isteyen öğrencilerin çoğunun bu alanda lisansüstü eğitimi tercih edecek kadar önemsedikleri ortaya konuldu. Öğrencilerin bu düşünceleri üzerinde, koruyucu ve tedavi edici hekimlik uygulamalarında fizyoloji dersinde öğrendikleri homeostatik mekanizmaların önemli olduğunu anlamalarının etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Anket, eğitim, öğrenci tutumu, öğretim yöntemi, veteriner fizyoloji

Introduction

Physiology is one of the basic courses in all health science departments such as faculty of veterinary medicine. The veterinary physiology course aims to explain and teach how the physiological processes (interaction of cells, organs or systems and all homeostatic mechanisms) occur in the bodies of healthy

domestic animals (Diwakar et al., 2007). It takes part in the compulsory courses of the 5-year comprehensive educational processes in faculties of veterinary medicine in Turkey. It makes students ready for forthcoming courses that are related to their education. Physiology has also wide and complex topics which are related to each other. For example, to understand the mechanism of renin-angiotensin-aldosterone, it is required to have enough knowledge about few hormones (renin, aldosterone, vasopressin), organs

(lung, liver, kidney, pituitary gland), and systems (renal, cardiovascular, endocrine) (McFee et al., 2018).

Students take the physiology courses (I and II) in the 3rd and 4th semester in Kırıkkale University Faculty of Veterinary Medicine as a 3h theoretic and 2h practical courses per week. Practical lessons are as essential as theoretic ones. Although the animation, simulation and internet-based application programs used in practical lessons depending on the technological developments provide a number of conveniences; it has been stated that the knowledge learned via practices carried out with live materials, is retained longer by students (Pal et al., 2014; Çevik-Demirkan et al., 2016). Student-centered education programs are very important to train successful and qualified veterinarians. In this context, feedbacks received from students at certain times contribute to revision and development of the education and training process (Boud, 1998; Gözil et al., 2006).

In previous studies, some researchers (Otağ and Otağ, 2013; Kunt, 2014; Ekerbicer et al., 2016) suggested that student feedbacks show how physiology education can be improved. However, there are no studies evaluating the education of physiology course in veterinary faculties. Thus, we aimed to determine the opinions and attitudes of the veterinary students to the physiology course, and competence / necessity of the course in terms of their profession in our university.

Material and Methods

Survey researches reflect or explain the past and current state of a situation (Karasar, 2019). This survey study carried out with the permission (2019/E4042) of Kırıkkale University Faculty of Veterinary

Medicine and the approval of the Non-Interventional Research Ethics Committee (Date: 07.08.2019; Decision No: 2019.07.06) in the end of the 2018-2019 academic year.

Totally 233 students from the sophomore to senior, who completed Physiology I and Physiology II courses, joined to the research voluntarily. Survey questions were prepared by utilizing the previous studies (Otağ and Otağ, 2013; Çetkin et al., 2016). According to that, students' demographic information was picked on table 1. Answers of table 2 evaluated the opinions of them on physiology course; table 3 evaluated the attitudes of them; table 4 evaluated the competence/necessity of the course in terms of profession and table 5 evaluated their thoughts for post-graduate education process for physiology course and teaching methods, were prepared according to 3-point Likert scale as "No", "Not Sure" or "Yes". The Cronbach alpha values of each subunits of the questionnaire were between 0.59-0.81.

Data obtained from students' responses were expressed as frequency (n) and percentage (%), while the mean scores of each group, which were generated from answers rated as "No" 1, "Not Sure" 2, "Yes" 3, were compared with demographic data by using student-t test or one-way ANOVA test with SPSS 18.0 package program.

Results

The numbers of male and female students participating in the study were 120 and 113 respectively, and their ages were between 19 and 24 (88.90%) mostly. Almost all of them preferred the veterinary faculty willingly (94.42%) and studied physiology less than 4 hours a week (89.27%). While the 2nd grade students (n=92) were the most participated, 4th grade students

Table 1. Descriptive statistics of the students participating in the research

	Variable	n	%
Gender	Male	120	51.5
	Female	113	48.5
Age	19-21	133	57.1
	22-24	74	31.8
	25≤	26	11.2
Type of faculty preference	Willingly	220	94.4
	Unwillingly	13	5.6
Grade	2nd grade	92	39.5
	3rd grade	84	36.1
	4th grade	27	11.6
	5th grade	30	12.9
Grade point average	≤ 59	54	23.2
	60-79	141	60.5
	80 ≤	38	16.3
Status of course repetition	1 time	168	72.1
	2+ times	65	27.9
Weekly study time to physiology	≤4 hours	208	89.3
	4> hours	25	10.7

Table 2. Students' opinions about physiology course and teaching method

	No		Not Sure		Yes		Mean Score		
	n	%	n	%	n	%	\bar{X}	\pm	SEM
2.1. Was it appropriate to give the physiology course in the 2nd grade?	50	21.5	37	15.9	146	62.7	2.41	\pm	0.05
2.2. Was the theoretical lesson time (3 hours) sufficient for the lesson learning?	55	23.6	53	22.7	125	53.6	2.30	\pm	0.05
2.3. Was the practical lesson time (2 hours) sufficient for laboratory applications?	57	24.5	52	22.3	124	53.2	2.29	\pm	0.05
2.4. Were the consumables, materials, tools, equipment etc. allocated for the practice lessons sufficient?	35	15.0	36	15.5	162	69.5	2.55	\pm	0.05
2.5. Were the number of students in the practice lessons sufficient?	47	20.2	43	18.5	143	61.4	2.41	\pm	0.05
2.6. Were the practical lessons explain and supplemented the theoretical lessons?	40	17.2	39	16.7	154	66.1	2.49	\pm	0.05
2.7. Was the visuality important for teaching/ learning of the physiology course?	15	6.4	8	3.4	210	90.1	2.84	\pm	0.03
2.8. Did you think that the teaching method affects your success in the physiology course?	31	13.3	33	14.2	169	72.5	2.59	\pm	0.05
2.9. Could you easily ask a question to the Instructor during the lesson?	28	12.0	28	12.0	177	76.0	2.64	\pm	0.05
2.10. Could you easily reach the instructor outside of the class?	27	11.6	26	11.2	180	77.3	2.66	\pm	0.04

(n=27) were the least participated to the research. Grade point average (GPA) of students for the Physiology I and II students was in 60-79 range, and the participants who took the course one time were in majority (72.10%) (Table 1).

According to Table 2, more than half of the students (53%) considered that the durations of both theoretical and practical lessons were sufficient, and the physiology course should be given in the second grade (62.66%). It was observed that most of them (90.13%) thought that the visuality is important for educational process of physiology course, and the teaching method affects their success in physiology (72.53%). Also, they noted that more than 75% of students declared that they could reach or ask a question to the teacher inside or outside of the class.

As shown in Table 3, while most of the students (81.1%) thought that the class participation is a necessity to follow the lesson, fewer of them (47.2%) would attend the course even if attendance were not compulsory. Also, it was determined although most of students (58.4%) noted that they have no difficulties learning physiology, fewer participants (39.9%) declared that they came out of the lesson by understanding of the subject.

More than half of the students thought that theory and practice educations satisfied their expectations. On the other hand, less of them (35.6%) considered that their knowledge of physiology is sufficient. Besides, the proportion of participants who consider physiology is necessary in terms of their profession was higher (83.7%) (Table 4).

Table 3. Attitudes and behaviors of students to the physiology learning-teaching process

	No		Not Sure		Yes		Mean Score		
	n	%	n	%	n	%	\bar{X}	\pm	SEM
3.1. Did you attend the physiology course regularly?	31	13.3	33	14.2	169	72.5	2.59	\pm	0.05
3.2. Was it necessary to follow the lesson in the class in terms of physiology learning?	23	9.9	21	9.0	189	81.1	2.71	\pm	0.04
3.3. Would you attend the class even if you did not have to compulsory?	64	27.5	59	25.3	110	47.2	2.20	\pm	0.06
3.4. Did you use the textbook or the internet to study physiology?	51	21.9	40	17.2	142	60.9	2.39	\pm	0.05
3.5. Did you come out of the physiology lesson with an understanding of the subject?	52	22.3	88	37.8	93	39.9	2.18	\pm	0.05
3.6. Did you find the physiology course interesting and enjoyed working?	49	21.0	67	28.8	117	50.2	2.29	\pm	0.05
3.7. Did you have difficulty learning the physiology?	136	58.4	40	17.2	57	24.5	1.66	\pm	0.06
3.8. Did you think the physiology is based on memorization?	79	33.9	58	24.9	96	41.2	2.07	\pm	0.06

Table 4. Evaluation on the adequacy of physiology learning-teaching process of the students

	No		Not Sure		Yes		Mean Score	
	n	%	n	%	n	%	$\bar{X} \pm SEM$	
4.1. Do you think the physiology course necessary for your profession?	25	10.7	13	5.6	195	83.7	2.73	± 0.04
4.2. Do you think your physiology knowledge is sufficient?	67	28.8	83	35.6	83	35.6	2.07	± 0.05
4.3. Did theoretical physiology education satisfy your expectations?	35	15.0	71	30.5	127	54.5	2.39	± 0.05
4.4. Did practice physiology education satisfy your expectations?	50	21.5	52	22.3	131	56.2	2.35	± 0.05
4.5. Was there a conflict between what you learned in the physiology course and your previous knowledge?	153	65.7	42	18.0	38	16.3	1.51	± 0.05

According to the distribution rates of the answers in Table 5, it was seen that the students neither want to specialize in physiology (51.1%), nor they have enough knowledge about postgraduate education of physiology (60.1%).

responses about sufficiency of their physiology knowledge of students in the 5th grade and who took the course more than once were significantly lower than the students in the 2nd grade and who took the course 1 time ($P < 0.05$).

Table 5. Views of students on postgraduate education

	No		Not Sure		Yes		Mean Score	
	n	%	n	%	n	%	$\bar{X} \pm SEM$	
5.1. Do you plan to continue postgraduate education in any department after graduation?	99	42.5	74	31.8	60	25.8	1.83	± 0.05
5.2. Would you like to specialize in physiology in the future?	119	51.1	58	24.9	56	24.0	1.73	± 0.05
5.3. Do you have enough information about physiology postgraduate education?	140	60.1	71	30.5	22	9.4	1.49	± 0.04

Attitudes and behaviors of the students towards the physiology course compared with gender, GPA, and status of course repetition given in Table 6. It was determined that female students were pay more attention to follow the lesson and understand more in the classroom in order to find interesting the subjects. Besides, GPA of the students who understood the physiology lesson in the classroom were higher than the 60 and they found the lesson interesting and enjoyed studying, and they did not find difficult to learn the physiology. It was observed that those who took the course more than once would not want to attend the course if it was not compulsory and did not find the course interesting. It was also found that these students, like those with a less GPA than 60, thought that the course was based on memorization.

As shown in Table 7, students thought it was appropriate to be given the physiology course in the 2nd grade, which did not differ according to gender or GPA or status of course repetition. Also, even if all students have noted that physiology is necessary for their future profession, female students agreed with this opinion more than the male, and similarly, the 2nd grade students agreed more than the 5th grade students ($P < 0.05$). Furthermore, the mean scores of

Discussion and Conclusion

Student feedback is a current and reliable method that has been used continuously from past to present in order to improve the education process. However, it is also important to evaluate the data objectively that is obtained from survey (Otağ and Otağ, 2013; Çetkin et al., 2016). In this study, we have determined the opinions and attitudes/behaviors of the Kırıkkale University Faculty of Veterinary Medicine's students to the physiology course, and competence/necessity of the course in terms of profession for them. The data showed that both male and female students have preferred the veterinary faculty willingly (94.4%). It is known that faculty preferences take shape by the individual's wish, interest and ability, and these can affect the happiness, success and efficiency of the students in education process (Sarikaya and Khorshid, 2009). Also, Küçükaslan and Bulut (2019) have reported that most of the students of Dicle University Faculty of Veterinary Medicine have obtained information about their faculty (59.3%) before they listed university preference (76.9%), which indicates that students have preferred the veterinary faculty willingly and consciously. However, in this study, only 10.7% of the students declared that

Table 6. Alteration of the students' attitudes and behaviors towards physiology lesson according to demographic data

	Gender		Grade point average			Status of course repetition	
	Male	Female	<59	60-79	80<	1 time	2+ times
Did you attend the physiology course regularly?	2.53 ± 0.07	2.65 ± 0.06	2.41 ± 0.11	2.63 ± 0.06	2.71 ± 0.11	2.65 ± 0.05	2.45 ± 0.10
Was it necessary to follow the lesson in the class in terms of physiology learning?	2.60 ± 0.07 ^b	2.83 ± 0.04 ^a	2.63 ± 0.10	2.78 ± 0.04	2.58 ± 0.13	2.74 ± 0.05	2.65 ± 0.08
Would you attend the class even if you did not have to attend?	2.04 ± 0.08 ^b	2.36 ± 0.07 ^a	1.96 ± 0.12 ^b	2.23 ± 0.07 ^{ab}	2.42 ± 0.12 ^a	2.29 ± 0.06 ^a	1.95 ± 0.11 ^b
Did you use the textbook or the internet to study physiology?	2.33 ± 0.08	2.45 ± 0.08	2.28 ± 0.11	2.43 ± 0.07	2.42 ± 0.13	2.38 ± 0.06	2.43 ± 0.10
Did you come out of the physiology lesson with an understanding of the subject?	2.07 ± 0.07 ^b	2.29 ± 0.07 ^a	1.80 ± 0.10 ^b	2.29 ± 0.06 ^a	2.29 ± 0.12 ^a	2.21 ± 0.06	2.09 ± 0.09
Did you find the physiology course interesting and enjoyed studying?	2.09 ± 0.08 ^b	2.50 ± 0.06 ^a	1.87 ± 0.12 ^c	2.44 ± 0.06 ^{ab}	2.34 ± 0.13 ^b	2.40 ± 0.06 ^a	2.00 ± 0.10 ^b
Did you have difficulty learning the physiology?	1.78 ± 0.08 ^a	1.53 ± 0.07 ^b	2.22 ± 0.12 ^a	1.52 ± 0.06 ^{bc}	1.37 ± 0.12 ^c	1.62 ± 0.07	1.77 ± 0.10
Did you think the physiology is based on the memorization?	2.14 ± 0.08	2.00 ± 0.08	2.33 ± 0.12 ^a	2.04 ± 0.07 ^{ab}	1.84 ± 0.13 ^b	1.96 ± 0.07 ^b	2.35 ± 0.10 ^a

Different letters show statistical significances which mean P<0.05.

Table 7. Alteration of the students' opinions on the importance of physiology lesson according to demographic data

	Gender		Grade				Status of course repetition	
	Male	Female	2nd	3rd	4th	5th	1 time	2+ times
Was it appropriate to give the physiology course in the 2nd grade?	2.32 ± 0.08	2.51 ± 0.07	2.59 ± 0.07	2.36 ± 0.10	2.22 ± 0.17	2.20 ± 0.17	2.44 ± 0.06	2.34 ± 0.10
Did you think the physiology course necessary for your profession?	2.64 ± 0.07 ^b	2.82 ± 0.05 ^a	2.87 ± 0.05 ^a	2.71 ± 0.07 ^{ab}	2.70 ± 0.13 ^{abc}	2.37 ± 0.16 ^{cd}	2.78 ± 0.05	2.60 ± 0.09
Did you think your physiology knowledge is sufficient?	2.08 ± 0.07	2.05 ± 0.08	2.21 ± 0.08 ^a	2.01 ± 0.09 ^{ab}	2.11 ± 0.17 ^{ab}	1.77 ± 0.15 ^b	2.15 ± 0.06 ^a	1.86 ± 0.10 ^b

Different letters show statistical significances which mean P<0.05.

they studied physiology more than 4 hours a week, and the GPA of only 16.3% of them was 80 ≤. Furthermore, consistent with the fact that almost all the students (89.3%) spent 0-4 hours a week studying physiology course, the GPA of 60.5% of them ranged from 60 to 79. This situation may be related with one of the common problems in today's educational process, as previously reported by Tümkaya and Bal (2006), that students do not have effective/sufficient study habits.

In some previous studies (Gözil et al., 2006; Sindel et al., 2008; Çetkin et al., 2016), the students stated that the teaching method of anatomy made the course easier and affected their success. Also, students of faculty of education, who took the course in anatomy and physiology, declared that the course time was sufficient (80%) and they stated that it was important to care visually in teaching/learning process (87%) (Otağ and Otağ, 2013). Besides, Sefton (2005) considered the future of physiology education in a global sense by emphasizing the necessity of visually us-

age in the teaching/learning process like the internet and computer actively. In addition, Lewis (2003) reported that the students, who received anatomy and physiology courses by computer-assisted learning methods, took higher marks than those subjected to conventional methods. According to Ekerbicer et al. (2016), faculty of medicine students informed that usage of simulation was effective in the physiology laboratory (mean score = 4.15 ± 1.18). Similarly, in our study, students, who thought the course should be given in the 2nd grade (62.7%) and the hours of the course is sufficient (53%), thought that the visuality was important in the teaching/learning of the physiology course (90.1%) because they thought the teaching method affects their success in the physiology course (72.5%).

The students stating that they did not have difficulty learning physiology (58.4%) thought that it was necessary to follow the lesson in the classroom (81.1%). Even though most of the students (72.5%) attended the lesson, the 47.2% of them declared that they would not attend the class if it were not compulsory. This may indicate that they have attended the lesson unwillingly. But, in this finding, it should be considered that approximately 30% of the students took the physiology course more than twice. Also, 41.1% of them thought that this course is based on the memorization, which may account for the low percentage (39.9%) of the students coming out of the physiology class with the satisfaction of understanding the subject. According to Razon (2020) people learn the issues of their interest and needing easily and quickly with having fun. Similarly, Brandt (1998) suggested that people learn what is personally meaningful for them. However, only half of the students in this study stated that they were interested in or enjoyed studying physiology. Thus, their interest in the course may affect their attendance at class and success in physiology course.

It is really worrying that most of students in this study plan to continue postgraduate education neither in physiology nor in any department. Our findings are compatible with the results of Küçükaslan and Bulut (2019) in which they reported that only 22.8% of veterinary students wanted to be an academician, and Çetkin et al. (2016) in which they showed that only 6.5% of medical students wanted to continue postgraduate study in basic sciences. In the present study, while $\frac{1}{4}$ of the students would like to do doctorate in physiology, the number of students who have sufficient knowledge about postgraduate physiology education is very low. It is thought that this situation may be solved by meeting the deficit of existing specialists and academic staff, especially in basic sciences. Therefore, we believe that it is necessary to raise awareness, in the students, of postgraduate veterinary physiology education through activities such as seminars.

As understandable from Table 6, some attitudes and behaviors of students towards the physiology course differed according to gender, GPA and the status of course repetition. Students who are female or have higher GPA or have taken the course one time were more interested and enjoyed in studying physiology, and they have less difficulties learning physiology than the others in terms of the mean scores of responses. They have also stated that they would attend the class even if it were optional. The effect of gender may be related to the fact that women are better than men in verbal memory/ability (Karaçay, 2013) and regular studying habits (Batyra, 2017). Additionally, hardworking students have generally high GPA and can complete the courses successfully at once. On the other hand, the students who had low GPA or taken the course more than once thought that physiology was based on memorization. Students, in some previous studies reported by Michael (2007) and Kunt (2014), have also declared that "physiology" and "anatomy and physiology" courses, respectively, was based on memorization, so they have had difficulties learning them. Therefore, it is clearly understood that it is necessary to employ different educational methods which enable students to learn, by understanding rather than memorization, and enjoy physiology.

According to the 83.7% of the students, the physiology course is necessary for the education of veterinary medicine. Besides, more than half of them declared that theoretical and practical issues satisfied their expectations. On the other hand, the rate of students, who consider their physiology knowledge is sufficient (35.6%) or unsure of their physiology knowledge (35.6%), indicated that students forget what they learned after passing the course. To solve this problem, students may be advised to devote a little more time to study physiology, and instructors may be advised to use new teaching techniques such as "concept maps" (Diwakar et al., 2007) and "case-based or guided practices" (García-Vázquez et al., 2018; McFee et al., 2018) in the education process for knowledge to be permanent.

In conclusion, in this study, it was revealed that most of the students considered the physiology course as one of the basic courses required for veterinary medicine education. Also, they preferred visual education for this course which satisfied the expectations of them and few of them cared about the course that would prefer postgraduate education. Since physiology provides information about homeostatic mechanism, we thought that the students become aware of the course how it is essential for veterinary medicine. Because they realized that disruption of homeostatic balance causes diseases as they take vocational courses. Furthermore, Students' preference for graduate education in physiology can be related with finding the course interesting and enjoyable for the same

reason. Considering that homeostatic mechanisms are protected by the cooperation of many physiological systems, it is also expected that the relations between systems are more understandable when they teach visual techniques and practices. These findings showed that it may be beneficial to add different teaching techniques to veterinary physiology education in order to increase interest in physiology course and to ensure permanent learning so that interest in postgraduate education should be increased.

References

- Batrya A, Türkiye’de Cinsiyete Dayalı Başarı Farkı. Uluslararası Öğrenci Değerlendirme Programı (PISA) Bulguları 2015, Eğitim Reformu Girişimi, Vakfı ADPlace, Eğitim Reformu Girişimi, Vakfı AD. 2017; 27.
- Boud D. Moving towards autonomy. Boud D ed. In: Developing Student Autonomy in Learning. London: Kogan Routledge, 1998; pp. 17-39.
- Brandt RS. Powerful Learning. Association for Supervision and Curriculum Development (ASCD), 1998; p. 15.
- Çetkin M, Turhan B, Bahşi İ, Kervancıoğlu P. Tıp fakültesi öğrencilerinin anatomi eğitimi hakkındaki düşünceleri. Gaziantep Med J 2016; 22(2): 82-8.
- Çevik-Demirkan A, Akalan MA, Özdemir V, Akosman MS, Türkmenoğlu İ. Investigating the effects of veterinary medicine students’ learning by using the real skeleton models on anatomy theoretical and practical lessons. Kocatepe Vet J 2016; 9(4): 266-72.
- Diwakar V, Ertmer PA, Nour AY. Helping students learn veterinary physiology through the use of concept maps. J Vet Med Educ 2007; 34(5): 652-7.
- Ekerbicer N, Rahman S, Elbi H. Tıp fakültesinde fizyoloji eğitimi hakkında öğrenci görüşlerinin değerlendirilmesi. Dokuzuncu Tıp Eğitimi Kongresi. Mart, 21-23, 2016; İzmir-Türkiye.
- García-Vázquez FA, Romar R, Gadea J, Matás C, Coy P, Ruiz S. Physiology learning for veterinary students: Impact of guided practices on students’ opinion and physiological parameters. Adv Physiol Educ 2018; 42(2): 215-24.
- Gözil R, Özkan S, Bahçelioğlu M, Kadioğlu D, Çalgüner E, Öktem H, Şenol E, Mutlu M, Kürkçüoğlu A, Yücel D. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 2. sınıf öğrencilerinin anatomi eğitimini değerlendirmeleri. Tıp Eğitimi Dünyası 2006; 23(23): 27-32.
- Karaçay B. Erkek beyni kadın beyni. Bilim ve Teknik 2013; 46(543): 22-8.
- Karasar N. Bilimsel Araştırma Yöntemi: Kavramlar-İlkeler-Teknikler. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2019.
- Kunt H. Eğitim fakültesi öğrencilerinin insan anatomisi ve fizyolojisi dersi eğitimi üzerine görüşlerinin belirlenmesi. Eğitimde Kuram ve Uygul 2014; 10 (2): 408-23.
- Küçükaslan Ö, Bulut İ. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesinin öğrenci profili üzerine bir araştırma. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2019; 12(1): 1-6.
- Lewis MJ. Computer-assisted learning for teaching anatomy and physiology in subjects allied to medicine. Med Teach 2003; 25(2): 204-7.
- McFee RM, Cupp AS, Wood JR. Use of case-based or hands-on laboratory exercises with physiology lectures improves knowledge retention, but veterinary medicine students prefer case-based activities. Adv Physiol Educ 2018; 42(2): 182-91.
- Michael J. What makes physiology hard for students to learn? Results of a faculty survey. Adv Physiol Educ 2007; 31(1): 34-40.
- Otağ İ, Otağ A. İnsan anatomisi ve fizyolojisi eğitimi üzerine öğrenci görüşleri. Cumhuriyet J Educ 2013; 2(3): 39-45.
- Pal M, Datta S, Pradhan AK, Chowdhuri KM, Ghosh J, Rahut R. Biyokimya dersindeki başarıyı arttırmak için kullanılan değişik öğretim yöntemlerinin karşılaştırılması. TAF Prev Med Bull 2014; 13 (4): 281-8.
- Razon N. Okul Başarisini Etkileyen Faktörler. <https://www.ekipnormarazon.com/makalelerimiz/okul-ve-cocuk/okul-basarisini-etkileyen-faktorler/>; Accessed Dated:18.08.2020.
- Sarikaya T, Khorshid L. Üniversite öğrencilerinin meslek seçiminini etkileyen etmenlerin incelenmesi: Üniversite öğrencilerinin meslek seçimi. J Turkish Sci Educ 2009; 7(2): 393-423.
- Sifton AJ. Charting a global future for education in physiology. Adv Physiol Educ 2005; 29(4): 189-93.
- Sindel M, Şenol Y, Gürpınar E. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinde anatomi eğitiminin öğrenciler tarafından değerlendirilmesi. Tıp Eğitimi Dünyası 2008; 28(28): 31-6.
- Tümkiye S, Bal L. Çukurova üniversitesi öğrencilerinin ders çalışma alışkanlıklarının bazı değişkenler açısından incelenmesi. ÇÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi 2006; 15(2): 313-26.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
17(3), 275-282, 2020
DOI: 10.32707/ercivet.828802

Deneyel Etilen Glikol Zehirlenmesi Oluşturulan Ratlarda Myokardiyal Etkilerin Araştırılması***

Burak DOĞAN¹, Vehbi GÜNEŞ^{2,3}

¹Tarım İl Müdürlüğü, Sivas-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Kayseri-TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi, Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM), Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Vehbi GÜNEŞ; E-posta: vgunes@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000 0002 4047 4409

Atif yapmak için: Doğan B, Güneş V. Deneyel etilen glikol zehirlenmesi oluşturulan ratlarda myokardiyal etkilerin araştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3):275-282.

Özet: Bu çalışmada etilen glikol (EG) toksikasyonunun ratlarda kalp kası üzerindeki muhtemel etkilerinin araştırılması amaçlandı. Sprague Dawley cinsi 30 adet erkek ve dişi rat çalışma materyalini oluşturdu. Tüm ratlar rastgele eşit sayıda üç gruba ayrıldı. Birinci ve ikinci gruba gastrik gavaj ile EG (%99.5 saflıkta) verilmek suretiyle akut toksikasyon oluşturuldu. Birinci gruba 3 ml/kg EG serum fizyolojikle (SF) sulandırılarak verilirken, ikinci gruba 6 ml/kg EG verildi. Üçüncü gruba ise kontrol amacıyla yalnız SF verildi. Kan örnekleri 0 ve 72. ve 96. saattlerde kuyruk venasından alındı. Toksikasyonun klinik belirtileri görülen ratlardan EKG kayıtları alındı. İdrar sediment muayenesinde Ca-oksalat kristalleri tespit edildi. Ayrıca deneme sonunda nekropsi yapılarak ratların kalpleri histopatolojik analizler için alındı. Ortalama kan üre (BUN), laktat dehidrogenaz (LDH), glukoz ve kreatinin düzeylerinin toksikasyon oluşturulan ratlarda önemli oranda arttığı, kalsiyum düzeylerinin ise azaldığı görüldü. Ortalama kardiyak troponin T (cTn-T) ve kreatin-kinaz myokardiyal band (CK-MB) seviyelerinin toksikasyon oluşturulan gruplarda 0. saatler ve kontrol grubuna göre yüksek olduğu görüldü. Ancak cTn-I seviyelerinde ise bir farklılık belirlenmedi. İdrar analizlerinde Ca-oksalat kristalleri belirlendi. Nekropsi bulgularında; epikardiyal kanama ve histopatolojide; nekroz alanlarını çevreleyen mononükleer hücreler, subendokard bölgesinde hücrel infiltrasyon odakları, dejenerasyon ve interstisyel ödem saptandı. Bu çalışmada verilen doza bağlı olarak elektrokardiyografi (EKG), biyokimya ve histopatoloji bulgularında önemli değişikliklerin görülmesi nedeniyle, EG zehirlenmesinde toksik miyokardiyal hasarının oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Ca-oksalat, etilen glikol, miyokard, rat, toksikasyon

Investigation of Myocardial Effects in Rats Subjected to Experimental Ethylene Glycol Toxicity

Summary: The aim of this study was to investigate possible effects of experimental ethylene glycol (EG) toxication on the heart muscle in rats. Thirty male and female rats of Sprague Dawley formed the study material. All rats were randomly divided into three groups and gastric gavage method were used for the experimental toxication with EG (99.5% purity). 3 ml/kg EG diluted with saline (Serum Physiologic, SF) was given to the first group and 6 ml/kg EG diluted with SF to the second group, only SF same volume with EG was given to third group as control. Blood samples were taken from the tail vein at the 0 (before EG application) and 72th hour and at the 96th hour after EG application. ECG measurements were performed to the rats showing clinical symptoms of the toxication. ECG recordings were obtained from rats with clinical signs of toxicity. Urine samples were taken and their sediments were analyzed. In addition, necropsy was performed at post experiment and the hearts of the rats were taken for cardiac histopathology. In biochemical analyzes, it was observed that blood urea (BUN), lactate dehydrogenase (LDH), glucose and creatinine levels increased and calcium levels decreased significantly. Mean cardiac troponin T (cTnT) and creatine-kinase myocardial band (CK-MB) levels were found to be different in groups that formed toxicity compared to control group. However, there was no difference in cTn-I levels. In addition, Ca-oxalate crystals were detected in urine analysis. In necropsy, epicardial bleeding and in histopathology mononuclear cells surrounding the necrosis areas, cellular infiltration foci in the subendocardium, degeneration and interstitial edema were detected. In the light of the findings obtained in this study, electrocardiography (ECG) and histopathological findings showed that a toxic myocardial injury also occurred in EG poisoning.

Key words: Ca-oxalate, ethylene glycol, myocardium, rat, toxication

Giriş

İnsanların ihtiyaçları için üretilen bazı kimyasal mad-

delerin bilinçsizce kullanılması çevreyi, insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. Bu kimyasal maddelerden birisi buz çözücü olarak kullanılan ve EG içeren antifiriz solüsyonlarıdır. Antifirizin insanlar tarafından kazara ya da bilerek içilmesi ile hayvanlarda ise çevreye atılan antifirizin yalanması veya içilmesi ile çoğunlukla akut zehirlenmelere neden olur. İçerisinde bulunan konsantrite EG (>%90) ile doğrudan temas eden ve bu maddeyi özellikle oral yolla alan kedi,

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.08.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 29.09.2020

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2018-8340 nolu proje kodu ile desteklenmiştir.

**Bu çalışma 06-08 Ağustos 2019 tarihleri arasında Prag/ÇEKYA'da düzenlenen "X. Uluslararası Multidisipliner Avrasya Kongresinde" sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

köpek, ruminant ve kanatlılarda EG zehirlenmelerine sıklıkla rastlanılmaktadır (Çelebi ve ark., 1999; Güneş, 1999; Thrall ve ark. 2008). Oral yolla alınan EG, sindirim sisteminden emildikten 2-3 saat sonra kanda en yüksek düzeylere ulaşmaktadır. Daha sonra karaciğer tarafından karbondioksit ve suya kadar parçalanır. Alkol dehidrogenaz enzimi yardımı ile glikolik asite metabolize edilerek bir kısmı da değişikliğe uğramadan böbrekler tarafından atılmaktadır (Thrall ve ark., 2008). Toksikasyona maruz kalan hayvanlarda klinik bulgular; genellikle ataksi ve koma gibi merkezi sinir sistemi (MSS) depresyonu, kusmanın görüldüğü gastrointestinal sistem (GIS) ve tubuler nekroze bağlı böbreklerin fonksiyon bozuklukları ile karakterizedir. Toksikasyonun prognozu, EG alındıktan sonra geçen süreye ve EG'ün dozuna bağlı olarak değişebilmekte, erken müdahale edilmediğinde ise çoğunlukla ölümlü sonuçlanmaktadır (Alkan ve ark., 1995). İnsan ve hayvanlarda EG'ün Ca-oksalat kristallerinin başlıca proksimal tubüllerde meydana getirdiği tahribata bağlı akut nöbrek yetmezliğinin yanısıra anyon gap metabolik asidozis ve MSS bozuklukları gelişebilmektedir. Ca-oksalat depolanması ise tetani ve nöbetlerle seyreden hipokalsemiye neden olabilir (Ng ve ark., 2018; Kraut ve Mullins 2018). Zehirlenme sonucunda etkilenebilecek bir diğer sistem de kardiyovasküler sistemdir. Kardiyopulmoner toksisiteye ve EKG'de QT aralığında uzama, ST segment yüksekliği gibi bazı etkilerin gelişebildiği belirtilmesine rağmen, EG'ün farklı dozlarda kalp kası hasarı ve dolaşım sisteminde yaptığı etkiler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Güneş, 1999; Cavender, 2012, Dibajnia ve ark., 2020). Sonuç olarak EG zehirlenmelerinde oluşabilecek kardiyolojik değişikliklerin gerçek patogenezi ve oluşum mekanizmalarının açıklanmasına klinik olgulara doğru yaklaşım açısından ihtiyaç bulunmaktadır. Antifriz zehirlenmesi sonrası deney hayvanlarında, kalp kası hasarı oluşumunun histopatolojik bulgular ile kalp kası biyobelirteçleri düzeylerinin (cTnI, cTnT ve CK-MB) ve EKG parametrelerinin akut zehirlenmelerin prognozu ve patogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle EG zehirlenmelerinde daha az bilinen muhtemel miyokardiyal etkilerin araştırılması bu çalışmada amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM) bünyesinde yer alan çalışma ünitelerinde yürütüldü. Hayvanlar, "Deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair yönetmeliğe" uygun olarak barındırıldı. Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun çalışma izni ile (Tarih:13.04.2016 Karar No:16/075) çalışmanın yürütülmesi onaylandı.

Çalışmada sağlıklı, 12 haftalık *Sprague Dawley* cinsi ratlar kullanıldı. Hayvanlar merkezi havalandırma

sistemi bulunan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık bir fotoperiyot sağlanan, %40-%60 nisbi nem oranına ve 20-23°C oda sıcaklığına sahip çalışma odasında barındırıldı. Her bir rat paslanmaz çelik tel kapaklı polikarbon konvansiyonel kafeslere bireysel olarak yerleştirildi. On beş erkek ve 15 dişi toplam 30 adet rat her grupta 10 adet rat olacak şekilde rastgele 3 gruba ayrıldı. *Ad libitum* standart rat yemi ile besleme yapıldı. Bireysel polikarbon suluklarda *ad libitum* musluk suyu almaları sağlandı. Çalışmada kullanılan ratların ortalama ağırlıkları Grup I'de 328.5±39.4 gr Grup II'de 492.72±28.9 gr; Grup III'de 393.00±28.05 gr. idi. Ortalama yaşları; Grup I'de 4.00±0.33 Grup II'de 5.45±0.28 Grup III'de 4.9±0.34 ay idi.

Birinci gruba (Grup I) 3 ml/kg, ikinci gruba (Grup II) 6 ml/kg SF ile sulandırılarak gastrik gavaj yöntemi ile medikal %99.5 saflıkta EG (Zag Kimya, Türkiye) verilerek deneysel akut toksikasyon oluşturulması sağlandı. Son gruba (Grup III) ise kontrol olarak gastrik gavaj yöntemi ile yaklaşık aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Her gruptaki ratların EG verilmeden önce sağlık kontrolleri yapıldı. Ayrıca SF ve EG verildikten sonraki ilk 5 saat ratlar gözlenmiş, 5. saatten sonra ise her 2 saatte genel fiziksel muayeneler yapılarak gerekli numuneler toplanmış veriler kayıt altına alınmıştır. Çalışmada EG verilmeden önce (0. saat) ve verildikten sonra 72. ve 96. saatlerde kan örnekleri kuyruk veninden toplanmıştır. Daha sonra hayvanlar servikal dislokasyonla ötenazi edilmiş ve nekropsileri gerçekleştirilmiştir.

Gruplardaki ratlardan 0, 72 ve 96. saatlerde biyokimyasal parametreler için alınan kan serumu örneklerinde biyokimyasal analizlerden; glukoz, kan üre (BUN), kreatinin, gamma glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), alanin amino transferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), aspartat amino transferaz (AST), Na, Cl ve K analizleri ile hematolojik parametrelerin analizleri yapılmıştır. Biyokimyasal analizler serum örneklerinde, Randox RX Monaco (Birleşik Krallık) tam otomatik biyokimya cihazında analiz edildi. Kalp kasına özgü biyobelirteçlerdeki değişimleri belirlemek amacıyla elde edilen serum örneklerinde CK-MB ve cTn-T analizleri ERÜ Merkez Biyokimya laboratuvarında hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Kardiyak Tn-I analizleri Sunred Marka ticari Rat ELISA kitleri ile Biotek ELX 800 marka ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda kitin prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hematolojik analizler Exigo (İsveç) marka tam kan sayım cihazında örnek hacimlerindeki yetersizlik nedeniyle yalnız 96. saatte alınan EDTA'lı kan örneklerinde analiz edilmiştir.

Her gruptan rastgele 5'er rattan masaj yöntemi ile yaklaşık 1 ml idrar numuneleri klinik belirtilerin görülmeye başladığı 5. saatten itibaren ependorflara alındı. Bu örnekler, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüje edildikten sonra, idrar sedimentinde mikroskop altında Ca-oksalat kristalleri aranmıştır.

Gruplardan eşit sayıda ve rastgele deneklerden 24 saat sonra bipolar ekstremite derivasyonları yöntemi ile klinik belirti ortaya çıkan ve EG toksikasyonunun etkisi altındaki hayvanlardan EKG kayıtları Carewell 1101g Vet marka EKG cihazında alınmıştır. EKG değerlendirmeleri II. derivasyonlarda yapılmıştır.

Birinci gruptan rastgele seçilen 5 adet ve grup II'de ölen tüm ratlardan 96. saatte anestezi altında servikal dislokasyondan sonra nekropsi altında kalp örnekleri alındı. Örnekler %10'luk tamponlu formalinde tespit edildikten sonra rutin doku takibi işlemleri uygulandı. Mikrotom ile 5–6 mikron kalınlığında seri kesitler alındıktan sonra kesitler Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı. Tüm preparatlar, dijital bir kamera (Olympus DP71) ve mikroskop (BX-51, Olympus) (x10, x40 ve x100 hedefleri kullanılarak en az 4 alan içeren) dijital programlayıcılar (DP Controller ve DP Manager) ile fotoğraflandı.

İstatistiksel analizler

Laboratuvar analizlerinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 13.0 (2000) paket programı ile bilgisayar ortamında yapıldı. Analizler için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Deneme süresince alınan değerleri karşılaştırmak için Dunnett testi, farklı grupların eş zamanlı verilerini karşılaştırmak için Tukey testi uygulandı. Gruplar arası farklılığın ve zamana göre değişimlerin önem derecesi $P < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bulgular

Çalışma gruplarında EG verilmesinden sonra oluşan klinik semptomlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Grup I ve II'de Tablo 1'de belirtildiği gibi EG verildikten sonra çeşitli derecelerde klinik toksikasyona ait klinik belirtiler ortaya konulmuştur. Gruplar arasında verilen EG konsantrasyonuna bağlı olarak sarhoşluk benzeri durum dışında diğer klinik semptomlar Grup I de daha az sayıda ratta gözlenmiştir (Tablo 1). Grup I de 3 rat 23-26. saatler arasında, Grup II de 6 rat 22. saat civarında ölmüştür. Yapılan nekropsilerde ödematöz böbrekler ve akciğerlerde hafif ödem görülmüştür.

Çalışma gruplarının CK-MB, cTn-T, cTn-I değerleri

Tablo 1. Klinik belirtilere göre hayvan sayılarının dağılımı

Semptomlar	Grup I (n=10)	Grup II (n=10)
Sarhoşluk benzeri durum	10	10
Depresyon	7	9
Koma	4	7
Sallantılı yürüyüş	7	10
Poliüri	4	6
Dehidrasyon	5	8
Anoreksi	6	9
Pelvik inkoordinasyon	5	8
Ölüm sayısı	3	6

GI (n=10) (Düşük doz grubu): 3 ml/kg uygulanan grup. GII (n=10) (Yüksek doz grubu): 6 ml/kg uygulanan grup.

Tablo 2'de verilmiştir.

Elde edilen ortalama cTn-T ve CK-MB düzeylerinde kontrol grubunda önemli değişimler görülmedi, fakat EG verilen çalışma gruplarında 72 ve 96. saatlerdeki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Ortalama CK-MB düzeyleri sırasıyla; Grup I'de: 532.75 ± 17.15 IU/L, 688.12 ± 319.09 IU/L, 554.25 ± 112.44 IU/L ve grup II'de 542.66 ± 11.26 IU/L, 587.66 ± 55.44 IU/L, 877.5 ± 27.56 IU/L idi. Ortalama cTnT düzeyleri sırasıyla; grup I'de: 0.040 ± 0.003 ng/ml, 0.155 ± 0.028 ng/ml, 0.866 ± 0.225 ng/ml, ve grup II'de 0.013 ± 0.002 ng/ml, 0.041 ± 0.025 ng/ml, 0.578 ± 0.006 ng/ml idi.

Bununla birlikte ortalama cTn-I seviyelerinin tüm gruplarda EG verildikten sonraki saatlerde istatistiksel açıdan önemli oranda değişmediği ve bu değerlerin birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla; Grup I'de: 0.037 ± 0.003 ng/ml, 0.032 ± 0.003 ng/ml, 0.031 ± 0.002 ng/ml, ve Grup II'de 0.032 ± 0.004 ng/ml, 0.036 ± 0.006 ng/ml, 0.029 ± 0.006 ng/ml idi.

Ortalama cTn-T düzeylerinin 72. ve 96. saatte kontrol grubuna göre çalışma gruplarından önemli düzeyde farklı olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$). Aynı değerler çalışma gruplarında 72. ve 96. saatlerde EG verilmeden önceki düzeylerden de anlamlı oranda yüksek olduğu belirlendi. Ortalama CK-MB düzeyleri ise Grup I'de 96. saatte Grup II'de ise 72. saatte 0. saatten anlamlı düzeyde yüksek olduğu, gruplar arasında ise yine aynı saatlerdeki kontrol grubunun ortalamalarından önemli düzeyde farklı olduğu bulundu. Çalışma gruplarından 96. saat sonunda nekropsi işlemi ile alınan kalp kası örneklerinden elde edilen histopatolojik bulgular örnekleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Bu çalışmada farklı dozlarda EG verilen ratlarda bazı ortak ve yaygın biyokimyasal bulgular da elde edilmiştir. Kalp kası biyobelirteçleri dışında kalsiyum, potasyum, BUN, LDH, kreatinin ve glukoz düzeylerinde gerek gruplar arasında gerekse grup içi 0. saat verilerine göre istatistiksel açıdan birtakım anlamlı değişimler de gözlemlendi (Tablo 3). Etilen glikol verilen heriki grupta hipokalsemi, hiperkalemi gözlenirken, BUN ve kreatinin düzeylerinde kontrol grubuna göre ve EG verilmeden önceki değerlere göre istatistiksel açıdan önemli

Tablo 2. Gruplardaki ortalama kardiyak biyobelirteç düzeyleri ve istatistiksel karşılaştırmaları

Parametreler	Gruplar	n*	Toksikasyon Saatleri		
			0. X±Sh	72. X±Sh	96. X±Sh
CK-MB (IU/L)	Grup I	7	532.75±17.15 Aa	688.12±319.09 Ba	554.25±112.44 Ba
	Grup II	4	542.66±11.26 Aa	587.66±55.44 Aa	877.5±27.56 Ab
	Grup III	10	609±7.45 Aa	560±5.77 Ab	567.5±12.29 Bb
cTnT (ng/mL)	Grup I	7	0.040±0.003 Aa	0.155±0.028 Bb	0.866±0.225 Ac
	Grup II	4	0.013±0.002 Aa	0.041±0.025 Aa	0.578±0.006 Ab
	Grup III	10	0.031±0.003 Aa	0.019±0.001 Cb	0.068±0.004 Bc
cTnI (ng/mL)	Grup I	7	0.037±0.003 Aa	0.032±0.003 Aa	0.031±0.002 Aa
	Grup II	4	0.032±0.004 Aa	0.036±0.006 Aa	0.029±0.006 Aa
	Grup III	10	0.028±0.002 Ba	0.047±0.005 Bb	0.037±0.005 Ab

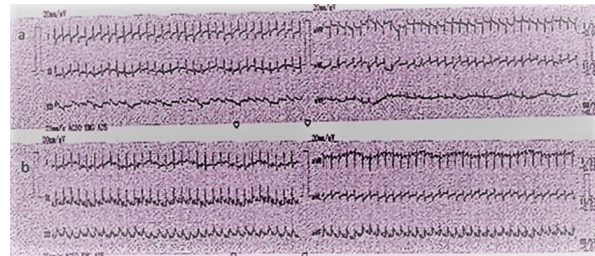
GI (n=10) (Düşük doz grubu): 3 ml/kg uygulanan grup. GII (n=10) (Yüksek doz grubu): 6 ml/kg uygulanan grup. GIII (n=10) (Kontrol grubu): Diğerleriyle aynı hacimde SF uygulanan grup *Büyük harfler (A.B.C) gruplar arası saatlerdeki farkı, küçük harfler (a.b.c) aynı grup içerisindeki farklı saatler arası farkı ifade etmektedir. (*n sayıları 72. ve 96. saatlerde hayatta kalan rat sayılarına göre verilmiştir).

oranda ($P<0.05$) artışlar izlenmiştir. Ortalama BUN düzeyleri sırasıyla; Grup I'de: 45 ± 1.55 mg/dl, 278.75 ± 7.75 mg/dl, 385.33 ± 132.80 mg/dl, ve Grup II'de 25.6 ± 0.62 mg/dl, 90 ± 0.57 mg/dl, 93 ± 21 mg/dl idi. Ortalama kreatinin düzeyleri sırasıyla; Grup I'de: 1.60 ± 0.62 mg/dl, 2.24 ± 0.04 mg/dl, 3.65 ± 1.21 mg/dl, ve Grup II'de 0.76 ± 0.02 mg/dl, 1.75 ± 0.28 mg/dl, 1.64 ± 0.21 mg/dl olduğu belirlendi. Grup I ve II'de ortalama glukoz düzeyleri EG verilmesinden sonra önemli oranda artmıştır ($P<0.05$). Ortalama glukoz düzeyleri sırasıyla; Grup I'de: 138.67 ± 8.7 mg/dl, 337.08 ± 14.07 mg/dl, 223.05 ± 42.37 mg/dl, ve Grup II'de 118.59 ± 4.49 mg/dl, 159.58 ± 0.24 mg/dl, 213.01 ± 13.53 mg/dl olduğu belirlendi (Tablo 3).

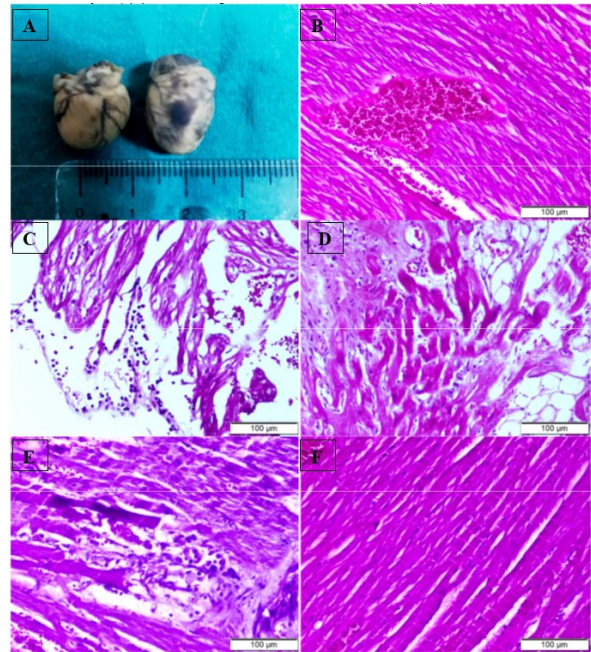
Hematolojik analiz bulgularında kontrol grubu ve çalışma gruplarından elde edilen örneklerde istatistiksel açıdan herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

EKG kayıtlarının II. derivasyon bulgularına göre yapılan analizlerde, Pamp (mV), PR (sn), T (mV) ve ST (sn) değerlerinde grup I ve II arasında farklılıklar belirlendi ($p<0.05$). Grup II'deki bu değerlerin sırasıyla; 0.15 ± 0.02 mV, 0.07 ± 0.01 sn, 0.12 ± 0.02 mV ve 0.06 ± 0.02 sn olduğu ve anlamlı oranda Grup I'den daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 4). EKG yorumlamasında genel olarak Grup I ratlarında ortalama 2 mm ST elevasyonu; Grup II ratlarda bazı vakalarda ise ST değişiklikleri ve bir hayvanda akut koroner sendrom benzeri tablo görülmüştür (Şekil 1).

Grup I ve Grup II ratlarına ait iki adet EKG örnekleri Şekil 1'de verilmiştir. Grup I ratlarında yapılan makroskopik muayenede epikardiyal kanama gözlemlendi. Ayrıca kalp kasında nekroz alanlarını çevreleyen mononükleer hücreler subendokard bölgesinde hücreli infiltrasyon odakları, dejenerasyon, interstisyel ödem saptandı (Şekil 2A-D). Grup II ratlarda ise hafif mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 2E). Kontrol grubunu oluşturan ratlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 2F).



Şekil 1. Grup I ve Grup II'deki ratlara ait EKG örnekleri (25 mm/sn ve 20 mm/mV)
a. Grup I, I, II, aVR ve aVL derivasyonlarında ST yükselmesi örneği
b. Grup II, akut koroner sendrom örneği



Şekil 2. Rat, Kalp Biyopsi. (Hematoksilen-Eosin boyama x100). (A-D) Yüksek doz grubu, (A-B) Kalp kasında kanama, (C) Kalp kasında interstisyel ödem, dejenerasyon, yangısal hücre infiltrasyonu, (E) Düşük doz grubunda mononükleer hücreler. (F) Kontrol

Tablo 3. Gruplardaki ortalama biyokimyasal parametreler

Parametreler	Gruplar	n*	Toksikasyon Saatleri		
			0. X±Sh	72. X±Sh	96. X±Sh
BUN (mg/dL)	Grup I	7	45±1.55 Aa	278.75±7.75 Ab	385.33±132.80 Bb
	Grup II	4	25.6±0.62 Aa	90±0.57Ab	93±21 Ab
	Grup III	10	49.9±0.18 Ba	45.6±0.98 Ab	49.55±1.36 Aa
LDH (U/L)	Grup I	7	1404.4±111 Aa	3340.55±373.95 Ba	1278.08±215.87 Aa
	Grup II	4	1420.12±72.79 Aa	1810.4±28 Aa	1916.4±302.3 Ab
	Grup III	10	1370.37±66.09 Aa	1404.93±54.80 Aa	1459±42 Aa
GGT (U/L)	Grup I	7	8.167±5.4 Aa	3±1.53 Ba	22±6.40 Ba
	Grup II	4	2.5±0.29 Aa	1.5±0.2 Ab	1±0.05 Ab
	Grup III	10	1.75±0.36 Aa	2±0.28 Aa	1.5±0.16 Aa
GLUKOZ (mg/dL)	Grup I	7	138.67±8.7 Aa	337.08±14.07 Ab	223.05±42.37 Ab
	Grup II	4	118.59±4.49 Aa	159.58±0.24 Ab	213.01±13.53Ac
	Grup III	10	124.89±20.31 Aa	115.66±5.33 Ba	138.52±29.29 Ba
KREATİNİN (mg/dL)	Grup I	7	1.60±0.62 Aa	2.24±0.04 Bb	3.65±1.21 Aa
	Grup II	4	0.76±0.02 Aa	1.75±0.28 Ab	1.64±0.21 Ab
	Grup III	10	1.18±0.12 Aa	0.71±0.03 Bb	0.84±0.11 Bb
KALSİYUM (mg/dL)	Grup I	7	10.65±0.46 Aa	9.63±0.73 Aa	7.65±1.08 Ab
	Grup II	4	11.64±0.35 Aa	10.58±1.65 Ab	8.92±1.52 Ab
	Grup III	10	11.56±0.44 Aa	11.37±0.43 Ba	10.32±0.06 Bb
ALT (U/L)	Grup I	7	107.84±15.65Ba	89.3±5.87 Aa	165.85±58.55 Aa
	Grup II	4	68.85±2.24 Aa	88.3±3.64 Aa	59.36±19.26 Aa
	Grup III	10	69.05±5.81 Aa	74.18±0.80 Aa	69.64±4.37 Aa
AST (U/L)	Grup I	7	159.98±21.75 Aa	460.1±92.9 Bb	319.71±81.40 Bb
	Grup II	4	119.45±12.33 Aa	180.4±9.66 Ab	113.2±7.9 Aa
	Grup III	10	121.84±4.48 Aa	141.5±4.71 Ab	153.71±12.49 Cb
ALP (U/L)	Grup I	7	227±19.61 Aa	267.25±23.75 Ba	345.83±55.41 Ba
	Grup II	4	210.33±27.44 Aa	118±11.32 Ab	158±41 Aa
	Grup III	10	215.33±33.12 Aa	291.22±5.74 Bb	219.6±17.69 Ca
Na (mEq/l)	Grup I	7	163±12.35 Ba	180±11 Ba	136±9.55 Ba
	Grup II	4	156.5±2.02 Aa	147.5±7.5 Aa	151±7 Aa
	Grup III	10	145±9.6 Ba	150±12.3 Ba	140±7.68 Ba
K (mEq/l)	Grup I	7	7.1±0.8 Ba	8.3±0.7 Bb	7.2±0.56 Ba
	Grup II	4	6.56±0.29 Aa	5.83±0.28 Aa	6±0.3 Aa
	Grup III	10	5.9±0.4 Ca	5.8±0.5 Ba	5±0.3 Ca
Cl (mEq/l)	Grup I	7	125±4.7 Ba	127±5.4 Ba	91±6 Ba
	Grup II	4	116.33±1.476 Aa	112.33±3.84 Aa	116.66±4.33 Aa
	Grup III	10	107±6.9 Ca	110±8.6 Ba	100±9.1 Cb

GI (n=10) (Düşük doz grubu): 3 ml/kg uygulanan grup. GII (n=10) (Yüksek doz grubu): 6 ml/kg uygulanan grup. GIII (n=10) (Kontrol grubu): Diğerleriyle aynı hacimde SF uygulanan grup *Büyük harfler(A.B.C) gruplar arası aynı saatlerdeki farkı, küçük harfler (a.b.c) aynı grup içerisindeki farklı saatler arası farkı ifade etmektedir. (*n sayıları 72. ve 96. saatlerde hayatta kalan rat sayılarına göre verilmiştir) .

Tablo 4. EKG kayıtlarında II. derivasyon bulguları (25 mm/sn ve 20mm/mV)

Gruplar	EKG Parametreleri					
	Pamp (mV)	PR (sn)	R (mV)	QRS (sn)	T (mV)	ST (sn)
Grup I (n=5)	0.11±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.7±0.1	0.04±0.01	0.08±0.01 ^a	1.0±0.1 ^a
Grup II (n=5)	0.15±0.02 ^b	0.07±0.01 ^b	0.73±0.08	0.04±0.01	0.12±0.02 ^b	0.06±0.02 ^b

Pamp: P dalga yüksekliği, PR: PR aralığı, R: R dalga yüksekliği, QRS: QRS aralığı, T: T dalga yüksekliği, ST: ST aralığı, a,b: farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir (P<0.05).

Tartışma ve Sonuç

Antifiriz ya da EG zehirlenmelerine bağılı bazı vaka ve deneysel kontrollü çalışmalarında, diğer sistemlerdeki değişikliklerle birlikte kardiyovasküler bozuklukların da oluşabildiği belirtilmektedir (Cavender, 2012; Sarıtaş ve ark., 2015, Dibajnia ve ark. 2020). Bununla birlikte, böbrek fonksiyonları ve MSS etkileri detaylı belirlenmesine rağmen kardiyolojik etkiler tam olarak ortaya konulmamıştır (Kim ve ark., 2010). Bazı vaka raporlarında tekrarlayan kardiyak aritmiler ve şokun gelişebildiği, miyokarditisin görülebildiği rapor edilmiştir (Dibajnia ve ark. 2020). Ayrıca EG'ün akut alımını takiben ölen kişilerde yapılan otopside miyokardit tablosu da gözlenen bulgulardan bir diğeridir (Friedman ve ark. 1962). Bu çalışmada EG ile deneysel oluşturulan muhtemel kardiyak hasarın göstergesi olabilecek CK-MB ve kardiyak troponin düzeylerinde bir takım değişimler belirlenmiştir. Bu biyokimyasal değişiklikler histopatoloji ve EKG bulgularıyla doğrulanmıştır.

Ratlarda CK ve LDH enzimlerinin erken dönem miyokard hasarının tespiti için çok belirleyici olmadıkları belirtilmektedir. Kardiyak troponinler-I (cTnI) ve -T (cTnT)'in ise yüksek duyarlılığa sahip oldukları ve miyokard hücre hasarının spesifik belirteçleri oldukları gösterilmiştir (Adams 3rd ve ark., 1993; Burlina ve ark., 1994). Son araştırmalar insana özgü cTnI ve cTnT'nin çeşitli hayvan türlerine ait cTn ile çapraz reaktivitesini ortaya koymuştur (Katus ve ark., 1992; O'Brien ve ark., 1997a,b). Fakat farklı dozlarda EG zehirlenmesine maruz bırakılan ratlarda cTnI ve

cTnT'de gözlenen artışlar olup olmadığı ve bu kardiyak parametrelerin EG toksikasyon modelinde sıçan kalplerinde histolojik bulgular arasındaki ilişki hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. İzoprenalin verilen ratlarda, cTnI ve cTnT seviyelerinin erken dönemde yükseldiği tesbit edilmiş ve benzer şekilde, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında izoprenalin enjeksiyonundan 24 saat sonra cTnT'nin daha yüksek anlamlılık düzeyinde daha uzun süre arttığı gösterilmiştir (Bertsch ve ark., 1997). Bu sonuçlar, cTnI ile karşılaştırıldığında cTnT'nin daha uzun bir süre ile kan serumunda yüksek düzeylerde kaldığını bildiren insanlardaki cTnT ve cTnI kinetiği ile uyumlu bulunmuştur (Mair, 1997). Bu çalışmadan elde edilen cTnI ve cTnT düzeyleri değerlendirildiğinde, EG verildikten sonra 72 ve 96. saatlerde cTnT düzeyleri çalışma gruplarında zamana bağılı bir artış göstermiş, fakat cTnI düzeylerinin çalışma süresince tüm gruplarda değişmediği belirlenmiştir. Çalışmanın cTnT bulgularının, Bertsch ve ark. (1997) tarafından yapılan ve 24 saat sonraki cTnT sonuçlarının kontrol grubuna göre cTnI'dan daha yüksek olduğunu belirledikleri çalışmanın bulgularıyla uyumludur. Zira çalışma gruplarında cTnI sonuçlarının değişmediği 72. ve 96. saatlerdeki düzeylerin hem 0. saate göre hem de kontrol grubunun aynı saatlerdeki düzeylerinden anlamlı oranda

yüksek olması nedeniyle aynı yargıya varılmıştır. Elde edilen özellikle cTnT verilerinin, miyokard hasarlarının CK-MB salınımına yol açmasa dahi troponin düzeylerindeki yükselmelerin hassas olduğunu belirten klinik raporlardan elde edilen bulgularla iyi bir uyum içinde olduğu görülmüştür (Adams ve ark., 1993; Burlina ve ark., 1994; Gerhardt ve ark., 1991; Hamm ve ark., 1992; Wu ve ark., 1995). Her iki gruptan alınan EKG bulguları ile bu değişiklikler de doğrulanmıştır. Kreatin kinaz (MB)'deki farklılığın ise muhtemelen mikroinfarktüsün saptanmasındaki CK duyarlılığının ve özgünlüğünün azalmasından kaynaklanmaktadır. cTnI normalde kan dolaşımında yok denecek kadar az olduğu ve miyokardiyumda da ağırlık bazında CK-MB 'den daha fazla olduğu için, cTnI çok düşük düzeylerdeki kardiyak nekrozun saptanması için çok daha uygundur (Antman ve ark., 1996). Nitekim Bleuel ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi kullanılan ratlarda kontrollele karşılaştırıldığında EG verilmiş sıçanlarda CK'da anlamlı bir artış bulunmamıştır. Normal CK-MB ile birlikte veya yalnız başına kardiyak troponinlerin yükselmesi, hafif derecede veya en düşük dereceli miyokardiyal hasarı yansıtabilir (Imazio ve Trinchero, 2007). Ayrıca diğer parametrelerden, CK-MB izoenzimi, mutlak kalbe özgü bir belirteç değildir (Adams ve ark., 1993) ve iskelet kası yaralanması var ise hayvanlarda etkisiz olabilir (O'Brien ve ark., 1997b). Ayrıca, plazmadaki CK-MB'nin etkinliği, bir türden diğerine göre farklılık gösterir. Çalışmamızda CK-MB bulguları Grup I'de 72 ve 96. saatlerde zehirlenme öncesine göre artış göstermesi anlamlı olmakla birlikte daha yüksek doza maruz kalan Grup II de ise sadece 72. saat düzeyinin aynı grubun diğer saatlerde alınan değerlerinden yüksek olması CK (MB) aktivitelerinin kalp kası hasarlarında değerlendirilmesini sınırlandırabilir.

Çalışma gruplarındaki ratlarda yapılan genel nekropsisi değerlendirilmesinde elde edilen bulgular ölen iki adet hayvanda makroskobik açıdan kalp kasında epikardiyal kanamalar ve solgun böbrekler tarzında gelişen bulgular bir vaka raporu ile benzerlik göstermektedir. Bu raporda ölen bir erkek zehirlenme vaka-sında nekropsisi yapılmış ve histopatoloji bulgularında kalpte -coronaro-myocardiosclerosis belirlenmiştir (Judea-Pusta ve ark., 2018). Bu çalışmada, deneyin sonlandırıldığı 96. saatte alınan kalp örneklerinde bir takım değişikliklerin oluşabildiği gözlenmiştir. Bu değişiklikler, yüksek dozda EG verilen ratlarda intersitisyel ödem, dejenerasyon, sub-endokard bölgesinde hücrel infiltrasyon, nekroz alanlarını çevreleyen mononükleer hücreler; düşük doz grubu ratlarda ise hafif mononükleer hücre infiltrasyonu olarak gözlenmiştir. Çalışma gruplarındaki histopatolojik ve kalp kasına özgü biyokimyasal parametrelerdeki değişimler, EKG kayıtlarında elde edilen ST segmenti yükselmesi ve akut koroner sendrom nedeniyle EG toksikasyonunun ratlarda kalp kasında bir hasar oluştur-

duğunun delilleri olarak değerlendirilmiştir. Bu bulguları destekler özellikle, Dibajnia ve ark. (2020) tarafından rapor edilen vaka raporunda, 37 yaşında EG zehirlenmesine maruz kalan bir hasta da cTnI düzeyinde yükselme ve koroner kalp yetmezliğine ait herhangi bir bulgu olmamasına rağmen, EG alımından 87 saat sonra EKG bulgularında I., aVL ve aVR derivasyonlarında ST segmenti yükselmesi belirlenmiştir.

Bu çalışmada CK-MB ve cTnT'nin, sıçanlarda EG kaynaklı taşikardi sonrası miyokard hasarı teshisinde, geleneksel cTnI, CK ve LDH biyobelirteçlerine göre daha önemli biyobelirteçler olduğu gözlenmiştir. Ortalama cTnT düzeyleri ve CK-MB aktivitelerindeki yükselmeler ile histopatolojik bulgular arasındaki ilişkinin analizi, bilhassa artan cTnT düzeyi ile miyofibriller dejenerasyonunun derecesi arasında iyi bir uyumluluk olduğunu ortaya koydu. Bununla birlikte, analizlerin çeşitli troponin-I ve T formlarına verdiği tepkiler nedeniyle cTnI ve cTnT analizleriyle elde edilen mutlak değerlerde farklılıklar vardı. Biyokimyasal parametrelerden CK-MB, cTnT ile EKG ve histopatolojik bulgular ışığında 6 ml/kg dozda EG verilen ratlarda önemli düzeyde, 3 ml/kg dozda EG verilen ratlarda ise düşük düzeylerde bir toksik myokard hasarının oluşacağı, ölümlerde miyokard hasarının katkısının olabileceği, EG toksikasyonunda hastalara yapılacak monitörizasyonda ve gerçekleştirilecek tedavinin düzenlenmesinde kardiyak hasarın da dikkatle değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak; biyokimyasal kardiyak parametrelerde elde edilen değişimler, histopatoloji bulguları ve EKG sonuçlarına göre, EG zehirlenmesinde oluşan miyokarditisin, hücrel metabolizmaları bozan glikoaldehyt metabolitlerinden kaynaklandığı ve bunların lokal doku hasarına yol açarak belli oranlarda toksik miyokarditise de neden olabileceği kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve kalp dokularının histopatolojik işlemlerini yürüten ve sonuçlarının değerlendirilmesini sağlayan Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Latife ÇAKIR BAYRAM'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Adams3rd JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ledenson JH, Jaffe AS. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101-6.
- Adams3rd JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88: 750-63.

Alkan Z, Seker Y, Kurtdere A, Sarıca A, Bumin A. Köpeklerde deneysel etilen glikol zehirlenmesinde ultrasonografik tanı ve bazı kan parametrelerinde değişiklikler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1995; 42: 473-8.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M. Cardiac specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335 (18): 1342-9.

Bertsch T, Bleuel H, Aufenanger J, Rebel W. Comparison of cardiac troponin T and cardiac troponin I concentrations in peripheral blood during orciprenaline induced tachycardia in rats. *Exp Toxicol Pathol* 1997; 49(6): 467-8.

Bleuel H, Deschl U, Bertsch T, Bolz G, Rebel W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in rats with experimental myocardial damage. *Exp Toxicol Pathol* 1995; 47(2-3): 121-7.

Burlina A, Zaninotto M, Secchiero S, Rubin D, Accorci F. Troponin T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin Biochem* 1994; 27(2): 113-21.

Cavender FL. Glycols, Bingham E, Cohn B, eds. *Patty's Toxicology. Sixth Edition.* New York: John Wiley and Sons, 2012; p. 595.

Çelebi F, Güneş V, Uzun M, Doğan A. Deneysel akut etilen glikol toksikasyonu oluşturulan köpeklerde elektrokardiyogram bulguları ve plazma Na, K, Ca ve Cl düzeyleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 1999; 5(2): 171-8.

Dibajnia P, Sivilotti MLA, Juurlink D, Shurrab M. ST-elevation in ethylene glycol toxicity mimicking myocardial infarction. *J Electrocardiol* 2020; 58: 128-31.

Friedman EA, Greenberg JB, Merrill JP, Dammin GJ. Consequences of ethylene glycol poisoning. *Am J Med* 1962; 32(6): 891-902.

Gerhardt W, Katus HA, Ravkilde J, Hamm C, Jørgensen PJ, Peheim E, Ljungdahl L, Löfdahl P. S-Troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of S-creatin kinase isoenzyme MB. *Clin Chem* 1991; 37(8): 1405-11.

Güneş V, Köpeklerde ethylene glycol ile oluşturulan akut toksikasyonların değişik alkol türevleri ile tedavi denemeleri, Doktora Tezi, Kafkas Üniv Sağ Bil Ens, Kars 1999; s. 126.

Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, Jørgensen P. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327: 146-50.

- Imazio M, Trincherò R. Triage and management of acute pericarditis. *Int J Cardiol* 2007; 118(3): 286-94.
- Judea-Pusta CT, Mutiu G, Pascalau AV. The importance of the histopathological examination in lethal acute intoxication with ethylene glycol. Case report. *Rom J Morphol Embryol* 2018; 59(3): 965-9.
- Katus HA, Looser S, Hallermayer K, Pempis A, Scheffold T, Borgya A, Essig U, Geuss U. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992; 38(3): 386-93.
- Kim KJ, Park JG, Ryu HJ. A case of uremic pericarditis and cardiac tamponade that developed after ethylene glycol poisoning: A case report. *Korean J Crit Care Med* 2010; 25(3): 176-81.
- Kraut JA, Mullins ME. Toxic alcohols. *N Engl J Med* 2018; 378(3): 270-80.
- Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: Are enzymes still relevant markers? *Clin Chim Acta* 1997; 257(1): 99-115.
- Ng PCY, Long BJ, Davis WT, Sessions DJ, Koyfman A. Toxic alcohol diagnosis and management: An emergency medicine review. *Intern Emerg Med* 2018; 13(3): 375-83.
- O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista THI, Miller KE, Jackson KN, Scott M. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci* 1997; 47(5): 486-95.
- O'Brien PJ, Landt Y, Ladenson JH. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clin Chem* 1997; 43(12): 2333-8.
- Sarıtaş A, Sarıtaş PU, Kurnaz MM. Antifiriz (etilen glikol) zehirlenmesine bağlı akut böbrek yetmezliği. *Türkiye Klin Derg* 2015; 23(4): 366-9.
- Thrall MA, Grauer GF, Dial SM. Etilen Glikol Toksikitesi. Osweiler GD. eds. In: *The 5 Minute Veterinary Consult Canine and Feline*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi Ltd. Sti. 2008; s. 624-5.
- Wu AHB, Abbas SA, Green S, Pearsoll BS, Dhakam S, Azar R, Onoroski M, Senaie A, McKay RG, Waters D. Prognostic value of cardiac troponin T in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1995; 76(12): 970-2.



The Effects of Laurel Volatile Oil (*Laurusnobilis L.*) on *In Vitro* Ruminal Gas Production of Methane Emission, Organic Acids and Protozoa Counts Alfalfa Herbage

Süleyman Ercüment ÖNEL¹, Taylan AKSU², Kanber KARA³, Devrim SARIPINAR AKSU⁴

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Hatay-TURKEY

²Yuzuncu Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Van-TURKEY

³Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Kayseri-TURKEY

⁴Yuzuncu Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Van-TURKEY

Corresponding author: Süleyman Ercüment ÖNEL; E-mail: ercumentonel@gmail.com; ORCID:0000-0001-6599-0541

How to cite: Önel SE, Aksu T, Kara K, Sarıpınar Aksu D. The effects of laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) on *in vitro* ruminal gas production of alfalfa herbage, methane emission, organic acids and protozoa counts. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3):283-289.

Summary: The aim of the present *in vitro* study was to investigate the effects of laurel volatile oil, (*Laurusnobilis L.*) on ruminal gas production, methane emission, organic acids and protozoa counts of Alfalfa herbage. The components of laurel volatile oil were analysed. The effects of the addition of laurel volatile oil, at levels of 0, 50, 100 and 200 mg/L (L0, L50, L100 and L200), to the rumen fluid on *in vitro* ruminal digestion were determined using *in vitro* gas production technique. The addition of 50 mg/L of laurel volatile oil decreased total gas and methane production (ml), organic matter digestion (OMD), and metabolic energy (ME) values. On the other hand, the addition of this oil at levels of 100 mg/L and 200 mg/L was observed not to alter the *in vitro* total gas, methane (ml), ME and OMD values (P<0.05). While ruminal ammonia nitrogen levels decreased in Groups L50 and L100, no alteration was detected in Group L200 (P<0.05). Ruminal protozoa counts did not affected by the addition of laurel volatile oil within a range of 50-200 mg/L (P>0.05). The amounts of the total volatile fatty acids (TVFA) and butyric acid (BA) in the *in vitro* fermentation fluid of alfalfa herbage were low in all groups. It was determined that laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) caused dose-dependent alterations in the *in vitro* digestion parameters. As a result, it has been determined that the active substances in *Laurusnobilis L.* essential oil may have regulation power on ruminal fermentation. It is thought that more research is needed to reveal the effects of *Laurusnobilis L.* volatile in terms of both ecological and digestive system physiology by using different feed types and essential oil combinations

Key words: *In vitro* gas production, laurel, methane, volatile oil

Yonca Kuru Otonun *In Vitro* Ruminal Gaz Üretimi, Metan Salınımı, Organik Asit ve Protozoa Sayısı Üzerine Defne Uçucu Yağının (*Laurusnobilis L.*) Etkisi

Özet: Bu *in vitro* çalışmanın amacı, defne (*Laurusnobilis L.*) yapraklarından elde edilen defne uçucu yağının yonca kuru otunun ruminal gaz üretimini, metan emisyonunu, organik asitler ve protozoa üzerine etkilerini araştırmaktır. Defne uçucu yağının bileşenleri analiz edildi. Rumen sıvısına 0, 50, 100 ve 200 mg/L (L0, L50, L100 ve L200) seviyelerinde defne uçucu yağ eklenmesinin *in vitro* ruminal sindirime etkileri *in vitro* gaz üretimi ile belirlendi. 50 mg/L defne uçucu yağ ilavesi toplam gaz ve metan üretimini (ml), organik madde sindirimini (OMD) ve metabolik enerji (ME) değerlerini düşürmüştür. Öte yandan bu yağın 100 mg/L ve 200 mg / L seviyelerinde eklenmesinin *in vitro* toplam gaz, metan (ml), ME ve OMD değerlerini (P <0.05) değiştirmedeği görülmüştür. Grup L50 ve L100'de ruminal amonyak nitrojen seviyeleri azalırken, Grup L200'de değişiklik saptanmadı (P <0.05). Ruminal protozoa sayıları, defne uçucu yağının 50-200 mg / L aralığında eklenmesinden etkilenmedi (P> 0.05). Yonca otunun *in vitro* fermentasyon sıvısındaki toplam uçucu yağ asitleri (TVFA) ve butirik asit (BA) miktarları tüm gruplarda düşüktü. Defne uçucu yağının (*Laurusnobilis L.*) *in vitro* sindirim parametrelerinde doza bağlı değişikliklere neden olduğu belirlendi. Sonuç olarak *Laurusnobilis L.* uçucu yağındaki etken maddelerin ruminal fermentasyon üzerinde düzenleme gücüne sahip olabileceği tespit edilmiştir. *Laurusnobilis L.* Uçucu yağının hem ekolojik hem de sindirim sistemi fizyolojisi açısından etkilerini farklı yem türleri ve uçucu yağ kombinasyonları kullanarak ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Defne, *in vitro* gaz üretimi, metan, uçucu yağ

Introduction

The consumption of animal products remains low in developing countries due to growing population.

Therefore, the increasing demand for animal products points out to the need for researching how to increase animal production (Gameda, 2018; Thornton and Pierre, 2010). Several studies have demonstrated that, on a global scale, 80 million tonnes of CH₄ is

produced each year, nearly 47% of which originates from human activity on agricultural land and 39% from farm animals (Ellis et al., 2010; Gerber et al., 2013; Hook et al., 2010). Methane gas production by ruminants eventually results in a gross energy loss ranging from 2% to 12% (Wanapat et al., 2015). It has been reported that, depending on the type, particle size and dry matter content of the feed provided to them, cattle produce 60-160 kg CH₄/year per head, whilst sheep and goats produce 10-16 kg CH₄/year per head (Hristov et al., 2013). Methane is considered to be even more dangerous than carbon dioxide (CO₂), which also causes climate change and affects global warming (Bodas et al., 2012). Creating favourable environmental conditions that would reduce methane production is rather difficult. Various inhibition techniques have been used to reduce the production of enteric CH₄ (Patra et al., 2016). Unfortunately, some of these techniques have detrimental effects on ruminal microorganisms and fermentation (Patra and Yu, 2013). Furthermore, some CH₄ inhibitors are toxic for ruminants (Patra and Yu, 2012). Therefore, it is required to find safe alternative feed additives in order to protect the environment and sustain animal production while reducing enteric CH₄ emissions. In the past few years, consumers have called for the use of natural products, such as phytochemicals, to alter the ruminal ecosystem. In this context, the structures of the secondary metabolites of more than 200,000 plants have been determined (Hartmann, 2007).

The rich flora of Turkey contributes greatly to the abundance and diversity of plants from which volatile oils are derived. Apart from its geographical position and climate diversity, Turkey being situated at the crossroads of 3 very important floristic regions accounts for the diversity of aromatic herbs found throughout the country, as is the case with other plant species and genera. The aim of this study was to investigate the effects of laurel volatile oil, an export product (approx. 12,000 tonnes/year) of Turkey derived from the leaves of laurel trees native to the coastline of the country (Karik et al., 2015), on *in vitro* roughage degradability. Volatile oils show anti-methanogenic effect on *in vitro* digestion and alter rumen fluid parameters (Cobellis et al., 2016; Ulger et al., 2017; Zhou et al., 2020). It is foreseen that, owing to the active substances it contains, laurel volatile oil may alter rumen fluid parameters and *in vitro* digestion. This study was aimed at determining the effects of different levels (0, 50, 100, 200 mg/L rumen fluid) of laurel volatile oil, an export product of Turkey (approx. 12,000 tonnes/year) derived from the leaves of laurel trees on the Mediterranean coastline, on *in vitro* ruminal gas production, methane emission, organic acids and protozoa counts.

Materials and Methods

Ethical approval

We obtained an approval (No: 2020/04-16) from the Local Ethics Committee of Hatay Mustafa Kemal University for this study.

Plant material

The laurel volatile oil used in this study was extracted by hydrodistillation from the leaves of laurel trees (*Laurusnobilis L.*) in the Hatay province of Turkey, which were collected at the blooming stage and dried at 35 °C.

Extraction and component analyses of laurel volatile oil

The dried plant material was chopped and placed in a beaker, then steam distillation was used to extract the essential oil. Steam distillation is based on the principle of applying pressure to the plant materials using steam, creating droplets of oil and water together, then evaporating the water from the droplets in the beaker. The chemical components of the volatile oil were determined using a Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole model gas chromatograph and a TG-Wax MS-A model, 5% phenyl polysilphenylene-siloxane column of 0.25 mm inner diameter, 30 m length, and 0.25 µm film thickness. Helium (99.9%) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/minute. The ionisation energy was 70 eV and the mass range (m/z) was set from 1.2 to 1200 amu. The scan mode was used for data collection. The temperature of the mass spectrometry (MS) transfer line was 250°C, the MS ionisation temperature was 220°C, the temperature of the injection port was 220 °C, and the column temperature was initially 50°C and increased up to 220°C at a rate of 3°C/minute. The structure of each component was described using the Xcalibur software and mass spectra.

Chemical analysis of dried alfalfa

Alfalfa, which was harvested during the vegetation period and subsequently dried, was analysed for dry matter (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), and crude fat (CF) using the official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). The composition of the neutral-detergent fibres (NDF), acid-detergent fibres (ADF) and acid detergent lignin (ADL) were analysed as described by Van-Soest et al. (1991).

In vitro gas production

The *in vitro* degradability of dried alfalfa was determined by the *in vitro* gas production assay described by Menke et al. (1979). Approximately 1-litre ruminal fluid samples were collected from each of two fistulat-

ed Brown Swiss beef cattle, weighing 500-550 kg, and were transported to the laboratory in insulated flasks at 39±1°C. The ruminal fluids were filtered under CO₂ gas pressure through 4 layers of muslin cloth and were used for *in vitro* gas production. Laurel volatile oil (*Laurusnobilis* L.) was drawn into 100 ml-glass syringes (Model Fortuna, Germany) and added at levels of 50-100-200 mg/L to the ruminal fluid samples, and then incubated in 10 ml-aliquots with 200±10 mg of dried alfalfa and 20 ml of a mixture of buffer + macrominerals + microminerals + reduction solution + resazurin solution. Gas was produced in four replicates of the samples from each group. Four syringes were used for blind calculations.

Determination of *in vitro* total gas and methane production

The total amount of gas produced in each syringe was determined by reading the volume (ml) on the syringe barrel at the end of a 24 h-incubation period. The share of methane in the total amount of gas produced was determined using an infrared methane sensor (Sensor, Europe GmbH, Erkrath, Germany).

Determination of *in vitro* degradability parameters

The effects of laurel volatile oil on the *in vitro* metabolizable energy (ME), organic matter digestibility (OMD) and net energy lactation (NE_L) values were calculated using the formulae indicated below (Blümmel et al., 1997; Menke et al., 1979).

$$ME \text{ (MJ /kg DM)} = 2.20 + 0.136 \times GP + 0.057 \times CP + 0.0028597 \times EE^2$$

$$OMD \text{ (g/kg DM)} = 14.88 + 0.889 \times GP + 0.45 \times CP + 0.0651 \times CA$$

GP= 24 h net gas production (ml/200 mg), CP=Crude protein (g/kg DM), CA= Crude ash (g/kg DM), EE = Ether extract (g/kg DM).

Determination of total protozoa count

At the end of the incubation period, the content of the glass syringes was used to count the number of protozoa. At the end of 24 h, 1 ml of the content was filtered from each syringe and added 49 ml of a diluent (mixture of 20 ml of 37% formalin, 150 ml of glycerine and 820 ml of distilled water) to prepare ready-to-count 50-ml sample aliquots as described by Boyne et al. One ml of each aliquot was placed in the chamber of a Macmaster's slide to count the number of protozoa per cubic centimetre (Boyne et al., 1957).

Statistical analysis

The statistical analyses of the raw data obtained in this study were made using the SPSS 17.0 software package. The statistical significance of the groups was determined by one-way analysis of variance (ANOVA). The dose-dependent differences of the *in vitro* digestion parameters were detected with polynomial contrast analysis (linear, quadratic and cubic). When statistical significance was detected, Tukey's

Table 1. Chemical components of *Laurusnobilis* L. volatileoil

Retention Time (RT)	Rate (%)	Components
12.90	5.18	α-pinene
13.08	0.47	α-thujene
17.51	4.73	β -pinene
18.53	7.57	sabinene
22.01	6.33	α-terpineol
24.43	42.82	1,8-cineole
26.41	0.66	γ -terpinene
28.14	2.34	p-cymene
28.83	0.22	terpinolene
40.72	1.01	trans-sabinenehydrate
45.91	3.18	linalool
47.18	0.22	pinocarvone
49.24	2.71	4-carvomenthenol
52.11	0.26	pinocarveol, trans
54.31	1.02	camphene
54.37	12.99	α-terpinylacetate
54.49	0.32	exo-norborneol
55.47	0.37	nerylacetate
65.05	0.55	caryophylleneoxide
65.66	1.56	methyleugenol
67.97	0.30	spathulenol
68.96	1.28	eugenol
69.13	0.47	α-elemene
70.07	0.31	α-eudesmol
70.32	0.79	β -eudesmol

multiple range test was performed as a multiple comparison test. The p-level for statistical significance was set below 0.05 ($P < 0.05$).

Results

The dried alfalfa used in this study was determined to contain 94.38% dry matter, 7.13% crude ash, 3.4% crude fat and 20.44% crude protein. The chemical composition of the laurel volatile oil used in this study is presented in Table 1. The major components of this oil, in order of share, were determined as follows: 1,8-cineole (42.82%), α -terpinyl acetate (12.99%), sabinene (7.57%), α -terpineol (6.33%), and β -pinene (4.73%).

The effects of the different doses of laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) on *in vitro* gas production, ammonia nitrogen level and protozoa count at the end of a 24 h-incubation period are shown in Table 2. The results obtained in the present study demonstrated that different doses of laurel volatile oil resulted in statistically significant differences. The first, second and third doses of laurel volatile oil were determined to have decreased gas production by rates of 20.8%, 7.3% and 7.4%, respectively ($P < 0.05$). The addition of 50 mg/L of laurel volatile oil decreased total gas and methane production (ml), organic matter digestion (OMD), and metabolic energy (ME) values. On the other hand, the addition of this oil at levels of 100 mg/L

Table 2. The effect of laurel volatile oil on the *in vitro* digestion parameters of alfalfa hay

	TGP (ml/0.2 g DM)	Methane (%)	Methane (ml)	ME (MJ/kg DM)	OMD (%)	NH ₃ -N (mg/dl)	Protozoa
L0 (control)	42.21±1.92 ^a	22.06±0.23 _c	9.31±0.43 ^{ab}	8.98±0.26 ^a	67.02±1.70 ^a	47.82±0.23 ^a	2.72±0.10
L50	33.39±0.6 ^b	25.25±0.25 _{ab}	8.43±0.22 ^b	7.78±0.08 ^b	59.18±0.53 ^b	43.79±1.84 ^{bc}	2.54±0.13
L100	39.11±1.17 ^a	24.70±0.46 _b	9.66±0.37 ^{ab}	8.56±0.15 ^a	64.27±1.04 ^a	41.85±0.64 ^c	2.53±0.23
L200	39.06±1.39 ^a	26.77±0.41 _a	10.45±0.37 ^a	8.55±0.19 ^a	64.22±1.24 ^a	45.75±1.93 ^{ab}	2.80±0.25
SEM	1.008	0.460	0.253	0.137	0.896	0.912	0.904
P-values							
L	NS	***	**	NS	NS	*	NS
Q	***	NS	*	***	***		
C	***	***	NS	***	***		

L0, L50, L100, L200: Groups added 0 (control), 50, 100, and 200 mg/L of laurel volatile oil, respectively.

TGP: Total gas production (24h ml/ 0.2 g DM), CH₄: methane production as a percentage of total gas production, ME: Metabolic energy as MJ/kg DM, OMD: Organic matter digestibility as %, NS: non-significant.

*Differences between the average values indicated with different letters in the same column are statistically significant ($P < 0.05$).

** Differences between the average values indicated with different letters in the same column are statistically significant ($P < 0.01$).

*** Differences between the average values indicated with different letters in the same column are statistically significant ($P < 0.001$).

Table 3. The effect of laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) on ruminal fermentation characteristics

	L0 (control)	L50	L100	L200	SEM	P value
TVFA	101.78±1.19 ^a	97.75±0.75 ^c	98.68±1.15 ^b	98.31±1.39 ^d	1.159	**
AA	52.65±0.97	51.20±0.96	52.38±0.79	51.03±0.67	0.427	NS
PA	24.85±1.08	20.81±1.26	23.70±0.61	21.21±0.51	0.601	NS
BA	17.59±0.29 ^a	13.98±0.65 ^b	13.87±0.61 ^{bc}	11.98±79 ^c	0.592	**
OFA	3.76	1.59	3.38	4.75	0.393	NS
AA/PA	2.11	2.46	2.23	2.41	0.227	NS

L50, L100, L200: Groups added 50, 100, and 200 mg/L of laurel volatile oil, respectively, to rumen fluid.

TVFA: (as mmol/L rumen fluid) total volatile fatty acids comprise of acetate + propionate + butyrate + iso-butyrate + valerate + iso-valerate; OFA: other fatty acids comprise of iso-butyrate + valerate + iso-valerate; AA: acetic acid, PA: propionic acid, BA: butyric acid, AA/PA: acetate / propionate

* Differences between the average values indicated with different letters in the same row are important

** Differences between the average values indicated with different letters in the same row are statistically significant ($P < 0.05$).

L and 200 mg/L was observed not to alter the *in vitro* total gas, methane (ml), ME and OMD values ($P < 0.05$). While ruminal ammonia nitrogen levels decreased in Groups L50 and L100, no alteration was detected in Group L200 ($P < 0.05$). Ruminal protozoa counts were ascertained not to have been affected by the addition of laurel volatile oil within a range of 50-200 mg/L ($P > 0.05$).

As shown in Table 3, the different doses of laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) added to ruminal fluid significantly reduced the total volatile fatty acid (TVFA) and butyric acid levels ($P < 0.05$). The dose most effective on ruminal fermentation was 50 mg/L.

Discussion and Conclusion

Volatile oil derived from the leaves of laurel trees, native to the Mediterranean coastline, is reported to have antibacterial effect, owing to the very high levels of 1, 8-cineole (42.82%), α -terpinyl acetate (12.99%), sabinene (7.57%), and α -terpineol (6.33%) it contains (Tural and Turhan, 2017). The volatile oil profile of laurel leaves from similar locations and the chemical composition of laurel volatile oil are to a great extent similar to those determined in the present study (Sangun et al., 2007; Ayanoğlu et al., 2010; Karık et al., 2015).

Gas production during *in vitro* incubation is generally considered to be a good indicator of ruminal degradability, fermentation and microbial activity, as higher gas levels indicate better nutrient sources for rumen microorganisms (Makkar et al., 1997). At the end of the study, it was determined that all of the laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) levels tested had decreased gas production. Some researchers have reported increased gas production during *in vitro* incubation with other plant extracts rich in secondary metabolites (Jiménez-Peralta et al., 2011; Sallam et al., 2010). Limited data is available on the effect of laurel extract on *in vitro* ammonia nitrogen production, yet *in vivo* research has shown that, based on comparison with controls, ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ and CH_4 levels significantly decrease with the use of volatile oils (Manh et al., 2012). In the present study, when compared to the control group, methane levels (ml) were determined to have significantly decreased in Group L50 ($P < 0.01$). This result, which agrees with previous studies reporting reduced methane emissions with the use of volatile oils (Ravindra et al., 2009; Patra and Yu, 2012), was attributed to the high level of 8-cineole (42.82%) found in laurel leaves. Plant extracts and their administration doses should be selected in a way to avoid any negative effect on ruminal fermentation and feed durability. When used for dietary supplementation, volatile oils should induce a positive effect by reducing ammonia concentrations in the rumen. Although there is not enough literature on the effect of laurel essential oil on rumen param-

eters, the laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) used in the present study was observed to have shown a positive effect by decreasing ruminal ammonia levels without affecting ruminal protozoa counts (Mandal et al., 2016; Onel and Aksu, 2017).

In the current study, the molarities of TVFA in rumen (98-102 mmol/L) in the fermentation process of alfalfa herbage was at an ideal level for the normal ruminal ecosystem (Kara et al., 2018). The fact that the laurel volatile oil does not have a negative effect on acetate and propionate levels indicates that it does not have a negative effect on digestibility. On the other hand, decreasing the butyric acid level of the herb doses decreased the TVFA molarities in fermentation fluid.

In view of digestibility, protozoal growth and reduced ammonia levels having been reported to be inhibited by the chemical composition of the plant (Tural and Turhan, 2017), the nitrogen-decreasing effect of laurel volatile oil (*Laurusnobilis L.*) was attributed to it most possibly inhibiting the growth of ammonia-producing bacteria. On the other hand, different from the results of *in vitro* research, several studies conducted in cattle and sheep have demonstrated that volatile oils do not affect bacterial nitrogen levels (Benchaar et al., 2006; Newbold et al., 2004). In result, it was determined that the addition of 50 mg/L of laurel volatile oil to the rumen fluid showed relatively adverse effects on the *in vitro* ruminal gas production of alfalfa herbage as well as on digestion parameters, yet also produced an antimethanogenic effect. There is a need for the positive effects of these plants and their extracts to be extended to *in vivo* conditions and to be tested in long-term studies.

Acknowledgements: The authors would like to thank Professor D. Alpaslan KAYA from the Medicinal Plants Section of the Arable Crops Department of Hatay Mustafa Kemal University for identifying plant species.

References

- AOAC official methods of analysis (16th edn). AOAC International, Arlington, VA USA; 1995.
- Ayanoğlu F, Mert A, Kaya A, Köse E. Hatay yöresinde doğal olarak yetişen defne (*Laurusnobilis L.*) bitkisinin kalite özelliklerinin belirlenmesi ve seleksiyonu, Tübitak Proje No: 108O878, 2010; p. 268.
- Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Whyte T D, Chouinard PY. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. J Dairy Sci 2006; 89(11): 4352-64.
- Blümmel M, Makkar H PS, Becker K. In vitro gas production: A technique revisited. J Anim Phys

- Anim Nutr 1997; 77(1): 24-34.
- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Anim Feed Sci Technol 2012; 176(1-4): 78-93.
- Boyne AW, Eadie JM, Raitt K. The development and testing of a method of counting rumen ciliate protozoa. J Gen Microbiol 1957; 17(2): 414-23.
- Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC, Yu Z. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. Anim Feed Sci Technology 2016; 215: 25-36.
- Ellis JL, Bannink A, France J, Kebreab E, Dijkstra J. Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. Glob Chang Biol 2010; 16(12):3246-56.
- Gemeda BS. The potential of tropical tannin rich browses in reduction of enteric methane. Appro Poult Dairy Vet Sci 2018; 2(3):154-62.
- Gerber P, Hristov AN, Henderson B, Makkar H, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, Firkins J, A Rotz, Dell C, Adesogan AT, Yang WZ, Tricarico JM, Kebreab E, Waghorn G, Dijkstra J, Oosting S. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: A review. Animal 2013; 2(2): 220-34.
- Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 2007; 68(22-24): 2831-46.
- Hook SE, André Denis GW, Brian WM. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. Archaea 2010; ID 945785: doi:10.1155/2010/945785.
- Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HPS, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. Special topics-mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. J Anim Sci 2013; 91(11): 5045-69.
- Ulger I, Kamalak A, Kurt O, Kaya E, Guven I. Comparación de la composición química y el potencial anti-metanogénico de las hojas de Liquidambar orientalis con hojas de Laurus nobilis y Eucalyptus globulus utilizando la técnica de producción de gas in vitro. Ciencia Invest Agraria 2017; 44 (1): 75-82.
- Jiménez-Peralta FS, Salem AZM, Mejía-Hernández P, González-Ronquillo M, Albarrán-Portillo B, Rojo-Rubio R, Tinoco-Jaramillo JL. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. Livestock Sci 2011; 136(2-3): 192-200.
- Kara K, Ozkaya S, Baytok E, Guclu BK, Aktug E, Erbas S. Effect of phenological stage on nutrient composition, in vitro fermentation and gas production kinetics of *Plantago lanceolata* herbage. Vet Med 2018; 63: 251-60.
- Karık Ü, Çiçek F, Tutar M, Ayas F. Türkiye defne (*Laurus nobilis* L.) populasyonlarının uçucu yağ bileşenleri. Anadolu J of Aari 2015; 25(1): 1-16.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K. In vitro rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. Anim Feed Sci Technology 1997; 67: 245-51.
- Mandal GP, Roy A, Patra AK. Effects of plant extracts rich in tannins, saponins and essential oils on rumen fermentation and conjugated linoleic acid concentrations in vitro. Research Article Indian J Anim 2016; 55: 49-60.
- Manh NS, Wanapat M, Uriyapongson S, Khejornsart P, Chanthakhoun V. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. Afr J Agric Res 2012; 7(14): 2142-8.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. The J Agricultural Sci 1979; 93(1): 217-22.
- Newbold CJ, McIntosh FM, Williams P, Riccardo L, Wallace RJ. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Anim. Feed Sci Technol 2004; 114(1-4): 105-12.
- Onel SE, Aksu T. Esansiyel / uçucu yağlar: Esansiyel / uçucu yağların hayvan beslemede kullanımı. Türkiye Klinikleri Hay Bes ve Besl Has-Özel Konular 2017; 3(1): 21-9.
- Patra AK, Yu Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. Appl Environ Microbiol 2012; 78(12): 4271-80.
- Patra AK, Yu Z. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. Bioresource Technol 2013; 148: 352-60.

- Patra PK, Saeki T, Edward JD, Ishijima K, Umezawa T, Ito A, Aoki S, Morimoto S, Kort EA, Crotwell A, Kumar KR, Nakazawa T. Regional methane emission estimation based on observed atmospheric concentrations (2002-2012). J Meteor Soc Japan 2016; 94(1): 91-113.
- Ravindra K, Kamra DN, Neeta A, Chaudhary LC. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Anim Nutr Feed Techn 2009; 9: 237-43.
- Sallam SM, Bueno IC, Nasser ME, Abdalla AL. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission in vitro. Italian J Anim Sci 2010; 9(3): 58.
- Sangun MK, Aydin E, Timur M, Karadeniz H, Caliskan M, Ozkan A. Comparison of chemical composition of the essential oil of laurus nobilis L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey. J Environ Biol 2007; 28(4):731-3.
- Thornto PK, Pierre JG. Climate change and the growth of the livestock sector in developing countries. Mitigation Adapt Strateg Glob Change 2010; 15(2):169-84.
- Tural S, Turhan S. Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus Vulgaris L.*), rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) and laurel (*Lauris Nobilis L.*) essential oils and their mixtures. Gida J of Food 2017; 42(5): 588-96.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74(10): 3583-97.
- Wanapat M, Cherdthong A, Phesatcha K, Kang S. Dietary sources and their effects on animal production and environmental sustainability. Anim Nutr 2015; 1(3): 96-103.
- Zhou R, Wu J, Lang X, Liu L, Casper DP, Wang C, Wei S. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. J Dairy Sci 2020; 103(3): 2303-14.



İzmir İlinde Bulunan Hastalıktan Ari Sütçü Sığır İşletmelerinin Yapısal Özellikleri*

Osman DOĞAN¹, Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ²

¹İzmir İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Gıda ve Yem Şubesi, İzmir-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ; E-posta: bguclu@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-0341-4594
Atıf yapmak için: Doğan O, Kocaoğlu Güçlü B. İzmir ilinde bulunan hastalıktan ari sütçü sığır işletmelerinin yapısal özellikleri. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 290-296.

Özet: Bu araştırmanın amacı, İzmir ili merkez ve ilçelerinde bulunan hastalıktan ari süt sığır işletmelerinin yapısal özelliklerini belirlemektir. Bu amaçla hastalıktan ari sertifikası olan süt sığır işletmesi sahipleriyle anket çalışması yapılmıştır. Anket formunda; işletme yapısına ve personele yönelik bilgilerle, yemler ve yemleme yöntemlerine dair sorular yer almıştır. Çalışmada, işletme sahiplerinin %58.8'inin 50 yaş ve üzerinde olduğu belirlenmiştir. İşletme sahiplerinin önemli bir kısmının lisans veya lisansüstü (%54.7) eğitime ve 10 yıl veya üzeri (%57.8) deneyime sahip oldukları saptanmıştır. İşletmelerin %82.6'sı modern ahırlara sahip olup, %70.2'sinde buzağı kulübesi kullanılmaktadır. Ayrıca işletmelerin %93.5'inin silajını kendi imkanları ile yaptığı ve silajların havuz tipi beton silolarda hazırlandığı belirlenmiştir. İşletmelerin %40.5'inde yonca ekildiği ve yonca hasadının genellikle çiçeklenme başlangıcında (%64.7) yapıldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında işletmelerin %60.5'inde silajlık mısır ekimin yapıldığı ve hamur olum (%48) veya sert dane (%44) döneminde hasat edildiği belirlenmiştir. Kaba yemler hayvanlara genel olarak parçalanmış halde ve iki öğünde verilmektedir. Yemler, hayvanlara genellikle ölçülü olarak verilmekte olup, işletmelerin %59.5'inde verilecek yem miktarı süt verimi göz önüne alınarak belirlenmektedir. Sonuç olarak, İzmir merkez ve ilçelerinde bulunan hastalıktan ari süt sığır işletmelerinin genel olarak ortalamanın üzerinde standartlara sahip oldukları söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Hastalıktan ari, süt sığır işletmeleri, yapısal özellikler

Structural Characteristics of Disease Free Dairy Cattle Farms in Izmir Province

Summary: The aim of this research is to determine the structural features of disease-free dairy cattle farms in the central and districts of İzmir. For this purpose, a survey was conducted with dairy cattle farms owners who have been disease free certificate. The questionnaire included questions about the structure and staff information, feed and feeding methods. In the study, it was determined that 58.8% of the business owners are 50 years old or over. It is determined that a significant portion of the business owners have undergraduate or graduate (54.7%) education and 10 years or more (57.8%) experience. 82.6% of the farms have modern stables and calf huts are used in 70.2%. In addition, it was determined that 93.5% of the farms made silage with their own facilities and most of the silage was prepared in concrete pool type silos. It was determined that clover was planted in 40.5% of the farms and the harvest was generally made at the beginning of flowering (64.7%). In addition, it was determined that 60.5% of the farms were planted silage corn and they were harvested in the period of dough (48%) or hard grain (44%). Roughages are generally given to the animals in total mixed feed and in two meals, roughly divided. Although feeds are usually given to animals in moderation, the amount of feed to be given to animals in 59.5% of the establishments is determined by considering milk yield. As a result, disease-free dairy cattle farms in Izmir center and its districts generally come to the fore with their standards above average.

Key words: Dairy cattle farms, disease free, structural features

Giriş

Süt sığırcılığında arzu edilen verimin elde edilmesi ve sürünün devamı başarılı bir sürü yönetimi ile mümkündür (Akman, 1998). Süt sığırcılığı; yıl boyu gelir elde edilmesi, gıda sektörü içinde önemli bir üretim değerine sahip olan süt ve süt ürünleri endüstrisine ham madde sağlaması, yem, giyim, ilaç ve makine sanayi için pazar olanağı oluşturması gibi nedenlerle ülke ekonomisine sağladığı katma değer açısından

önemli bir hayvancılık alt sektörüdür (Torgut ve ark., 2019). Ayrıca hayvansal kaynaklı kaliteli gıda üretimine katkısı da oldukça önem arz etmektedir. Süt sığırcılığı işletmelerinde, işletmenin mevcut kapasitesi, üreticinin eğitim düzeyi, işgücü niteliği, deneyim, barınak şartları, kaliteli ve yeterli yem temini, düşük girdi maliyeti gibi faktörler karlı ve verimli bir üretimi doğrudan etkilemektedir (Murat, 2011). Ülkemizde ise hayvancılık işletmelerinin büyük çoğunluğunda barınma koşullarının sağlıksız olması, kaba yem açığı, kesif yem üretiminde kalitesiz ham madde kullanımı, bakım ve besleme konularında bilgi yetersizliği, vasıflı işçi bulunmaması, hayvancılık işletmelerinin çoğunlu-

ğunun küçük aile işletmeleri olmaları belli başlı sorunlardandır.

Bu araştırmada, İzmir İli Tarım ve Orman Müdürlüğüne kayıtlı hastalıktan ari süt sığırı işletmelerinde yapılan anket çalışması ile teknik, ekonomik ve yapısal sorunları belirlemek ve değerlendirmek suretiyle gerek işletme sahiplerine gerekse sektörle ilgili tüm kurum ve kuruluşlara faydalı olacak bilgilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hastalıktan ari süt sığırı işletmesi

Hastalıktan ari süt sığırı işletmesi; işletmede bulunan tüm hayvanlarda 6 ay ara ile yılda iki kez tüberküloz ve brusella hastalıkları yönünden testler yapıldıktan sonra Tarım il/ilçe müdürlükleri tarafından "Hastalıktan ari sağlık sertifikası" verilen işletmelerdir.

Araştırma İzmir ili merkez ve 14 ilçesindeki (Bayındır, Foça, Güzelbahçe, Kemalpaşa, Menderes, Menemen, Seferihisar, Selçuk, Torbalı, Urla, Bergama, Beydağ, Ödemiş, Tire) hastalıktan ari süt sığırı işletmelerinde yapılmıştır. Araştırmanın materyalini, İzmir ili merkez ve ilçelerinde hastalıktan ari süt sığırı işletmelerinden anket yoluyla elde edilen; işletme sahiplerine ve işletme yapısına ilişkin bilgilerle, yem bitkileri üretimi ve temini ile yemleme yöntemlerine ilişkin veriler oluşturmaktadır.

Çalışmada, İzmir ili merkez ve ilçelerinde hastalıktan ari süt sığırı işletmelerinin yapısal durumları, ahırların yapısı ve fiziki koşulları, işletme sahipleri ve personelle dair genel bilgiler, hayvanların beslenmesinde kullanılan yemler, yemlerin üretimi, hasat edilmesi ve saklanması ile yemleme yöntemlerinin tespitine yönelik sorulardan oluşan anket formu hazırlanmıştır. Anketlerin uygulanacağı işletmeler, İzmir ilinde bulunan 61 adet hastalıktan ari süt ineği çiftliği arasından seçilmiştir. Bu işletmelerle ön görüşme yapılmış ve araştırmaya katılmayı kabul eden 47 işletmede anket çalışması yapılmıştır. Anket sorularına verilen cevaplar değerlendirilerek belirlenen % oranlar tablolarda gösterilmiştir.

Bulgular

İşletme sahibi ve personel ile işletme yapısına ait genel bilgiler

Yapılan araştırma sonucunda işletme sahibi ve işletmede çalışan personel hakkında elde edilen bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur. İzmir ilinde hastalıktan ari süt sığırı işletme sahiplerinin yaşlarının büyük oranda (%58.8) 50 yaş ve üzerinde olduğu, yine işletmecilerin %54.7 (%47.6+%7.1) gibi önemli bir kısmının lisans veya lisansüstü eğitime sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca işletmecilerin %57.8'inin 10 yıl veya üzeri deneyime sahip oldukları belirlenmiştir. Hasta-

lıktan ari süt sığırı işletmelerinin %53.3'ünün veteriner hekim istihdam ettiği belirlenmiştir. İşletmelerin çoğunda (%51.1) en fazla 5 işçinin çalıştığı ve eğitim seviyelerinin genellikle ilkököl (%43.5) ve ortaokul (%32.6) olduğu saptanmıştır.

Tablo 1. İşletme sahibi ve personel ile ilgili bilgiler

Yaş	%
25-49 yaş arası	41.2
49-50 yaş ve üzeri	58.8
İşletmecinin eğitim durumu	
İlkokul	16.7
Ortaokul	4.8
Lise	23.8
Üniversite	47.6
Yüksek lisans / Doktora	7.1
Deneyim (yıl)	
0-10	42.2
11-20	42.2
21 yıl ve üzeri	15.6
Danışılan kişi veya kurum	
Veteriner hekim*	63.1
Ziraat mühendisi	10.9
Her ikisine de ¹	13.0
Tarım kurumlarına ²	13.0
Veteriner hizmeti karşılanması	
Serbest veteriner hekim	46.7
İşletmede istihdam	53.3
İşletmede çalışan personel sayısı (kişi)	
0-5	51.1
6-10	19.1
11-15	6.4
16-20	2.1
21 ve üzeri	21.3
Personelin eğitim düzeyi	
İlkokul mezunu	43.5
Ortaokul mezunu	32.6
Lise mezunu	17.4
Lisans/Yüksek lisans mezunu	6.5

¹Hem Veteriner hekim, hem de Ziraat mühendisine

²Tarım İl veya İlçe Müdürlüklerine, Üniversitelere, Yem Fabrikalarına

İşletmelerin genel ve yapısal durumları hakkında bilgiler Tablo 2. de verilmiştir. İşletmelerin %82.6'sında ahırların modern görünüme sahip olduğu ve %70.2'sinde buzağı kulübesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan incelenen ahırların zemininin %42.2'sinin beton, %55.6'sının ise beton+toprak olduğu, gübre temizliğinin %60.9 oranında mekanik sıyrıcılarla ve genellikle (%76.1) her gün yapıldığı belirlenmiştir. İncelenen işletmelerin %75.6'sında durakların serbest şakşaklı olduğu ve sulamanın *ad libitum* (%89.2) olarak otomatik suluklarla (%73.9) yapıldığı tespit edilmiştir.

Tablo 2. İşletme yapısına ait genel bilgiler

Buzağı barınağı	%
Buzağı kulübesi	70.2
Buzağı bölmesi	23.4
Padok	6.4
Ahır tipi	
Modern	82.6
Eski tip	17.4
Ahır zemini	
Beton	42.2
Toprak	2.2
Beton ve toprak	55.6
Gübre temizliği	
Elle	4.3
Mekanik gübre sıyırıcısıyla	60.9
Traktörle	34.8
Gübre temizliği sıklığı	
Günlük	76.1
Haftalık	19.6
Aylık	4.3
Ahır durak tipi	
Serbest şakşaklı	75.6
Serbest şakşaksız	24.4
Su tüketimi	
Öğünlü	10.8
Ad-Libitum	89.2
Suluk tipi	
Otomatik	73.9
Yalak	26.1

İşletmelerde kullanılan yemler, yem bitkilerinin temini ve yemleme teknikleri

İşletme girdilerinin büyük bir kısmını oluşturan yemlerle ilgili bilgiler Tablo 3'te verilmiştir. Çalışmada, işletmelerin %92.9'unun hayvanları meraya çıkarmadığı belirlenmiştir. İşletmelerin %57.8'i yemi hazır alırken; %42.2'si kendi yemini kendi hazırlamaktadır. İşletmelerin %93.5'inin silajını kendi imkanları ile yaptığı ve silajların havuz tipi beton silolarda hazırlandığı belirlenmiştir. İşletmelerin konsantre yemi veya yem hammaddelerini genellikle özel bayilerden (%51.2) veya yem fabrikalarından (%41.5) aldıkları belirlenmiştir. Diğer yandan işletmelerin kaba (%78.3) ve konsantre yemlerini (%86.7) yem depolarında sakladıkları saptanmıştır.

Yem bitkileri ekimi, hasat ve saklanması ile ilgili bulgular Tablo 4'te gösterilmiştir. İşletmelerin %40.5'in de yonca ekildiği ve yonca hasadının çiçeklenme başlangıcında (%64.7) yapıldığı belirlenmiştir. Bunun yanında işletmelerin %60.5'inde de silajlık mısır ekiminin yapıldığı ve hamur olum (%48) veya sert dane (%44) döneminde hasat edildiği saptanmıştır. İşletmelerin %62.2'sin de hasıl elde etmek için ekim yapılmaktadır. Hasıl elde etmek için ekilen bitkilerin hasadı ise %42.1 oranında başaklanma öncesi, %36.8 oranında süt olum döneminde yapılmaktadır.

Tablo 3. İşletmelerde kullanılan yemler

Yemi hazır mı alıyorsunuz?	%
Evet	57.8
Hayır	42.2
Konsantre yemi nereden alıyorsunuz ?	
Özel bayi	51.2
Fabrika	41.5
Kooperatif	7.3
Konsantre yem nerede depolanıyor ?	
Yem deposunda	86.7
Diğer	13.3
İşletmede silaj yapılıyor mu?	
Evet	93.5
Hayır	6.5
Silo tipi	
Beton havuz	93.5
Diğer (top silaj, toprak üstü naylon altı)	6.5
Kaba yem kaynağı	Y
Kendi üretimi	14.8
Satın alma	42.6
Hem üretip hem satın alma	42.6
Kaba yem nerede depolanıyor?	
Açık havada örtü altında	21.7
Yem deposunda	78.3
Hayvanları meraya çıkarıyor musunuz?	
Evet	7.1
Hayır	92.9

Yeşil otların kurutulması için genellikle (%97.1) tarlada yerde kurutma metodu uygulanmaktadır.

Yemleme ile ilgili bilgiler Tablo 5'te verilmiştir. Kaba yemler genel olarak, kabaca (27.6) veya ince (59.6) parçalanmış olarak kullanılmaktadır. İşletmelerin %57.4'ünde konsantre yem toplam karma yem (TMR) içinde ve iki öğün halinde verilmektedir. Kaba yem kalitesini belirlemede çoğunlukla yemlerin fiziksel kriterleri (renk, koku görünüş vb) dikkate alınırken; konsantre yemde kalite kriteri olarak beyan edilen veya işletmecinin yaptırdığı analiz sonuçları gibi kimyasal kriterler dikkate alınmaktadır. Hayvanların beslenmesinde genellikle (%71.1) hayvanların fizyolojik dönemlerinin dikkate alındığı ve yemlerin ölçülerek verildiği (%100) tespit edilmiştir. İşletmelerin %59.5'in de hayvana verilecek konsantre yem miktarı süt verimi, %40.5'in de ise hayvanların cüsse, laktasyon dönemi ve iştah durumu dikkate alınarak belirlenmektedir.

Tablo 4. Yem bitkileri yetiştirilmesi ve elde edilmesi ile ilgili bilgiler

Yonca ekimi yapılıyor mu?	%
Evet	40.5
Hayır	59.5
Yonca hasat zamanı	
Çiçeklenme başlangıcı	64.7
%50 çiçeklenme olduğunda	29.4
%100 çiçeklenme olduğunda	5.9
Mısır ekimi yapılıyor mu ?	
Evet	60.5
Hayır	39.5
Mısırın biçim zamanı	
Süt olum	8.0
Hamur olum	48.0
Sert (dolgun) dane	44.0
Hasıl ekimi yapılıyor mu?	
Evet	62.2
Hayır	37.8
Hasıl ekim amacı	
Dane ve saman elde etmek	17.4
Kuru ot elde etmek	26.1
Silaj yapmak	30.4
Hem kuru ot hem silaj elde etmek	26.1
Hasat zamanı	
Başaklanma öncesi	42.1
Süt olum	36.8
Hamur olum	15.8
Taneli	5.3
Cevapsız	
Hasıl ekim amacı	
Dane ve saman elde etme	17.4
Kuru ot elde etme	26.1
Silaj elde etme	30.4
Hem kuru ot hem silaj elde etme	26.1
Kurutma metodu (yonca , ot vb)	
Tarlada	97.1
Sehpada	2.9

Tablo 5. Yemleme ile ilgili bilgiler

Kaba yem verilme şekli	%
Sap balyası	12.8
Kabaca parçalanmış	27.6
İnce parçalanmış	59.6
Kaba yem kalitesi ölçütü	
Fiziksel özellikler ¹	72.3
Kimyasal özellikler ²	27.7
Konsantre yem kalitesi ölçütü	
Fiziksel özellikler ³	40.4
Kimyasal özellikler ⁴	59.6
Hayvana verilen yem miktarı	
Ölçülü	100
Kaba yem öğün sayısı	
Günde 2 öğün	76.3
Günde 3 öğün	10.5
Ad-libitum	13.2
Dönemlerine göre besleme yapılıyor mu?	
Evet	71.1
Hayır	28.9
Konsantre yem öğün sayısı	
Günde 2 öğün	77.8
Günde 3 öğün	8.3
Ad-libitum	13.9
Yem verilme şekli	
Toplam karma rasyon (TMR)	57.4
Diğer	42.6
Konsantre yem verilme zamanı	
Sağım esnasında	10.7
Sağım sonrası	31.9
TMR	57.4
Konsantre yem verme kriteri	
Süt verimi	59.5
Diğer ⁵	40.5

¹ Görünüş, renk, koku, aldığı yere güven

² Laboratuvar analizleri

³ Görünüş, tavsiye, aldığı yere güven

⁴ Analiz, içerik beyanı

⁵ Cüsse, laktasyon dönemi, iştah

Tartışma ve Sonuç

İşletme sahibinin yatırım ruhuna, işletmesini ve kendini geliştirme potansiyeline, yenilikleri ve teknolojiyi takip etme ve uygulama hızına etki eden faktörler arasında eğitim düzeyi ve yaş ön plana çıkmaktadır. Bu bakımdan araştırmada ilk olarak işletme sahiplerine yaşları ve eğitim düzeyleri sorulmuştur. İşletmecilerin yaşlarının %58.8 oranında 49-50 yaş ve üzerinde olması, hayvancılık işletmelerinde işletmecilerin yaş ortalamasının 41-50 arasında olduğunu bildiren çalışma bulguları ile uyumludur (Nizam, 2006; Kutlar

ve Özçatalbaş, 2008; Sezer, 2019). İzmir ilinde hastalıktan arı süt sığırı işletmelerinde işletme sahiplerinin önemli bir kısmının (%54.7) lisans (%47.6) veya lisansüstü (%7.1) eğitime sahip olması Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışma bulgularından farklı bulunmuştur. Daha önce yapılan anket çalışmalarının çoğunda işletmecilerin %50 den fazlasının ilkökul mezunu olduğu kaydedilmiştir (Soyak, 2007; Nizam, 2006; Curabaz, 2009; Yener, 2013). Bu durum çalışmanın yapıldığı bölge, işletme türü ve Türkiye'de zaman içinde eğitim düzeyinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan işletmecilerin %57.8'inin 10 yıl veya üzeri deneyime sahip olmaları literatür bulguları ile uyumludur (Nizam, 2006; Curabaz, 2009; Kutlar ve Özçatalbaş, 2008).

Bir hayvancılık işletmesinde işletmecinin eğitim düzeyi kadar, personelin eğitim düzeyi de işletmenin karlılığını ve başarısını etkilemektedir. Süt sığırı işletmelerinde çalışan personelin kendisine verilen yönergeleri doğru ve eksiksiz bir şekilde uygulaması hem hayvan sağlığı hem verim miktarı hem de kalitesini doğrudan etkileyen unsurlardandır. Çalışan personelin hayvan davranışlarını ve özelliklerini bilmesi, çalışanın iş güvenliğini artırarak hayvanların sevk ve idaresini kolaylaştırır. Süt sığırı yetiştiriciliğinde hayvan refahı, verimi ve sağlığı açısından bakıcı ile hayvan arasında önemli bir bağ vardır. Çalışmada, işletmelerin % 51.1'inde en fazla 5 işçinin çalıştığı ve işletmelerdeki personelin eğitim seviyesinin genellikle ilkökul (% 43.5) ve ortaokul (%32.6) düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Kutlar ve Özçatalbaş (2008) tarafından yapılan bir çalışmada da işletmelerde çalışan erkek personelin %74.4'ünün, kadın personelin ise %61.9'unun ilkökul mezunu olduğu saptanmıştır. Özüdoğru ve Tatlıdil (2012)'in incelediği işletmelerde çalışan işçilerin %70-72 oranında ilkökul mezunu olduğu kaydedilmiştir. Literatür sonuçları araştırma bulgularını desteklemektedir.

Veteriner hekimler, hayvan hastalıklarının tanı ve sağıltımı, koruyucu hekimlik uygulamaları gibi birçok alanda önemli görevler yerine getirmektedirler (Yener, 2013). Bu çalışmada, incelenen işletmelerin büyük bir kısmının (%53.3) bünyelerinde veteriner hekim istihdam ettikleri belirlenmiştir. Veteriner hekim istihdam etmeyen işletmelerde ise veteriner hizmetlerini serbest veteriner hekimlerden aldıkları belirlenmiştir. Yener ve ark. (2013) da, hayvancılık işletmecilerin %93.9'unun suni tohumlama, doğum ve hastalıkların tedavisinde serbest veteriner hekimlerden faydalandıklarını bildirmiştir. İşletmeciler aşılama, destekleme ve küpeleme hizmetleri için daha çok kamuda çalışan veteriner hekimlerden, muayene, tedavi, ilaç alımı, güç doğum, yaralanma vb hizmetler için özel veteriner hekimlerden, danışmanlık hizmetleri konusunda da Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'nde çalışan veteriner hekimlerden faydalandıklarını ifade etmişlerdir.

Hayvancılık işletmelerinin, özellikle de büyükbaş ahırlarının en büyük sorunlarından biri gübrenin temizlenmesidir. İncelenen ahırların %42.2'sinin zemininin beton olduğu ve gübre temizliğinin %60.9 oranında mekanik sıyırıcılarla ve çoğunlukla (%76.1) günlük yapıldığı tespit edilmiştir. Yener ve ark. (2013), Şanlıurfa ilinde bulunan süt sığırı işletmelerinin % 85.2'sinde beton, besi sığırı işletmelerinin %93'ünde çalışmada, süt sığırı işletmelerinin ahır zeminlerinin %47.5'inin beton, %42.4'ünün ahşap, %9.7'sinin toprak ve %0.5'inin taş materyalden oluştuğunu saptamışlardır. Köse (2006)'nin yaptığı bir çalışmada işletmelerin %84'ünde gübre temizliğinin elle, %12'sinde traktörle, %4'ünde ise elektrikli sıyırıcı ile yapıldığı belirlenmiştir. Bakır (2002) da Van yöresinde sığır işletmelerinde gübre temizliğinin yaygın olarak elle yapıldığını kaydetmiştir. Nizam (2006)'ın bir çalışmasında da genel olarak işletme başına 0,01 adet otomatik gübre sıyırma düzeneği düştüğü bildirilmiştir. Diğer araştırma sonuçları (Bakır 2002; Köse 2006) ile karşılaştırıldığında yapılan bu çalışmada incelenen işletmelerin daha modern koşullarda ahırlarını temizlemekte olduklarını söylemek mümkündür.

Büyükbaş hayvanları zapt etmek güç olduğundan duraklar sığırların kontrolü için gerekli aparatlardır. İncelenen işletmelerin %75.6 gibi büyük bir kısmının duraklarının serbest şakşaklı olduğu belirlenmiştir. Köse (2006)'nin Uşak ili ve ilçelerinde yaptığı çalışmada da ahırların %76'sının bağlı duraklı, %16'sının kapalı serbest, %8'inin serbest tipten oluştuğu saptanmıştır. Bakır (2002) ise Van'daki büyükbaş hayvan işletmelerinin hiç birinde duraklarda yanlık demiri bulunmadığı bildirmektedir. Nizam, (2006)'ın yaptığı çalışmada ise incelenen işletmelerin ahır tipinin % 39 oranında serbest duraklı olduğu bildirilmektedir.

İşletme giderlerinin yaklaşık %60-70'inin yem giderlerinden oluştuğu bilinmektedir. Yemini kendi hazırlayan veya meradan faydalanan işletmelerde karlılık daha yüksek olacaktır. Oysa çalışmada incelenen işletmelerden %92.9'u hayvanları meraya çıkarmadığı gibi % 57.8'ininde de yemi hazır aldığı saptanmıştır. Ruminantların özellikle de süt ineklerinin beslenmesinde çok önemli olan kaliteli kaba yem ihtiyacının karşılanmasında silaj bir çok yönden avantajlı bir yem maddesidir. Türkiye'de halen istenilen düzeylerde olmasa da silaj yapımı ve kullanımının son yıllarda arttığı söylenebilir. Yapılan çalışmada işletmelerin % 93.5'in de silaj yapıldığı ve silajların beton havuz tipi silolarda saklandığı tespit edilmiştir. Bu oranın Türkiye ortalamasından daha yüksek olduğu söylenebilir. Köse (2006)'nin yaptığı bir çalışmada Uşak ilinde bulunan işletmelerin %52'sinde silaj üretimi yapılmadığı belirlenmiştir. Silaj yapılan işletmelerde (%42) ise genelde toprak üstü geçici silolama yapıldığı, sadece %6'sında betonarme silaj çukuru bulunduğu ifade edilmiştir. Van ilinde yapılan bir çalışmada ise

işletmelerin hiç birisinde silaj deposu bulunmadığı, yemlerin hayvanlara el arabası ve çuvallarla taşındığı belirlenmiştir (Bakır, 2002).

Kaliteli kaba ve konsantre yem temininin hayvanın sağlığını, verimini ve karlılığını etkileyeceği çok açıktır. Bu nedenle yem bitkileri ekimi, hasadı ve depolanması bir işletme için oldukça önemli bir konudur. Curabaz (2009)'ın Adana'da yaptığı bir araştırmada işletmelerde yem bitkisi olarak genelde arpa, yonca, fiğ ve yulaf yetiştirildiği, işletme arazilerinin %13.04'üne arpa, %3.90'ına yonca, %3.35'ine fiğ ve %0.24'üne yulaf ekildiği belirlenmiştir. Özüdoğru ve Tatlıdil (2012), süt sığırcılığı işletmelerinde kullanılmak üzere yem bitkisi olarak yonca, fiğ, silajlık mısır ayrıca dane yem ihtiyacını temin etmek üzere tahıllardan arpa ve buğday yetiştirilmekte olduğunu kaydetmişlerdir. Nizam (2006)'ın çalışmasında da işletmelerin genelinde silaj yapımında da kullanılmasından dolayı en çok mısır ekimi yapıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da işletmelerin %60.5'inde silajlık mısır ekildiği ve hasadının da hamur olum (%48.0) veya sert (dolgun) dane olum (%44) aşamasında yapıldığı görülmüştür. Araştırmada yonca ekimi yapan işletmecilerin oranı da %40.5 olarak bulunmuştur. Yonca hasadının %64.7 oranında çiçeklenme başlangıcında yapıldığı belirlenmiştir. İşletmelerin %62.2'sinde ot hasılı ekiminin yapıldığı, hasılın %30.4 oranında silaj yapımında kullanıldığı tespit edilmiştir. Araştırmada yeşil ot hasadının %42.1 oranında başaklanma öncesinde yapıldığı saptanmıştır. Literatürde başaklanma öncesine ilaveten tam çiçeklenme döneminde de hasat edilebileceği bildirilmiştir (Kaplan, 2013).

Yapılan bu çalışmada hayvanlara verilecek konsantre yem miktarı bazı işletmelerde sadece (%59.5) ineklerin süt verimi göz önüne alınarak belirlenirken bazıları (%40.5) hayvanların cüsse ve iştahının da dikkate alınarak belirlendiği saptanmıştır. Nizam (2006)'ın araştırmasında ise incelenen işletmelerin %21'inde tüm hayvanlara yiyebildiği kadar yem verilirken; %32'sinde verim gruplarına göre, %47'sinde ise verime göre bireysel yemleme yapıldığı belirlenmiştir.

İzmir bölgesindeki işletmelerin konsantre yemi öncelikle özel bayilerden (%51.2), sonra yem fabrikalarından (%41.5) aldıkları belirlenmiştir. Diğer yandan işletmelerin kaba (%78.3) ve konsantre yemleri (%86.7) yem depolarında sakladıkları ve yemleri alırken büyük oranda (%69.7) fiyat, kalite, güven, yönetim gibi fiziksel özelliklere bakarak aldıkları anlaşılmaktadır.

Yapılan çalışmada işletmelerin %76-77 sinde kaba veya konsantre yemin iki öğünde verildiği belirlenmiştir. Önal ve Özder (2008) de Edirne ili ve ilçelerindeki Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine kayıtlı işletmelerde yaptıkları çalışmada işletmelerin %63.2'sinde günde iki, %31.6'sında günde üç defa yemleme yapıldığını belirlemiştir.

Çalışmada elde edilen bulguların bazı literatürlerden farklı olması işletmelerin bulunduğu bölge, arazi miktarı ve yapısı, coğrafi yapı, sosyo-ekonomik durum, işletme tipi, yetiştiricilerin farklı tercih ve bilinç düzeylerine sahip olmalarından kaynaklanmış olması muhtemeldir.

Sonuç olarak, bu araştırmada İzmir ili ve ilçelerinde hastalıktan ari süt sığırcılığı işletmeleri sahiplerinin eğitim düzeylerinin yüksek olduğu, büyük bir kısmında veteriner hekim istihdam edildiği, işletmelerinin modern yapıda olduğu, silaj yapımının yaygın olduğu ancak bunların karlı bir hayvancılık için yeterli olmadığı özellikle kendi yemini üretmeleri konusunda teşvik edilmeleri gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Akman N. Pratik Sığır Yetiştiriciliği. Ankara: Türk Ziraat Müh Birliği Vakfı Yayını, 1998.
- Bakır G. Van ilindeki özel süt sığırcılığı işletmelerinin yapısal durumu. J Agric Sci 2002; 12(2):1-10.
- Curabaz A. Adana ilinde büyükbaş süt hayvancılık işletmelerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniv Fen Bil Ens, Adana 2009; s. 1-41.
- Kaplan M. Yaygın fiğ (vicia sativa L.) genotiplerinde hasat zamanının ot verim ve kalitesine etkisi. Erciyes Üniv Fen Bil Ens Derg 2013; 29(1):76-80.
- Köse K. Uşak ili damızlık sığır yetiştiricileri birliğine kayıtlı işletmelerin genel yapısı, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniv Fen Bil Ens, Tekirdağ 2006;1-84.
- Kutlar İ, Özçatalbaş O. Antalya ili merkez ilçesindeki süt sığırını yetiştiricileri birliği üyesi olan ve olmayan işletmelerde toplumsal cinsiyet analizi. Akdeniz Üniv Zir Fak Derg 2008;21(2): 241-50.
- Murat H. Ege ve Orta Anadolu Bölgesi damızlık sığır yetiştiricileri birliğine bağlı süt sığırcılık işletmelerinin ekonomik analizi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2011; s. 1-224.
- Nizam S. Aydın ilinde pazara yönelik süt sığırcılığı işletmelerinin verimliliklerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Adnan Menderes Üniv Fen Bil Ens, Aydın 2006; s. 1-100.
- Önal AR Özder M. Edirne ili damızlık sığır yetiştiricileri birliğine üye işletmelerin yapısal özellikleri. Tekirdağ Zir Fak Derg 2008; 5 (2); 197-203.
- Özüdoğru T, Tatlıdil F. Amasya damızlık sığır yetiştiricileri birliğinin yöre çiftçilerine ekonomik etkilerinin analizi. Ankara: T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Tepege Yayın No: 208, 2012.
- Sezer Y. Nevşehir ili süt sığırcılığının genel durumu

ve hayvan besleme alışkanlıkları Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniv Sağ Bil Enst, Kayseri 2019; s 1-148.

Soyak A, Soysal Mİ, Gürcan EK. Tekirdağ ili süt sığırcılığı işletmelerinin yapısal özellikleri ve bu işletmelerdeki siyah alaca süt sığırlarının çeşitli morfolojik özellikleri üzerine yaptıkları bir araştırma. Tekirdağ Zir Fak Derg 2007; 4 (3): 297-305.

Torgut E, Annayev S, Türkekul B, Çağla M, Kart Ö. Türkiye’de uygulanmakta olan hayvancılık desteklemelerinin süt sığırcılığı yapan işletmelere etkisi: İzmir ili örneği. Zir Fak Derg 2019; 14(1): 29-45.

Tugay A, Bakır G. Giresun yöresindeki özel süt sığırcılığı işletmelerinin ırk tercihleri ve barınakların yapısal durumu. Atatürk Univ Ziraat Fak Derg 2006; 37(1): 39-47.

Yener A. Konya ili Ereğli ilçesi süt işletmelerinin ekonomik faaliyetleri ve yenilikleri benimseme düzeyleri, Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniv Fen Bil Ens, Konya, 2013; s.1-120.

Yener H, Atalar B, Mundan D. Şanlıurfa ilindeki sığırcılık işletmelerinin biyogüvenlik ve hayvan refahı açısından değerlendirilmesi. Harran Üniv Vet Fak Derg 2013; 2(2):87-93.



İnkübasyon Çıkış Asitliğinin Geleneksel Olarak Üretilen Süzme Yoğurtların Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi

Engin YARALI, Şevki ÇETİNER

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Çine Meslek Yüksekokulu, Aydın-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Engin YARALI; E-posta: eyarali@adu.edu.tr; ORCID: 0000-0003-1525-0371

Atıf yapmak için: Yaralı E, Çetiner Ş. İnkübasyon çıkış asitliğinin geleneksel olarak üretilen süzme yoğurtların bazı kalite özellikleri üzerine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(3): 297-302.

Özet: Araştırmanın amacı, inek sütüne 85 °C'de ısıtma işlemi uygulayarak, bu sütlerden geleneksel yolla elde edilen süzme yoğurtların bazı kalite özellikleri üzerine, taze yoğurt inkübasyonu sonlandırma asitliğinin (pH) etkisini araştırmaktır. İşletmeye gelen çiğ sütlerde, pH, laktik asit cinsinden titrasyon asitliği (°SH), % yağ, % toplam kuru madde (KM) ve renk değerleri (L*, a*, b*, c, H) belirlenmiştir. Üretilen deneme süzme yoğurt örneklerinde toplam KM (%), yağ (%), renk, pH ve randıman (%) değerleri ölçülmüştür. Çalışmada yoğurt inkübasyonu süreleri, inkübasyon sonlandırma pH'sına (4.40, 4.20, 4.00) göre sırasıyla 279.33, 368.33 ve 788.07 dakika olarak ölçülmüştür. Süzme yoğurtta randıman değerleri sırasıyla % 34.47, % 33.40 ve % 29.57 olarak hesaplanmıştır. Süzme yoğurtta KM oranları sırasıyla % 24.30, % 23.25, % 24.60 ve yağ oranları sırasıyla % 9.69, % 10.47 ve % 10.67 olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon çıkış pH'sının bu anlamda süzme yoğurt örneklerinde KM ve yağ üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunurken (P>0.05), randıman (P<0.05) ve yoğurt inkübasyonu süresi (P<0.01) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.01). Süzme yoğurtlarda yapılan renk ölçümlerinde, ortalama L* değeri 94.44, a* değeri -1.66, b* değeri 9.43, c değeri 9.60 ve H değeri 100.14 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, yoğurt üretiminde inkübasyon pH'sının 4.40 veya 4.20 olarak ayarlanması ve inkübasyonun bu şekilde bitirilmesi işletmeler için daha ekonomik ve avantajlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: İnkübasyon, kimyasal özellik, süzme yoğurt

The Effect of Incubation Exit Acidity on Some Quality Properties of Traditionally Produced Strained Yoghurt

Summary: The aim of the research is to investigate the effect of fresh yogurt incubation finishing acidity (pH) on some quality properties of traditional strained yogurt obtained from this milk by applying heat treatment at 85 °C. pH, °SH, fat (%) dry matter (%) and color values (L*, a*, b*, c, H) were determined in raw milk. Total dry matter (%), fat (%), color, pH and production yield (%) were measured in the samples of trial strained yogurt produced. In the study, yogurt incubation times were recorded as 279.33, 368.33 and 788.07 minutes, respectively, according to incubation finishing pH (4.40, 4.20, 4.00). The yields of the strained yoghurt were calculated as 34.47%, 33.40% and 29.57%, respectively, according to the incubation output pH. The dry matters in strained yoghurt were identified as 24.30%, 23.25%, 24.60%, and fat ratios were 9.69%, 10.47% and 10.67%, respectively. In this sense, while the effect of incubation outlet pH on dry matter% and fat% in strained yogurt samples was found to be statistically insignificant (P>0.05), the effect on efficiency (P<0.05) and yoghurt incubation time (P <0.01) was very important. In color measurements made in strained yogurt, the mean L* value was 94.44, a* value was -1.66, b* value was 9.43, c value was 9.60 and H value was 100.14. As a result, it will be more economical and advantageous for businesses to adjust the incubation pH to 4.40 or 4.20 and to complete the incubation in this way in yoghurt production.

Key words: Chemical properties, incubation, strained yoghurt

Giriş

Sütün laktik asit fermentasyonu yöntemi ile işlenerek yoğurda dönüştürülmesi oldukça eski bir yöntemdir. Ancak bu üründe su oranının yüksek olması ve bakteriyel faaliyetlerinden dolayı raf ömrü sınırlıdır. Bu nedenle su oranının azaltılarak konsantre yoğurt elde etmek ülkemizde ve çeşitli ülkelerde kullanılan bir yöntemdir (Atamer ve ark., 1988). Ülkemizde çiğ süt üretimi 2018 yılında 22.120.716 ton olarak hesaplan-

mıştır. Yoğurt üretimi 2018 yılında bir önceki yıla göre %2.2 oranında artarak 1.19 milyon ton olmuştur. Kişi başına yoğurt tüketimi ise 30.6 kg olarak hesaplanmıştır (Anonim, 2018). Konsantre yoğurt ülkemizde "Torba Yoğurt" veya "Süzme Yoğurt" olarak ifade edilmektedir (Eralp, 1953; Yaygın, 1999; Terin ve Yavuz, 2015). Süzme yoğurt yumuşak ve kolay sürülebilir bir yapıda olup kuru madde oranı yüksektir. Protein yönünden zengin olan süzme yoğurtlarda renk, kullanılan süt türüne göre beyazdan sarıya değişmektedir. Ürün kendisine has tada, koku ve yapıya sahiptir. İsteğe göre yağ oranı farklı yoğurtlardan (inek, koyun, keçi ve manda sütlerinden) üretilebilir.

mektedir. Süzme yoğurdun randımanı %20-30 arasında değişmektedir (Demirci ve Gündüz, 2000).

Süzme yoğurt üretiminde geleneksel olarak uygulanan metot uzun zaman almakta ve hijyenik koşulların sağlanmasında güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bu yöntemde taze yoğurt elde edildikten sonra 24 saat buzdolabı sıcaklığında bekletilip bez torbalara aktarılmakta ve 12-24 saat süre ile süzölmeye bırakılmaktadır. Elde edilen ürünün kalitesi ise kullanılan hammaddeye, kültür tipi ve oranına, üretim metoduna ve hijyenik koşullara göre değişim göstermektedir (Atamer ve ark., 1988; Becker ve Puhan, 1989).

Ülkemizde, geleneksel bir ürün olan süzme yoğurt üretimi üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada amaç, sabit ısı işlem uygulanmış çiğ sütlerden elde edilen taze yoğurtlarda farklı inkübasyon çıkış asitliğinin, bu yoğurtlardan geleneksel yolla üretilen süzme yoğurdun bazı kalite özellikleri üzerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada hammadde olarak kullanılan çiğ inek sütü, Aydın-Çine ilçesinde faaliyet gösteren süt üreticisinden temin edilmiştir. Araştırmada elde edilen süzme yoğurtlar bu araştırma için üretilmiştir. İşletmeye gelen çiğ sütlerin Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği'ne uygun kriterlere sahip olduğu belirlenmiştir (Anonim, 2019). Araştırma Kasım 2019 tarihinde başlamış ve 9 hafta devam etmiştir. Her parti çiğ süttan TS EN ISO 707-Süt ve Süt Ürünleri-Numune Alma Kılavuzu'na (Anonim, 2009a) göre partiyi temsil edecek miktarda süt alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Çiğ süt numunelerinde yapılan tüm ölçümler 3 tekerür olarak gerçekleştirilmiştir. Alınan çiğ sütlerde ortalama KM oranı %11.70, ortalama SH değeri 7.11, ortalama pH değeri 6.72 ve ortalama yağ oranı % 3.72 olarak ölçülmüştür.

Ölçümleri yapılan sütlere çift cidarlı kazanda buhar ile ısı işlem uygulanmıştır. Gelen sütler pişirme kazanına alınmış ve sıcaklık 85 °C'ye ulaştığında ısı işlem sonlandırılmıştır. Isıl işlemi tamamlayan süt aynı kazanda eşanjör plakalı ısı değiştirici ile 48 °C'ye soğutulmuş ve aynı kazanda liyofilize yoğurt kültürü (Jointec VH712, İtalya), inoküle edilmiştir. Çalışmada ticari kültür oranı %60 *Lactobacillus bulgaricus* ve % 40 *Streptococcus thermophilus* olacak şekilde kullanılmış ve ilave edilecek kültür miktarı % 2 olarak belirlenmiştir. Kültür ilavesinden sonra pişirme kazanından inkübasyon dolabındaki çelik güğümlere gıda hortumu ile aktarılan inoküle edilmiş süt, inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sıcaklığı 45-46 °C'ye ayarlanmış ve inkübasyonunun sonlandırılması pH kontrolü ile yapılmıştır. Bunun için inkübasyon dolabına yerleştirilen inoküle edilmiş süt numunesine pH metre cihazının probu yerleştirilmiş ve asitlik dolap açılmadan takip edilmiştir. Ölçülen pH değeri ilk üç hafta

alınan sütlardan elde edilen taze yoğurtlarda 4.40, ikinci üç haftalık dönemde alınan sütlardan elde edilen taze yoğurtlarda 4.20 ve son üç haftalık periyotta alınan sütlardan elde edilen taze yoğurtlarda 4.00 değerine geldiğinde inkübasyon işlemi sonlandırılmıştır. Inkübasyonunu tamamlamış ürün bekletilmeden 10 °C'nin altında çalışan buzdolabına alınarak 12 saat süre ile soğumaya bırakılmıştır. Soğutma işleminden sonra güğümlerdeki ürün, süzme bezlerine aktararak 24 saat boyunca süzülmesi sağlanmış ve süre sonunda elde edilen süzme yoğurt tartılarak toplam miktarı (kg) belirlenmiştir.

Yoğurt örneklerinin KM (%), titrasyon asitliği (% laktik asit), yağ (%), Soxhlet-Henkel (°SH) ve pH analizleri Metin (2012) tarafından belirlenen yöntemlere göre yapılmıştır. Kuru madde tayini için RADWAG MA 50R marka halojen nem tayin cihazı, pH ölçümü için kalibre edilmiş MILWAUKEE MW 102 marka pH metre cihazı kullanılmıştır. Renk analizi 3NH TECHNOLOGIES NR200 model kolorimetre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için alınan süt numunesi cihazın sıvı kiti için hazırlanan bölmesine aktarılmış ve renk ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Süzme yoğurt numunelerdeki KM oranı halojen nem tayin cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Cihazın kalibrasyonu ve ayarları yapıldıktan sonra cihazın uygun bölmesine yerleştirilen süzme yoğurt örneğinde sonuç cihazın ekranından okunmuştur. Asitlik ölçümünde pH metre cihazı kullanılmış ve cihazın pH: 4.00 ve pH: 7.00 tampon çözeltiler ile kalibrasyonu yapıldıktan sonra uygun probu ürün numunesine daldırılmış ve cihazdan pH değeri okunmuştur. Örneklerin ölçüm sıcaklığı 13-14 °C'dir.

Süzme yoğurt örneklerinde yapılan yağ tayini için gerber metodu kullanılmıştır. Bunun için yağ bütirometresinin içerisine 10 ml H₂SO₄, 11 ml ¼ oranında sulandırılmış süzme yoğurt ve 1ml amil alkol koyulmuş ve aletin tipası kapatılmıştır. Bütirometre alt üst edilerek asidin numuneyi yakması sağlanmış ve bu işleme renk tamamen kahverengiye dönene kadar devam edilmiştir. Daha sonra bütirometre 1200 devir/dakika hızla çalışan santrifüjde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Okuma yapmadan önce 65-70 °C' de bekletilen tüpün skalasından okuma yapılmış ve sonuç 4 ile çarpılmıştır. Süzme yoğurt örneğinde renk tayini için renk ölçer cihazı kullanılmış ve cihazın okuma bölgesi süzme yoğurt numunesi üzerine getirilerek L* (parlaklık), a* (kırmızılık), b* (sarılık), c ve H değerleri okunarak kaydedilmiştir. Süzme yoğurttaki tüm ölçümler 3 tekerrür şeklinde yapılmış ve ölçüm sonuçlarının ortalaması ve standart hataları alınmıştır. Elde edilen veriler kaydedilerek sonuçlar istatistik olarak PASW Statistics 18 programında değerlendirilmiştir.

Bulgular**Tablo 1.** Çiğ sütün bazı fizikokimyasal özellikleri

Özellikler			
İnkübasyon çıkış pH	4.40	4.20	4.00
Toplam çiğ süt miktarı (kg)	571.00	555.00	589.00
Çiğ süt pişirme süresi ort. (dak.)	27.07	24.00	17.00
Çiğ süt KM oranı ort.(%)	11.65	11.90	11.56
Çiğ süt SH değeri ort.	6.80	7.59	6.93
Çiğ süt pH değeri ort.	6.66	6.75	6.75
Çiğ süt yağ oranı ort.(%)	3.85	3.76	3.54
Çiğ sütte renk ölçümleri (ort.)			
L*	84.47	58.06	60.74
a*	-2.68	-0.90	-0.79
b*	4.05	7.37	7.41
c	4.60	7.42	7.44
H	115.88	96.80	96.12
Isıl işlem görmüş sütte renk ölçümleri (ort.)			
L*	76.89	58.72	61.03
a*	-3.41	-1.71	-1.48
b*	3.78	6.81	7.11
c	5.27	7.02	7.22
H	133.40	104.10	101.75
İnkübasyon sıcaklığı (°C)	46	46	46
Toplam serum miktarı (kg)	375.98	370.59	414.74
Toplam süzme yoğurt miktarı (kg)	195.02	184.41	174.26

L*:Parlaklık, a*:kırmızılık, b*:sarılık, c:kroma, H:açı

Araştırmada belirlenen değerlere ait istatistik sonuçları Tablo 1' de verilmiştir. İnkübasyon çıkış pH'sının, inkübasyon süresi ile elde edilen süzme yoğurtların randıman, KM, yağ ve renk değerleri üzerine etkisi Tablo 2' de verilmiştir. Araştırmada elde edilen veriler ele alındığında, süzme yoğurtta randıman değerleri inkübasyon çıkış pH'sına (4.40, 4.20, 4.00) göre sırasıyla %34.47, %33.40 ve %29.57 olarak hesaplanmıştır. Süzme yoğurtta 3 tekerrürlü ölçümlerde ortalama yağsız KM oranları inkübasyon çıkış pH'sına göre

sırasıyla %24.30±2.45, %23.25±1.27 ve %24.60±0.91, ortalama yağ oranları sırasıyla %9.69±0.78, %10.47±0.81 ve %10.67±0.93 ve ortalama pH değerleri sırasıyla 3.83±0.03, 3.84±0.04 ve 3.97±0.17'dir. Yoğurt inkübasyon süreleri dakika olarak sırasıyla 279.33±29.56, 368.33±70.24 ve 788.07±143.64 olarak belirlenmiştir. İnkübasyon çıkış pH'sının bu anlamda süzme yoğurt KM, yağ ve pH üzerine etkisi önemsiz bulunurken, randıman (P<0.05) ve yoğurt inkübasyon süresi (P<0.01) üzeri-

Tablo 2. İnkübasyon çıkış pH'sının inkübasyon süresi, süzme yoğurt randıman, kuru madde, yağ ve renk üzerine istatistiki etkisi

Özellikler	pH:4.40	pH:4.20	pH:4.00	Ortalama
İNKs (dak.)	279.33±29.56**	368.33±70.24**	788.07±143.64**	478.44±248.75
SYR (%)	34.47±1.68*	33.40±2.43	29.57±2.58*	32.48±2.97
SYKM (%)	24.30±2.45	23.25±1.27	24.60±0.91	24.04±1.58
SYy (%)	9.69±0.78	10.47±0.81	10.67±0.93	10.27±0.86
SYpHb	3.84±0.05	3.98±0.08	3.94±0.04	3.92±0.08
SYpH	3.83±0.03	3.84±0.04	3.97±0.17	3.88±0.11
L*	94.83±1.57	94.79±0.17	93.70±0.47	94.44±0.99
a*	-2.02±0.68	-1.93±0.14	-1.03±0.28	-1.66±0.60
b*	8.83±1.05	9.39±0.15	10.08±0.54	9.43±0.81
c	9.08±1.08	9.59±1.73	10.54±0.12	9.60±0.56
H	102.92±3.86*	101.60±0.75	95.91±1.84*	100.14±3.89

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. İNKs: Süt inkübasyon süresi. SYR: Süzme yoğurt randıman. SYKM: Süzme yoğurt KM. SYy: Süzme yoğurt yağ. SKM: Çiğ süt KM. SYpH: Süzme yoğurt pH. SYpHb: Süzme yoğurt buzdolabı çıkış pH

ne etkisi ise istatistiki olarak önemli bulunmuştur. İnkübasyon çıkış pH'sının 4.00' a düşürülmesi özellikle randımanda azalmaya, elde edilen süzme yoğurt suyunda artışa ve inkübasyon süresinin uzamasına sebep olduğu ortaya konulmuştur. Süzme yoğurt örneklerinde üretimin çıkış pH'ına göre aynı anda yapılamaması ve partiler arası üretimin uzun sürmesi nedeniyle duyu analizler yapılamamıştır.

Süzme yoğurtta yapılan renk ölçümlerinde, ortalama olarak L* değeri 94.44±0.99, a* değeri -1.66±0.60, b* değeri 9.43±0.81, c değeri 9.60±0.56 ve H değeri 100.14±3.89 olarak ölçülmüştür. İnkübasyon çıkış pH değerinin sadece H değeri üzerine etkisi istatistiki olarak önemlidir (P<0.05). Araştırmada süzme yoğurtlarda L* ve b* değerinde yüksek değerler belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada, çiğ ve ısıtılmış süzme yoğurtta yapılan renk ölçümleri sonucunda tespit edilen değerler arasında önemli derecede pozitif ve negatif korelasyonlar saptanmıştır (Tablo 3).

(açı) ise renk canlılığını ifade etmektedir (Keskin ve ark., 2017, Xrite, 2007). Çiğ sütün ısıtılması ile sütteki bileşenler (laktöz ve proteinler) etkilenmekte ve doğal olarak süt ve yoğurdun renginde değişiklikler meydana gelmektedir. Burdur ilinde süzme yoğurt üretim teknolojilerine yönelik olarak yapılan bir çalışmada, dört farklı işletmeden alınan süt numunelerinde ortalama olarak KM oranı %11.31 ve SH 6.89 olarak hesaplanırken bu sütlerden üretilen süzme yoğurtlarda toplam KM %21.90, yağ %5.53, pH 3.69 ve SH 79.98 olarak bulunmuştur. İşletmede çiğ sütler 85 °C de 15-20 dak. ve 95 °C de 20 dk. ısıtılması uygulanırken, inkübasyon kış aylarında 36-50 °C de, yaz aylarında 43-50 °C de gerçekleştirilmiştir (Kırdar ve Gün, 2001). Yapılan başka bir çalışmada, Denizli satılan süzme yoğurtlardan 57 örnek alınmış ve bunların bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir. Araştırmada yaz ve kış sezonu torba yoğurtlarının KM içeriğinin %14.00 ile %31.67 arasında değiştiği görülmüştür. Aynı yoğurtlarda titrasyon asitliği %1.37 ile %2.41 arasında, yağ değeri %4.00-%

Tablo 3. Çiğ süt ve ısıtılmış süzme yoğurtta renk parametreleri arasındaki korelasyonlar

	Isıl İşlem Görmüş Süt				
	L*	a*	b*	c	H
Çiğ Süt L	0.910**	-0.902**	-0.941**	-0.929**	0.955**
Çiğ süt a*	-0.874**	0.940**	0.985**	0.979**	-0.984**
Çiğ süt b*	-0.872**	0.939**	0.975**	0.973**	-0.970**
Çiğ süt c	-0.833**	0.909**	0.979**	0.974**	-0.968**
Çiğ süt H	0.852**	-0.886**	-0.781*	-0.791*	0.801**

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. L*: Parlaklık değeri, a*: kırmızılık değeri, b*: sarılık değeri

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada inkübasyon çıkış pH'sının 4.40 ve 4.20 olacak şekilde sonlandırılması, süzme yoğurdun özellikleri ve randımanı üzerine etkili olmazken, pH'nın 4.00'a düşürülmesi elde edilen süzme yoğurt suyunda artışa ve doğal olarak randımanda düşüşe sebep olmuştur. Bu olay pH'nın etkisinden kaynaklanmaktadır. Çünkü proteinlerin su tutma kapasitesinde asitlik önemli bir parametredir. Asitlik düzeyi, ürünün yapısında ve serum ayrılmasında etkili bir faktördür. Düşük asitlikte proteinlerin su tutma kapasiteleri yeterli değilken, yüksek asitlikte söz konusu özellikte azalış görülmektedir. Proteinlerin su tutma kapasiteleri 4.0-4.6 pH aralığında artmakta, buna bağlı olarak viskozite de düşmektedir ve serum ayrılması düşüşe geçmektedir (Rasic ve Kurman, 1978).

Bu araştırmada süzme yoğurtlarda hesaplanan yağ, KM, pH ve renk değerlerine ait sonuçlar, bu konuda yapılan bazı çalışmalar ile uyumluluk gösterirken (Kırdar ve Gün, 2001; Gökçe ve ark., 2001), özellikle KM ve yağ oranı açısından bu çalışmada daha yüksek oranlar kaydedilmiştir. Renk ölçümlerinde L* değeri parlaklığı ifade ederken (L*=0 siyah ve L*=100 beyaz), c değeri renk (Chroma) değeri olup, H değeri

10.40 arasında değişmiştir (Gökçe ve ark., 2001). Isparta ve Burdur illerinden toplanan 22 adet süzme yoğurt örneğinde yapılan başka bir çalışmada, KM %17.84-27.72, yağ %2.00-7.45, titrasyon asitliği % 0.78-2.00 ve pH 3.65-4.22 arasında bulunmuştur. Çalışmada renk ölçümlerinde L değeri 91.97, a* değeri -2.10 ve b* değeri 8.16 olarak belirlenmiştir (Şimşek ve ark., 2010). Farklı asitliklerdeki yoğurtlardan torba yoğurt üretimi şeklinde yapılan bir çalışmada, torba yoğurtlardaki asitliğin önemli derecede etkilendiği (P<0.05) görülmüş, torba yoğurtlarda ortalama pH değeri 3.60, KM % 17.24 ve yağ % 5.08 olarak hesaplanmıştır (Şahan ve ark., 2004).

Atamer ve ark. (1988), Ankara'da tüketime sunulan süzme yoğurtlarda yaptıkları çalışmada, 2 örnekte ortalama toplam KM yi %19.41±3.12, yağ değerini % 2.54±2.54, pH'yı 3.52±0.13 ve titrasyon asitliğini ise %2.26±0.25 süt asidi olarak belirlemişlerdir. Torba (süzme) yoğurt üretiminde yapılan bir başka çalışmada, KM içerikleri %12.75, %14.06 ve %15.50 olan yoğurtlardan üretilen torba yoğurtlarda KM oranları sırasıyla %24.67, %23.11 ve %22.58; yağ oranları % 8.15, %7.5 ve %8.84 olarak bulunmuştur (Atamer ve ark., 1990). Kırklareli ve civarında üretilen 26 adet yoğurt örneğinin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik

özellikleri belirlenerek Türk Gıda Kodeksi'ne uygunluğu açısından değerlendirildiği bir araştırmada ise, yoğurt örneklerinin pH değeri 3.90-5.25, laktik asit cinsinden asitlik değeri %0.10-1.88 arasında bulunmuştur (Çetin ve ark., 2014). Konya ilinde yapılan diğer bir araştırmada, 45 adet süzme yoğurt numunesi incelenmiş ve numunelerde KM, yağ ve laktik sit cinsinde asitlik değerleri sırası ile % 19.06-%32.04, % 7.00-%16.2 ve 1.53–2.25 aralığında bulunmuştur (Tekinşen ve ark., 2008).

Erzurum ilinde rastgele olarak alınan 13 adet torba yoğurdu üzerinde yapılan bir araştırmada ortalama değerler olarak KM %32.36 ve yağ oranı %7.58 olarak bulunmuştur (Çağlar ve Ceylan, 1997). Afyonkarahisar ili halk pazarlarında satışa sunulan konsantre yoğurtlarda yapılan çalışmada, süzme yoğurt örneklerinde pH 3.51±0.36, titrasyon asitliği %2.09±0.11, yağ %5.36±0.14, KM %23.88±2.17 ve protein % 6.14±1.08 olarak bulunmuştur (Akarca ve Tomar, 2019).

Düzenli yoğurt tüketimi, yetişkinlerde immün (bağışıklık) sistemini güçlendirmektedir. Bu etki, asidik bir ürün olan yoğurdun, bağırsaklarda asitliği artmasına paralel olarak zararlı mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmesi ve yoğurt bakterilerinin bağırsak çeperlerine tutunarak ortama hâkim olmaları şeklinde açıklanmaktadır (Kırdar ve Gün, 2007).

İnkübasyon çıkış asitliği ve buna bağlı olarak inkübasyon süresi yoğurt üretiminin en önemli işlem basamaklarından birisidir. Bu bağlamda inkübasyon parametrelerinin seçimi önem kazanmaktadır. pH 4.2-4.6 arasında yoğurdun su tutma kapasitesi optimum olduğundan, üretimde pH 4.5-4.6 dolayına geldiğinde inkübasyona son verilmektedir. İnkübasyonda ilk önce *L. bulgaricus* üremeye başlar ve bu bakterinin proteolitik enzim aktivitesi *S. thermophilus*'a göre daha yüksektir. Üremek için kazein, H₂S ve formiat kullanır ve kükürtlü aminoasitleri üretir. 43 °C'de *S. thermophilus* kükürtlü aminoasitleri kullanarak üremeye başlar. Yaklaşık 2 saat sonunda, starter kültürlerin oluşturduğu laktik asit nedeni ile pH 5.2-5.3 seviyesine düşer. Kazeinat partiküllerinin stabilizasyonu bu aşamada bozulur. Kalsiyum ve fosfat, kazein kompleksinden yavaş yavaş ayrılır ve iyonize duruma geçer. Bu aşama ilk pıhtının olduğu aşama olup pH 4.6' da her iki bakterinin düzeyi eşitlenir (Özer, 2006; Vedamuthu, 2006). Bu çalışmanın önemli bir yanı, süzme yoğurt üretimlerinin üniversite bünyesindeki uygulama biriminde kontrollü olarak yapılmasıdır. Üretimde inkübasyon süresi iyi ayarlanmadığı takdirde beklenen kalite, randıman ve yapıda yoğurt elde edilemez. Bu araştırmada inkübasyon asitliğinin ve buna bağlı olarak sürenin, inkübasyon çıkış asitliğinden etkilendiği görülmektedir. Dolayısıyla pH'nın 4.40 veya 4.20 olarak ayarlanması ve inkübasyonun bu şekilde bitirilmesi işletmeler için daha ekonomik ve avantajlı olacaktır.

Araştırmada elde edilen bulgular ile aynı konuda yapılan benzer çalışmalar (Atamer ve ark., 1988; Çağlar ve ark., 1997; Gökçe ve ark., 2001) arasında farklılıklar bulunmaktadır. Farklılıklar; hammadde olarak kullanılan çiğ sütün kalitesinden, çiğ süte uygulanan proseslerden, yararlanılan starter kültürün tipi ve oranından, elde edilen ürünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. İlaveten depolama, ambalajlama, nakliye ve satış aşamalarındaki uygulamalarda bu anlamda etkilidir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliğinde ilgili kısımda yoğurtlarda yağ oranı en az %3.8 ve yağsız KM oranı ağırlıkça en az %12 olarak belirtilmektedir (Anonim, 2009b).

Sonuç olarak, taze yoğurtta inkübasyon çıkış pH'sının değiştirilmesi, elde edilen süzme yoğurt özelliklerinde bir takım etkiler yaratmıştır. Bu anlamda inkübasyon çıkış pH'sının 4.40 değerinden 4.00' a düşürülmesi, özellikle süzme yoğurt randımanında azalmaya, süzme yoğurt suyu miktarında artışa ve inkübasyon süresinde uzamaya sebep olmuştur. İşletmelerde yapılacak olan planlama ile taze yoğurtta inkübasyonun pH 4.40 veya 4.20 de sonlandırılması, elde edilecek süzme yoğurtların daha ekonomik olarak üretilmesine olanak sağlayacaktır. İlaveten, Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde özellikle süzme yoğurtta önemli bir kriter olan kuru madde miktarı ile asitlik değerlerinin (% asitlik, pH veya SH) de yer alması gerekmektedir. Bu değerlerin tebliğde olmamasının, tüketicinin hilelere maruz kalmasına, hile yapmayan firmalara karşı haksız rekabetin oluşmasına ve sonuçta yoğurt kalitesinin bozulmasına yol açacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından ÇMYO-19001 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim. TS EN ISO 707. Milk and milk products Guidance on sampling quality, 2009a; https://archive.org/stream/et.iso.707.2012/et.iso.707.2012_djvu.txt; Erişim Tarihi: 15.03.2020.
- Anonim. Türk Gıda Kodeksi, Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara. 2009b; Resmi Gazete, Sayı: 27143.
- Anonim. Dünya ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri, Ulusal Süt Konseyi Raporu, 2018; https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Sut_Raporu_2018_Web_Kapakli.pdf; Erişim Tarihi: 15 Mart 2020.
- Anonim. Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği (Tebliğ No: 2019/12). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı,

- Ankara, 2019; Resmi Gazete, Sayı: 30699.
- Akarca G, Tomar, O. Afyonkarahisar ili semt pazarlarında satılan süzme (kese) yoğurtların kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Akademik Gıda 2019; 17 (2): 212-6.
- Atamer M, Sezgin E, Yetişemeyen A. Torba yoğurtların bazı niteliklerinin araştırılması. Gıda 1988; 13 (4): 283-8.
- Atamer M, Yetişemeyen A, Ergül E, Dağlıoğlu O, Yıldırım M. Torba yoğurdu üretiminde, kurumadde ve bileşenlerinin torbada tutulma ve serumdaki kayıpları üzerine bir araştırma. Gıda 1990; 15(1): 35-9.
- Becker T, Puhan Z. Effect of different processes to increase the milk solids non fat content on the rheological properties of yoghurt. Milchwissenschaft 1989; 44: 626-9.
- Çağlar A, Ceylan ZG, Kökosmanlı M. Torba yoğurtlarının kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine bir araştırma. Gıda 1997; 22(3): 209-15.
- Çetin B, Atik A, Karasu S. Kırklareli'nde üretilen yoğurt ve ayranların fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Akademik Gıda 2014; 12(2): 57-60.
- Demirci M, Gündüz HH. Süt Teknoloğünün El Kitabı. Hasad Yayıncılık. Gıda Serisi 1. İstanbul, 2000; s. 191.
- Eralp M. Torba Yoğurdu. Ankara: Nur Matbaası, 1991; s. 8.
- Gökçe R, Çon AH, Gürsoy O. Denizli'de yaz ve kış mevsimlerinde üretilen torba yoğurtların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Pamukkale Üniv Müh Fak Derg 2001; 7(1): 81-6.
- Keskin M, Setlek P, Demir S. Use of color measurement systems in food science and agriculture. International Advanced Researches & Engineering Congress. November, 16-18, 2017; Osmaniye-Turkey.
- Kırdar SS, Gün İ. Burdur' da süzme yoğurt üretimi üzerine bir araştırma. Gıda 2001; 26(2): 99-107.
- Kırdar SS, Gün İ. Süzme yoğurt üretiminde elde edilen serumun bazı özellikleri. SDÜ Fen Bil Enst Der 2007; 11(1): 26-8.
- Metin M. Süt ve Mamulleri Analiz Yöntemleri, Ege Üniversitesi Yayınları. Rektörlük Yayın No:9. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 2012; s. 439.
- Özer B. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Şanlıurfa; Sidas Medya Ltd Şti, 2006; s. 264-5.
- Rasic JL, Kurman JA. Yoghurt, fermented fresh milk products. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978; p.11-3.
- Şahan N, Güven M, Kaçar A. Farklı asitliklerdeki yoğurtlardan torba torba yoğurdu üretimi ve netamisinin raf ömrü üzerine etkisi. Gıda 2004; 29(1): 9-15.
- Şimşek B, Gün İ, Çelebi M. Isparta yöresinde üretilen süzme yoğurtların protein profilleri ve bunların kimyasal özelliklerle ilişkisi. YYÜ Tar Bil Derg 2010; 20 (3): 208-13.
- Tekinşen KK, Nizamlıoğlu M, Baya, N, Telli N, Köseoğlu İE. Konya'da üretilen süzme (torba) yoğurtların bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. Vet Bil Derg 2008; 24(1): 69-75.
- Terin M, Yavuz F. Türkiye bölgeler arası optimum süt ve ürünleri akışı: Spatial denge modeli. Ege Univ Ziraat Fak Derg 2015; 52(2): 207-17.
- Vedamuthu ER. Starter Cultures for Yogurt and Fermented Milks. In RC Chandan Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. Iowa: Blackwell Publishing, 2006; p. 88-115.
- Xrite A. Guide to Understanding Color Communication. Michigan: Xrite, 2007; p. 26.
- Yaygın, H. Yoğurt Teknolojisi. Antalya: Akdeniz Üniv Basımevi Yayın No: 75, 1999; s. 331.



Determination of Phenotypic and Genome Characteristics of *Chryseobacterium* sp. C-204 Strain Isolated from Rainbow Trout

Izzet Burcin SATICIOĞLU¹, Muhammed DUMAN², Soner ALTUN²

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Aquatic Animal Disease Department, Kayseri-TURKEY

²Bursa Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, Aquatic Animal Disease Department, Bursa-TURKEY

Corresponding author: Izzet Burcin Saticioglu; E-mail: iburcinsat@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2721-3204

How to cite: Saticioglu IB, Duman M, Altun S. Determination of phenotypic and genome characteristics of *Chryseobacterium* sp. C-204 strain isolated from rainbow trout. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 303-311.

Summary: In recent years, species in the *Chryseobacterium* genus have emerged as opportunistic fish pathogens that can cause death in fish in many countries. In the last decade, *C. aahli*, *C. oncorhynchi*, *C. chaponense*, and *C. piscicola* have been reported to cause systemic infections in fish. In the present study, *Chryseobacterium* sp. C-204 was isolated from 1g weight rainbow trout showing clinical signs such as abnormal swimming, dorsal skin ulceration, darkening in color, and bilateral exophthalmos. The detailed phenotypic characteristics of the C-204 were characterized by API 20NE, and the BIOLOG GEN III system includes 106 phenotypes. Antimicrobial susceptibility of the C-204 was also determined by the broth microdilution method against five antimicrobial agents commonly used in the Aquaculture. Sequence-based identification was done using 16S rRNA genome sequencing. The genome structure of the C-204 was revealed by using next-generation genome sequencing with reading a total of 24195304 bases and assembled in 4012452 base. Genome-based species delineation of C-204 was done 100 different housekeeping gene regions and 50 the closest *Chryseobacterium* species with Automated Multi-Locus Species Tree (autoMLST, <https://automlst.ziemertlab.com>). Antimicrobial resistance genes (AMR) and virulence genes in the C-204 genome were identified using the Virulence Factor Database (VFDB) NCBI-reference antimicrobial resistance genes database. The 16S rRNA sequence of C-204 isolate had similarities with the *C. aquaticum* (99.65%) and *C. greenlandense* (98.95%) in GenBank. In parallel 19 biochemical tests, C-204 isolate can be differentiated from the closest type strains by nitrate reduction and inability to produce acid from glucose. With regard to antimicrobial susceptibility, the C-204 isolate can grow even at high antimicrobial concentrations determined for *Flavobacteriaceae*. According to genome-based species delineation, the C-204 isolate was identified as *Chryseobacterium aquaticum* subsp *greenlandense*. 13 virulence and eight AMR genes were detected in the genome of the C-204 isolate. Conclusively, the detailed phenotypic characteristic includes 106 biochemical test and genome structure of C-204 isolate by whole genome sequencing were determined.

Key words: Antimicrobial resistance genes, *Chryseobacterium* sp., virulence genes

Gökkuşluğu Alabalıklarından İzole Edilen *Chryseobacterium* sp. C-204 Suşunun Fenotipik ve Genom Özelliklerinin Belirlenmesi

Özet: Son yıllarda *Chryseobacterium* cinsinde bulunan türler, birçok ülkede balıklarda ölümlere neden olabilen fırsatçı balık patojenleri olarak ortaya çıkmaktadır. Yalnızca son on yılda *C. aahli*, *C. oncorhynchi*, *C. chaponense* ve *C. piscicola*'nın balıklarda sistemik enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *Chryseobacterium* sp. C-204, anormal yüzme, sırt lezyonu, renkte koyulaşma ve iki taraflı egzozfalmi gibi klinik belirtiler gösteren 1 gram ağırlığındaki gökkuşluğu alabalığından izole edildi. C-204'ün 106 farklı testi içeren fenotipik özellikleri API 20NE ve BIOLOG GEN III sistemi ile karakterize edildi. C-204'ün antimikrobiyal duyarlılığı, su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan beş farklı antimikrobiyal ajana karşı broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Dizi analizi bazlı tür tanımlama, 27F ve 1387R primerleri kullanılarak yapıldı. C-204'ün tüm genom analizinde, yeni nesil dizilime sistemi kullanıldı ve toplam 24195304 okuma elde edildi. Bu okumalar birleştirilerek 4012452 baz uzunluğunda taslak genom elde edildi. C-204'ün genomu dayalı tür tanımlaması, 100 farklı korunmuş gen bölgesi ve en yakın 50 *Chryseobacterium* türü ile autoMLST sisteminde (<https://automlst.ziemertlab.com>) yapıldı. C-204 genomundaki antimikrobiyal direnç genleri (AMR) ve virülans genleri, NCBI referans antimikrobiyal direnç genleri veritabanı ve Virülans Faktör Veritabanı (VFDB) kullanılarak tanımlandı. C-204 izolatının 16S rRNA gen bölgesinin, GenBankta *C. aquaticum* ile %99.65 ve *C. greenlandense* ile %98.95 oranında benzerliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Ortak yapılmış olan 19 biyokimyasal testte, C-204 izolatu nitrat indirgeyebilmesi ve glikozdan asit üretmemesi testleri ile diğer tip suşlardan ayrılabilirdi belirlenmiştir. Antimikrobiyal duyarlılıkla ilgili olarak, C-204 izolatının yüksek antimikrobiyal konsantrasyonlarında bile üreyebildiği tespit edilmiştir. Genom bazlı tür tanımlamasına göre, C-204 izolatu, *Chryseobacterium aquaticum* subsp *greenlandense* olarak tanımlandı. Ayrıca, C-204 suşunun genomunda 13 virülans ve sekiz AMR geni tespit edildi. Çalışmamızda sonuç olarak, C-204 izolatının 106 biyokimyasal özellik içeren detaylı fenotipik ve tüm genom dizi analizine dayalı genom yapısı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal direnç geni, *Chryseobacterium* sp., virülans geni

Introduction

In the last thirty years, aquaculture has grown rapidly in Turkey, and the total amount of products obtained from 2286 farms in 2018 reached 276502 tons, and total fisheries exports reached \$952 million (BSGM, 2020). With the rapid development of aquaculture, economic losses from diseases caused by pathogens have also increased. The family of *Flavobacteriaceae* has a considerable sizeable ecological habitat. The species in this family; Invertebrates, amphibians, reptiles, birds, and even human beings can cause infections in mammals. Among the species causing fish infection in the *Flavobacteriaceae* family, there are significant species such as *Flavobacterium* sp., *Tenacibaculum* sp., and *Chryseobacterium* sp. It has been reported that *Chryseobacterium* species are isolated from different clinical cases (pneumonia, peritonitis, surgical wound infections, burn wounds, eye infections, newborn pneumonia, etc.) in humans (Loch and Faisal, 2015a). *Chryseobacterium* species have been reported to cause economic losses in many fish species on different continents. Only in recent years *C. piscicola*, *C. chaponense*, *C. aahli*, and *C. oncorhynchi* have been reported to cause systemic infections in fish (Hugo et al., 2019).

There are not many studies on whether the detected *Chryseobacterium* species are the main cause of the disease. In a limited number of studies, it was reported that *C. balustinum*, *C. piscicola*, and *C. aahli* fulfill Koch postulates, but there is no study on other *Chryseobacterium* species (Ilardi et al., 2009; Loch and Faisal, 2015b, 2014).

In our study, it was aimed to determine the comprehensive phenotypic characterization, genome analysis, and antimicrobial susceptibility of *C. aquaticum* subsp. *greenlandense* C-204 isolate isolated from rainbow trout showing disease symptoms such as dorsal skin ulceration, darkening in color, and bilateral exophthalmia.

Materials and methods

Bacterial isolate and phenotypic characterization

In our study, the C-204 isolate was isolated from a rainbow trout, weighing about 1 gram in the trout farm located in the Aegean region, 2015, showing signs of abnormal swimming, dorsal lesion, darkening in color, and bilateral exophthalmos was used. This research was approved by Bursa Uludag University, the Local Ethics Commission (report 2012-14/04).

In primary isolation, Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) agar was used, and the agent was incubated at 25°C for 48 hours. Conventional microbiological tests such as Gram staining, motility, oxidase, presence or absence of flexirubin pigment, catalase activity were used in phenotypic characterization of strains

(Loch et al., 2013). The morphological and biochemical profiles of C-204 isolate were determined using the Biolog GEN III microplate (Biolog, Hayward, CA, USA) and API 20NE (Biomerieux, France) tests. Unlike the manufacturer's protocol, the incubation temperature and time were modified to optimum growth values of C-204 isolate (48h incubation at 25°C).

Sequence analysis based on 16S rRNA gene

DNA extraction of C-204 isolate was performed according to the spin column filtration (QIAamp DNA Minikit; Qiagen, Hilden, Germany) method. PCR and sequence analysis was performed using 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC 118 AG-3') and 1387R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') based on the 16S rRNA gene region (Loch et al., 2013). The obtained chromatograms were aligned and identified in the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) server database in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Whole-genome sequencing

The sequencing library was prepared using Nextera XT DNA Library Preparation Kit, and sequencing was done by Illumina NovaSeq 6000 platform as paired-end (PE) 2x150 bases reads with using a 500-cycle MiSeq reagent kit (Cooper et al., 2015). The Fastq file obtained from the sequence analysis was uploaded to Geneious Prime (version 2020.1.2). The reads with low-quality scores (<20) or poly-Ns and adaptor contamination were then trimmed using BBDuk as implemented in Geneious Prime (Kearse et al., 2012). The high-quality reads of C-204 were assembled into contig by de novo assembly using SPAdes assembler 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). The draft genome sequence has been recorded to Genbank with SAMN15009847 and PRJNA634826 BioSample and BioProject number, respectively.

Genomic data analysis

Genome-based species delineation of C-204 was created using Automated Multi-Locus Species Tree (autoMLST, <https://automlst.ziemertlab.com>). In phylogenetic analysis, 100 different housekeeping gene regions of C-204 and 50 the closest *Chryseobacterium* species genomes were used. A high-resolution species tree was created using the web-based autoMLST program (Alanjary et al., 2019). Annotation of the C-204 genome was performed using NCBI-Automatic Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016). Virulence genes in the C-204 genome were identified using the Virulence Factor Database (VFDB), while the antimicrobial resistance genes were identified by searching BLASTX (E-value <1e-50) in the Geneious Prime software using the NCBI-reference antimicrobial resistance genes database (Feldgarden et al., 2019; Kearse et al., 2012; Lee et al., 2019).

Table 1. All phenotypic characteristics of the *C. aquaticum* KCTC 12483, *C. greenlandense* UMB34, and *Chryseobacterium* sp. C-204 isolate

	Dextrin	D-Maltose	D-Trehalose	D-Cellobiose	Gentiobiose	Sucrose	D-Turanose	Stachyose	+ Control	pH 6	pH 5
	C(+), A(+)	C(+), A(+), G(+)	C(+), A(+), G(+)	C(-), A(+)	C(+), A(+), G(+)	C(+), A(+), G(+)	C(-), A(+)	C(-)		C(+)	C(-)
D-Raffinose	α-D-Lactose	D-Melibiose	β-Methyl-D-Glucoside	D-Salicin	N-Acetyl-D-Glucosamine	N-Acetyl-β-DMannosamine	N-Acetyl-DGalactosamine	N-Acetyl Neuraminic Acid	1% NaCl	4% NaCl	8% NaCl
C(-), A(+)	C(-), A(-)	C(-), A(+)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(-), A(-), G(-)	C(-), A(-), G(-)	C(-), A(+)	C(-)	C(+)	C(-)	C(-)
α-D-Glucose	D-Mannose	D-Fructose	D-Galactose	3-Methyl Glucose	D-Fucose	L-Fucose	L-Rhamnose	Inosine	1% Sodium Lactate	Fusidic Acid	D-Serine
C(+), A(+), G(+)	C(+), A(+), G(+)	C(+), A(+), G(+)	C(-), A(+)	C(-)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(+), A(+)	C(-), A(-)	C(+)	C(-)	C(-), A(-)
D-Sorbitol	D-Mannitol	D-Arabitol	myo-Inositol	Glycerol	D-Glucose 6-PO4	D-Fructose 6-PO4	D-Aspartic Acid	D-Serine	Trolean-domycin	Rifamycin SV	Minocycline
C(-), A(+)	C(-), A(-), G(-)	C(-), A(+)	C(-), A(+)	C(-), A(-)	C(+), A(+)	C(+)	C(-)	C(-), A(-)	C(+)	C(-)	C(-)
Gelatin	Glycyl-L-Proline	L-Alanine	L-Arginine	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Histidine	L-Pyrogutamic Acid	L-Serine	Lincomycin	Guanidine HCl	Niaproof 4
C(+), A(+), G(+)	C(+)	C(-), A(+)	C(-), A(-), G(-)	C(+), A(+)	C(+), A(+)	C(-), A(-)	C(-), A(+)	C(-), A(+)	C(-)	C(+)	C(-)

Pectin	D-Galacturonic Acid	L-Galactonic Acid Lactone	D-Gluconic Acid	D-Glucuronic Acid	Glucuronamide	Mucic Acid	Quinic Acid	D-Saccharic Acid	Vancomycin	Tetrazolium Violet	Tetrazolium Blue
C(+)	C(+), A(+)	C(+), A(-)	C(+), A(+)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(-)	C(-)	C(-), A(-)	C(-)	C(+)	C(+)
p-Hydroxy Phenylacetic Acid	Methyl Pyruvate	D-Lactic Acid Methyl Ester	L-Lactic Acid	Citric Acid	α-Keto-Glutaric Acid	D-Malic Acid	L-Malic Acid	Bromo-Succinic Acid	Nalidixic Acid	Lithium Chloride	Potassium Tellurite
C(-), A(-)	C(+), A(+)	C(-)	C(+), A(-)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(-)	C(-)	C(-), A(-)	C(+)	C(-)	C(+)
Tween 40	γ-Amino-Butyric Acid	α-Hydroxy Butyric Acid	β-Hydroxy-D, L-Butyric Acid	α-Keto-Butyric Acid	Acetoacetic Acid	Propionic Acid	Acetic Acid	Formic Acid	Aztreonam	Sodium Butyrate	Sodium Bromate
C(+), A(+)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(-), A(-)	C(-), A(V)	C(+)	C(-), A(+)	C(+), A(+)	C(-), A(+)	C(+)	C(-)	C(-)
Reduction of nitrites to nitrites	L-tryptophane	D-glucose (Fermentation)	Urea	Esculine	4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	L-arabinose	Potassium gluconate	Capric acid	Adipic acid	Trisodium citrate	Phenylacetic acid
C(+), A(-), G(-)	C(-), A(-), G(-)	C(-), A(+), G(+)	C(-), A(-), G(-)	C(+), A(+), G(+)	C(-), G(-)	C(-), A(-), G(-)	C(-), A(-), G(-)	C(-), G(-)	C(-), G(-)	C(-), G(-)	C(-), G(-)

C: *Chryseobacterium* sp. C-204; **A:** *C. aquaticum* KCTC 12483; **G:** *C. greenlandense* UMB34; **V:** Variable

Antimicrobial susceptibility testing (AST)

Antimicrobial susceptibility level was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) testing against Oxytetracycline (OXY), Florfenicol, (FLO), Amoxicillin (AMO), Enrofloxacin (ENR), and Sulfamethoxazole-Trimethoprim (TRS) with 0.008 and 256 mg/L concentrations. *E. coli* ATCC 25922 was used as quality control (QC) strain (CLSI, 2014a, 2014b). After incubation at 22 °C for 48-72h, plates were measured at a wavelength of 595 nm in a microplate reader (Multiscan Go, Thermo), and MICs were defined as the lowest concentrations of antibiotic that inhibited growth.

Results

The C-204 isolate was isolated from the kidney in rainbow trout in the bacteriological sampling. The isolate was gram-negative, non-motile, oxidase, cata-

including L-arabinose, D-mannitol, N-acetyl glucosamine, potassium gluconate, capric acid, adipic acid, malic acid, trisodium citrate, or phenylacetic acid. The isolate hydrolyzed gelatin and esculin but did not hydrolyze 4-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside (PNPG). It reduced nitrate to nitrite, but not produced indole, arginine dihydrolase. Furthermore, the production of acid from glucose was negative. All phenotypic characteristics of the closest two species and C-204 isolate are presented in Table 1. It was determined that the 16S rRNA sequence of C-204 isolate had similarities with the NCBI reference sequences in GenBank with *C. aquaticum* (99.65%) and *C. greenlandense* (98.95%).

MIC values of C-204 isolate were determined for FLO= 16 mg/L, OXY= 4mg/L, AMO= 16mg/L, TRS= 4/76mg/L and ENR= 0.064mg/L. The MIC values of the QC strain (*E. coli* ATCC 25922) were within the

Table 2. Genomic characteristics of *Chryseobacterium* sp. C-204 isolate

Characteristics	C-204
GeneBank ID	JABSUA000000000
Genome Coverage	394.0X
Genome size (bp)	4012452
No. contigs	23
N50 contig size	362647
Largest contig size	954203
GC-content (%)	339
Total genes	3661
Protein-coding genes (CDS)	3590
tRNAs	65
Pseudogenes ^a	37

^aThe number of total Pseudogenes indicated includes genes with ambiguous residues, frameshifted genes, incomplete genes, genes with internal stopes, or other multiple problems.

lase, and flexirubin pigment positive. C-204 assimilated D-glucose, D-maltose, and D-mannose, but not the other substrates present on the API 20 NE strip,

acceptable range recommended by the CLSI standards (CLSI, 2014b).

Table 3. Putative AMR and virulence genes annotated in C-204 genome

Antimicrobial Resistance Gene		
Resistance Mechanism	AMR Genes	Antimicrobial Class
Antibiotic efflux	<i>taeA</i> , <i>oqx</i> B23, <i>oqx</i> B7, <i>tet</i> (60)	Pleuromutilin, Tetracycline, Glycylcycline, Diaminopyrimidine, Nitrofurantoin, Fluoroquinolone
Antibiotic inactivation	<i>bla</i> _{GOB-8} , <i>bla</i> _{CIA-1}	Penam, Cephalosporin, Carbapenem
Antibiotic target alteration	<i>mupB</i>	Mupirocin
Antibiotic target protection	<i>optrA</i>	Pleuromutilin, Tetracycline, Oxazolidinone, Lincosamide, Streptogramin, Macrolide, Fenicol
Virulence Genes		Mechanism
<i>eno</i> , <i>htpB</i> , <i>pgi</i> , <i>dnaK</i> , <i>icl</i> , <i>KOX_00005</i> , <i>clpC</i> , <i>CarB</i> , <i>Zmp1</i> , <i>AdeG</i> , <i>LigA</i> , <i>rpoN</i> , <i>clpB</i>		Adhesion, Invasion, Biofilm production, Proliferation in Macrophages, Escape from Phagocytosis, Inflammation activation and prevention of IL-1b production

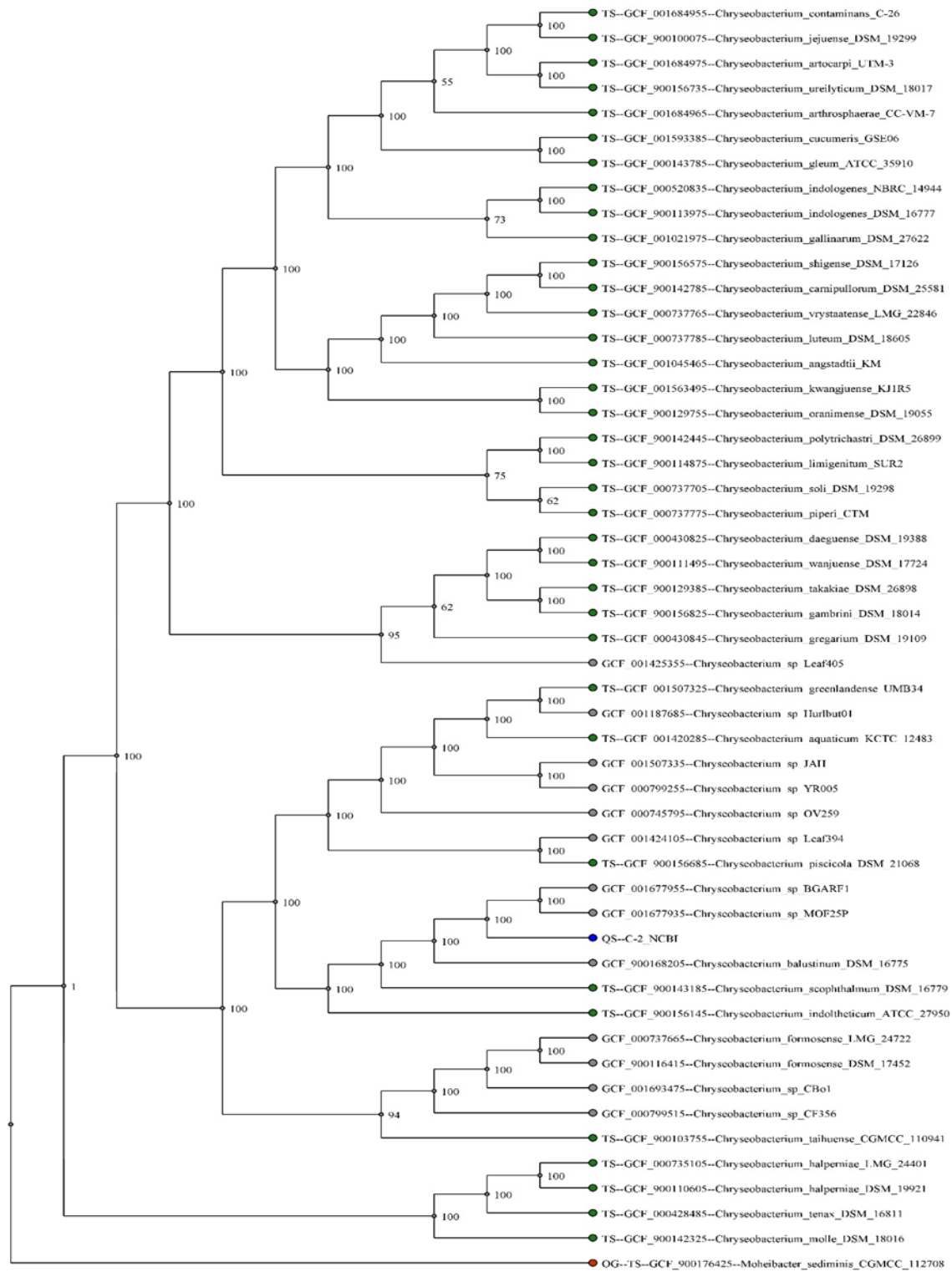


Figure 1. Phylogenetic tree of C-204 isolate (blue font) inferred from its draft genome using the software autoMLST. The phylogeny is rooted in *Moheibacter sedimnis* CGMCC 112708 (red), strains depicted in green font represent *Chryseobacterium* type strains

204 genome after next-generation sequencing. The C-204 genome was assembled after filtering with BBduk and using the SPAdes algorithm. After assembling, 23 contigs and 4,012,452 bp long genome were obtained. The GC ratio of the C-204 draft genome was found to be 33.9%. Genome characteristics of C-204 are presented in Table 2.

As a result of the autoMLST analysis performed with the closest 50 bacteria and 100 housekeeping gene regions, it was determined that the closest species to the C-204 isolate were *C. greenlandense* UMB34, *Chryseobacterium* sp. Hurlbut01 and *C. aquaticum* KCTC 12483 (Figure 1).

The draft genome of C-204 was registered with JAB-SUA000000000 accession number in GenBank. Eight antimicrobial resistance genes (AMR) and 13 virulence genes were detected in the genome of the C-204 isolate, and the related genes are presented in Table 3.

Discussion and Conclusion

While *Chryseobacterium* species do not cause any infection in domestic animals, it has been reported to cause infections in fish and frogs. The pathogenicity of *C. aahli*, *C. piscicola*, and *C. balustinum* in fish has been confirmed by experimental infection. Still, the pathogenicity of species such as *C. chaponense*, *C. piscum*, and *C. arothri*, which have been reported from systemic infections in fish in recent years, has not yet been confirmed. It has also been reported that some species within this genus, such as *C. indologenes*, are species with zoonotic potential that can cause diseases such as meningitis, urinary tract infections, and cystic fibrosis in humans (Hugo et al., 2019; Loch and Faisal, 2015a). At the same time, there is no study on the pathogenicity of *C. aquaticum* and *C. greenlandense* species in humans and fish.

In our study, detailed phenotypic characteristics of the C-204 isolate were determined by 106 different phenotypic tests (Biolog GEN III and API 20NE). It was seen that 19 of 66 tests were different from *C. aquaticum* type strain and 3 of 24 tests were different from *C. greenlandense* type strain. Also, 35 different tests that were not done before on these two types of strains were applied to the C-204 isolate for the first time. In shared biochemical tests (19 tests), C-204 isolate is differentiated from other type strains by nitrate reduction and production of acid from glucose. C-204 isolate, which was pre-identified as *Chryseobacterium* sp. by conventional tests, was found to be 99.65% similar to *C. aquaticum* and 98.95% *C. greenlandense* by 16S rRNA sequence analysis.

C. aquaticum was firstly isolated from healthy Siberian sturgeon juveniles in France, but the researchers reported the etiologic agent as *Chryseobacterium* sp.

(Bernardet et al., 2005). It was later isolated from a water reservoir in Korea, and the species description was made (Kim et al., 2008). Also, this pathogen was reported from the rainbow trout in Iran with ulcerative erosion in the tail fin and peduncle area (Akhlaghi et al., 2012). Loch et al. (2013) isolated *C. aquaticum* from brown trout juveniles with endophthalmitis, discoloration, fin erosion, and kidney swelling. An experimental infection has not yet demonstrated the pathogenicity of this agent in studies.

C. greenlandense was isolated from ice obtained from 3,043 meters deep of the ice sheet in Greenland (Loveland-Curtze et al., 2010). In our study, according to the phylogenetic analysis performed with autoMLST, it was determined that the C-204 isolate was in the same genogroup as the *C. greenlandense* UMB34 and *C. aquaticum* KCTC 12483 strains. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, it was suggested that *C. greenlandense* and *C. aquaticum* belong to the same species due to the high genome similarity and to be named *C. aquaticum*, which was first published (Hugo et al., 2019). Besides, García-López et al., (2019) reported that *C. greenlandense* is not a different species, it is a subspecies of *C. aquaticum*, and its naming should be made as "*Chryseobacterium aquaticum* subsp *greenlandense*" in the taxonomic classification created with the type strains in the Bacteroidetes phylum.

C-204 was isolated from the kidney of 1 gram rainbow trout with symptoms such as a dorsal lesion, loss of appetite, abnormal swimming, discoloration, and exophthalmos in a trout farm in the Aegean region. Since there is no scientific study on the pathogenesis of the determined *Chryseobacterium* species, the virulence genes in the genome of the C-204 isolate were analyzed in detail. Thirteen different putative virulence genes encoding adhesion, invasion, biofilm production, macrophage reproduction, escape from phagocytosis, inflammation inactivation, and blocking of IL-1b production were found in the C-204 isolate genome (Liu et al., 2019). It is recommended to conduct experimental infection studies in rainbow trout to show whether the agent provides pathogenesis and Koch Postulate.

Antimicrobial drugs including florfenicol, oxytetracycline, amoxicillin, enrofloxacin and sulfadiazine/trimethoprim have been licensed by the Ministry of Agriculture and Forestry to treat fish diseases in Turkey. The most commonly used antimicrobials in aquaculture are florfenicol, oxytetracycline, and sulfadiazine/trimethoprim. There are a lot of studies that have been reported on the development of antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture (Balta et al., 2010; Duman et al., 2017; Durmaz et al., 2012; Onuk et al., 2017; Saticioglu et al., 2019). There is no antimicrobial susceptibility determination and interpretation model for *Chryseobacterium* spe-

cies in EUCAST and CLSI standards. In this context, the antimicrobial susceptibility test protocol has been adapted according to previous studies on *Chryseobacterium* species. It has been reported that many agents in the *Flavobacteriaceae* family isolated from fish and clinical cases in humans can grow even at high concentrations of antimicrobials (Michel et al., 2005; Verner-Jeffreys et al., 2017). *C. indologenes* and *C. gleum* species isolated from clinical cases in humans have been naturally resistant to polymyxins, aminoglycosides (gentamicin, streptomycin, kanamycin), chloramphenicol, and most β -lactams (penicillins, cephalosporins, carbapenems) (Bellais et al., 2002; Lin et al., 2010). It has been reported that *C. scophthalmum* strains isolated in fish cases are resistant to tetracycline, aminoglycoside, lincomycin, oleandomycin, penicillin, and sulfadiazine in vitro, but are sensitive to chloramphenicol, sulfamethoxazole-trimethoprim, fusidic acid, and novobiocin (Mudarris and Austin, 1989). In our study, it was observed that C-204 isolate could grow even at high concentrations of Florfenicol, Oxytetracycline, Amoxicillin, and Sulphadiazine/Trimethoprim, which are licensed for fish. In the genome analysis, eight different antimicrobial resistance genes responsible for resistance against 15 different antibiotic classes were found. We concluded that the expression amount of the resistance genes detected in the genome of the C-204 isolate changes the phenotypic characteristic and makes the isolate resistant to antimicrobials.

This study is the first comprehensive study on *C. aquaticum* subsp *greenlandense* isolated from disease cases in rainbow trout. The phenotypic characteristics of the agent were determined for the first time using 106 different tests.

It has been determined that the C-204 isolate can grow even at high concentrations of antimicrobials commonly used in aquaculture and carry resistance genes against these antimicrobials in the genome.

It has been determined that there are 13 different virulence genes in the genome of the C-204 isolate, and these virulence genes may be responsible for the development of disease in rainbow trout.

Acknowledgments: This research was supported by The Research Fund of Erciyes University. Project Number: THD-2019-9135.

References

Akhlaghi M, Sharifiyazdi H, Fereidouni MS. Isolation and identification of *Chryseobacterium aquaticum* from caudal fin rot and peduncle erosion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran J Vet Clin Sci 2012; 6: 19-27.

Alanjary M, Steinke K, Ziemert N. AutoMLST: an automated web server for generating multi-locus

species trees highlighting natural product potential. Nucleic Acids Res 2019; 47(W1): W276-82.

- Balta F, Sandalli C, Kayis S., Ozgumus OB. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol 2010; 30 (6): 211-9.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 2012; 19(5): 455-77.
- Bellais S, Naas T, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of CGB-1, an Ambler class B carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Chryseobacterium gleum*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(9): 2791-6.
- Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, Bizet C, Nowakowski M, Kerouault B, Swings J. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. Syst Appl Microbiol 2005; 28(7): 640-60.
- BSGM. Su Ürünleri İstatistikleri. <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>; Accessed Date: 22.09.2020
- CLSI. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals, Approved Guideline 2014a; VET04-A2: 1-20.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement 2014b; VET03/04-S2: 1-25.
- Cooper A, Lambert D, Koziol AG, Seyer K, Carrillo CD. Draft genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *mishmarhaemek* isolated from bovine feces. Genome Announc 2015; 3(5): e01210-5.
- Duman M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Balta F, Altun S. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Glob Antimicrob Resist 2017; 10: 136-42.
- Durmaz Y, Onuk EE, Ciftci A. Investigation of the presence and antibiotic susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in The Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey.

- Ankara Üniv Vet Fak Derg 2012; 59: 141-6.
- Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu CH, McDermott PF, Tadesse DA. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(11): e00483-19.
- García-López M, Meier-Kolthoff JP, Tindall B, Gronow S, Woyke T, Kyrpides NC, Hahnke RL, Göker M. Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of *Bacteroidetes*. *Front Microbiol* 2019; 10: 2083.
- Hugo C, Bernardet JF, Nicholson A, Kämpfer P. *Chryseobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds ME. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman) 2019; p. 1-110
- Ilardi P, Fernandez J, Avendano-Herrera R. *Chryseobacterium piscicola* sp. nov., isolated from diseased salmonid fish. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59(12): 3001-5.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28(12): 1647-9.
- Kim KK, Lee KC, Oh HM, Lee JS. *Chryseobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from a water reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58(3): 533-7.
- Lee YH, Tung KC, Cheng JF, Wu ZY, Chen SY, Hong YK, Huang YT, Liu PY. Genomic characterization of carbapenem-resistant *Shewanella algae* isolated from Asian hard clam (*Meretrix lusoria*). *Aquaculture* 2019; 500: 300-4.
- Lin YT, Jeng YY, Lin ML, Yu KW, Wang FD, Liu CY. Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43(6): 498-505.
- Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(D1): D687-92.
- Loch TP, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: a review. *J Adv Res* 2015a; 6(3): 283-300.
- Loch TP, Faisal M. Polyphasic characterization reveals the presence of novel fish-associated *Chryseobacterium* spp. in the Great Lakes of North America. *Dis Aquat Org* 2015b; 113(2): 113-25.
- Loch TP, Faisal M. *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimitans* and *Chryseobacterium gregarium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(5): 1573-9.
- Loch TP, Fujimoto M, Woodiga SA, Walker ED, Marsh TL, Faisal M. Diversity of fish-associated flavobacteria of Michigan. *J Aquat Anim Health* 2013; 25(3): 149-64.
- Loveland-Curtze J, Miteva V, Brenchley J. Novel ultramicrobacterial isolates from a deep Greenland ice core represent a proposed new species, *Chryseobacterium greenlandense* sp. nov. *Extremophiles* 2010; 14(1): 61-9.
- Michel C, Matte-Tailliez O, Kerouault B, Bernardet JF. Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *J Appl Microbiol* 2005; 99(2): 323-32.
- Mudarris M, Austin B. Systemic disease in turbot *Scophthalmus maximus* caused by a previously unrecognized Cytophaga-like bacterium. *Dis Aquat Org* 1989; 6(3): 161-6.
- Onuk EE, Tanriverdi ÇY, Çoban AY, Ciftci A, Balta F, Didinen BI, Altun S. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of fish and rearing water originated *Aeromonas* isolates. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2017; 64(1): 69-73.
- Saticioglu IB, Duman M, Smith P, Wiklund T, Altun S. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Turkey. *Aquaculture* 2019; 512: 734293.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(14): 6614-24.
- Verner-Jeffreys DW, Brazier T, Perez RY, Ryder D, Card RM, Welch TJ, Hoare R, Ngo T, McLaren N, Ellis R, Bartie KL. Detection of the florfenicol resistance gene *floR* in *Chryseobacterium* isolates from rainbow trout. Exception to the general rule?. *FEMS Microbiol Ecol* 2017; 93(4): fix015.



Jersey Irkı İneklerde Bazı Çevre Faktörleri ve İklim Koşullarının Döl ve Süt Verimi Özellikleri Üzerine Etkisi*

Haşim Umut KOÇ¹, Mustafa UĞURLU²

¹Proyem Yem Sanayi Ticaret A.Ş., Samsun-TÜRKİYE

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Samsun-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Mustafa UĞURLU; E-posta: mugurlu@omu.edu.tr; ORCID No: 0000-0001-6464-0371

Atıf yapmak için: Koç HU, Uğurlu M. Jersey ırkı ineklerde bazı çevre faktörleri ve iklim koşullarının döl ve süt verimi özellikleri üzerine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(3): 312-317.

Özet: Bu araştırma, Jersey ırkı ineklerin üretim ve üreme özellikleri üzerine bazı çevresel faktörlerin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırmanın veri setini, Amasya Gökhöyük Tarım işletmesinde yetiştirilen Jersey ırkı ineklerin 2014-2016 yılları arasındaki döl verimi, laktasyon kayıtları ve Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden temin edilen iklim verileri kullanılarak hesaplanan sıcaklık-nem indeksi (SNI) değerleri oluşturmuştur. İncelenen çevre faktörlerinden buzağılama yaşı; 2-3, 4-5 ve 6+, buzağılama mevsimi; kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar sıcaklık nem indeksi; <70, 70-72 ve 72<, laktasyon sayısı; 1, 2, 3 ve 4+ olarak gruplandırılmıştır. Araştırmada, buzağılama yaşı ve laktasyon sayısındaki artışın servis periyodunu uzattığı, gebelik başına tohumlama sayısı (GBTS) ve 305 günlük süt verimini artırdığı tespit edilmiştir. Sıcaklık-nem indeksi ortalamasındaki artışın ise servis periyodunu kısalttığı, GBTS'yi ise artırdığı tespit edilmiştir. 305 günlük süt veriminin sıcaklık-nem indeksi ortalamasındaki mevsimsel artışa bağlı olarak ilkbahar ve yaz aylarında azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; Jersey ırkı ineklerde buzağılama yaşı, laktasyon sayısı ve sıcaklık nem indeksi gibi çevresel faktörlerin servis periyodu, GBTS ve buzağılama aralığı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz iken, laktasyon sayısı ve buzağılama mevsiminin 305 günlük süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli (P<0.001) bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Döl verimi, Jersey, sıcaklık nem indeksi, süt verimi

Effect of Some Environmental and Climatic Conditions on Reproduction and Milk Yield Traits in Jersey Cows

Summary: This research was performed in order to determine effects of some environmental factors on productive and reproductive traits in the Jersey cows. Data set of this research consisted of lactation and reproduction records of Jersey cows raised at Amasya Gökhöyük State Farm between 2014 and 2016 and climatic data, used to calculate temperature humidity index, obtained from General Directorate of Meteorology. Environmental factors were divided to be calving age; 2-3, 4-5 and 6+, calving season; winter, spring, summer and fall, THI; <70, 70-72 and 72<, lactation number; 1, 2, 3, 4+. In this study it was determined that the increase in calving age and lactation number prolonged the days open, as well as increasing the number of insemination per pregnancy and 305 days milk yield. Increasing temperature humidity index shortened days open but it increased the number of insemination per pregnancy. The 305 days milk yield tend to decrease in spring and summer depending on seasonal increase in temperature humidity index. In conclusion, In Jersey, the effect of environmental factors such as calving age, lactation number and temperature humidity index on days open, the number of insemination per pregnancy, and calving interval was insignificant while lactation number and calving season on 305 days milk yield was significant (P<0.001).

Key words: Jersey, milk yield, reproduction, temperature-humidity index

Giriş

Süt sığırlarının metabolik ve fizyolojik faaliyetleri için en uygun çevre sıcaklığının 5°C/15°C, verimlerini azaltmadan yaşam faaliyetlerini devam ettirebildikleri çevre sıcaklığının ise -5/25°C arasında değiştiği bildirilmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999). Çevre sıcaklığının 25°C'nin üzerinde olduğu durumlarda laktasyon dönemindeki süt ineklerinin yaşama payı enerji ihtiyacının %30 oranında arttığı ve bu nedenle laktasyon süt veriminin (Kadzere ve ark., 2002) ve

döl veriminin (Gwazdauskas ve ark., 1981) negatif yönde etkilendiği bildirilmiştir. Ayrıca, havadaki bağıl nem yüzdesindeki artışın çevre sıcaklığının etkisini artırarak çiftlik hayvanlarının üzerinde ısı stresi oluşturduğu ve buna bağlı olarak verimlerin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir (Ghavi Hossein Zadeh ve ark., 2013).

Isı stresinin, çevre sıcaklığı ve bağıl nemin ortak etkisiyle oluşan "sıcaklık-nem indeksi (SNI)" değeri ile ölçülebileceği bildirilmektedir (Yaslıoğlu ve İlhan, 2016). Sıcaklık nem indeksi, ilk kez yaz aylarında insanların çevre şartlarından olumsuz etkilene sevi-

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.07.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 24.08.2020

*İlk isim yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

yelerini değerlendirmek için "discomfort indeks" olarak geliştirilmiştir (Thom, 1958). Sonraki yıllarda, sığır türü için kullanımı yaygınlaşmıştır (Berry ve ark., 1964). Günümüzde SNI, süt sığırlarında ısı stresini değerlendirmek ve ısı stresinden dolayı oluşan performans kayıplarının ölçümünde yaygın olarak kullanılmaktadır (Freitas ve ark., 2006; Hill ve Wall., 2015; Ravagnolo ve ark., 2000).

Hayvancılık işletmelerinde sürünün sürdürülebilirliğinin sağlanması, sürüde ayıklama ve seleksiyon işlemlerinin etkili şekilde yapılabilmesi için döl veriminin önemli olduğu bilinmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999). Döl veriminin kalıtım derecesi düşük olduğundan çevre şartlarının, özellikle çevre sıcaklığındaki artışın oosit kalitesinin bozulmasına, embriyonik gelişimin etkilenmesine, progesteron üretiminin azalmasına ve embriyo ölümlerinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Nardone ve ark., 2006).

Yüksek süt verimine sahip inekler metabolik faaliyetler sonucunda vücutlarında fazladan ısı ürettiklerinden çevre sıcaklığı ve bağıl nemdeki artışa duyarlıdır (Purwanto ve ark., 1990). Dünya'da süt üretiminde yoğun olarak *Bos* cinsinin bir türü olan *Bos taurus*'un ırklarından yararlanılmaktadır (Alpan ve Arpacık, 1998). *Bos taurus* ırkları içerisinde ise Jersey ırkı sığırların ısı stresine karşı adaptasyon kabiliyetinin iyi olduğu bildirilmiştir (Garcia-Peniche ve ark., 2005).

Jersey ırkı sığırlar sütçü sığır ırkı sınıfında bulunur ve anavatanı İngiltere ile Fransa arasındaki kanal adalarından birisi olan Jersey adasıdır. Jerseyler sütçü ırk karakterlerine ve erken gelişme kabiliyetine sahip, ortalama ergin dişi canlı ağırlığı 400 kg civarında olan ufak yapılı bir ırktır. Jerseylerde beden rengi açık kahverenginden siyaha kadar değişir. En yaygın görülen renk geyik rengidir. Burun ve merme siyah olup etrafında beyaz bir halka bulunmaktadır. Jersey ineklerde ortalama süt verimi 3000 kg, süt yağı oranı % 5 olarak belirlenmiştir. Jersey buzağılarda doğum ağırlığının 20 kg civarında olduğu bildirilmiştir. Türkiye'ye ilk olarak 1958 yılında Amerika'dan Samsun Karaköy Harasına getirilmiştir ve Karadeniz ikliminin hakim olduğu Samsun Karaköy Harasında (41°52'K, 35°99'D) yetiştirilmeye başlanmıştır (Alpan ve Arpacık, 1998).

Samsun Karaköy Harasında yetiştirilen Jersey sığır ırkı üzerinde yapılan araştırmalarda 305 günlük laktasyon süt verimleri 3356 kg (Şahin, 2009), 3467 kg (Ünal ve Çankaya, 2010) ve 3786 kg (Teke ve Akdağ, 2010), laktasyon süresi 301.20 gün (Soydan ve Kuran, 2017) ve 290 gün (Teke ve Akdağ, 2010), olarak bildirilmiştir. Samsun Karaköy Harasında yetiştirilen Jersey sığır ırkı üzerinde yapılan araştırmalarda servis periyodu ve buzağılama aralığı 102.84 ve 366.60 gün (Gürses ve ark., 2014), gebelik süresi ve buzağılama aralığı ise 275.20 ve 369.80 gün (Soydan ve Kuran, 2017) olarak tespit edilmiştir.

Jersey ırkı sığırlar 2014 yılında Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesine nakledilmiştir. Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesi (40°58'K, 35°65'D) deniz seviyesinde 400 metre yükseklikte ve Karadeniz iklimi ile karasal ikliminin geçiş bölgesindedir. Jersey ırkı süt sığırlarının Karaköy Tarım İşletmesi şartlarında dölverimi (Gürses ve ark., 2014) ve süt verimi (Teke ve Akdağ, 2012; Soydan ve Kuran, 2017) özelliklerinin belirlendiği araştırmalar olmasına karşın, Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesi şartlarındaki döl verimi ve süt verimi özellikleri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu araştırma Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesine nakledilen Jersey ırkı sığırların dölverimi ve süt verimi özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Veri setinin oluşturulması

Bu araştırmada, 2014-2016 yılları arasında Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesinde bulunan 496 baş Jersey ırkı ineğe ait 486 laktasyon ve 407 döl verimi kaydı kullanılmıştır. Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden Amasya-Gökhöyük meteoroloji istasyonunda 2014-2016 yılları arasında ölçülen günlük en yüksek sıcaklık, günlük ortalama sıcaklık ve günlük ortalama bağıl nem değerleri temin edilmiş ve (SNI) = $(0.8 \times \text{en yüksek çevre sıcaklığı}) + [\text{bağıl nem} \times (\text{ortalama çevre sıcaklığı} - 14.4)] + 46.6$ formülü kullanılarak sıcaklık nem indeksi değerleri hesaplanmıştır (Davis ve ark., 2003). Sıcaklık nem indeksi değerleri, SNI-1 (<70), SNI-2 (70-72) ve SNI-3 (72<) olarak sınıflandırılmıştır (NADIS, 2017).

Döl verimi özellikleri

Servis periyodu; buzağılama tarihi ile bir sonraki buzağıya gebe kaldığı son tohumlama tarihi arasındaki süre, gebelik süresi; buzağılama tarihi ile o buzağıya gebe kaldığı tarih arasındaki süre, buzağılama aralığı; birbirini takip eden iki buzağılama tarihi arasındaki süre olarak hesaplanmıştır. Gebelik başına tohumlama sayısı; buzağılamadan sonra bir sonraki buzağıya gebe kalıncaya kadar yapılan tohumlama sayısı olarak alınmıştır (Alpan ve Arpacık, 1998).

Laktasyon özellikleri

Süt verim özellikleri Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesi sığırcılık ünitesinde bulunan sağım sisteminin bilgisayar verilerinden elde edilmiştir. Standart laktasyon süresi 305 gün kabul edilmiştir. 305 günden fazla süren laktasyon verimleri 305 güne göre çevirme faktörleri kullanılarak düzeltilmiştir. 305 günden kısa süren laktasyonlara, kendiliğinden kuruya çıkan ineklerin verimlerinde değişiklik yapılmamış gerçek süt verimleri 305 günlük süt verimi olarak kabul edilmiştir. Laktasyon süresi; buzağılamadan kuruya çıkana kadar geçen süredir. Laktasyon süresi 150 günün altında olan hayvanların laktasyon süresi ve süt verimleri değerlendirme dışı bırakılmıştır. Kuru dönem, buzağı-

lama aralığından laktasyon süresi çıkarılarak hesaplanmıştır (Alpan ve Arpacık, 1998).

İstatistiksel analizler

Servis periyodu, gebelik süresi, buzağılama aralığı, gebelik başına tohumlama sayısı özelliklerinin; buzağılama yaşı, sıcaklık-nem indeksi ve laktasyon sayısı gruplarına göre, 305 günlük düzeltilmiş süt verimi, laktasyon süresi ve kuru dönem özelliklerinin ise buzağılama yaşı, buzağılama mevsimi ve laktasyon sayısı gruplarına göre farklılıklarının analizinde SPSS paket programındaki tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın analizi için Duncan çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır (John, 1971; Anonim, 2015).

Bulgular

Mevsimler ve ısı nem indeksi değerleri

Mevsim bakımından; günlük en yüksek çevre sıcaklığı, günlük ortalama çevre sıcaklığı ve SNI'nin kış aylarında en düşük seviyede iken yaz aylarında yükseldiği belirlenmiştir. Günlük ortalama nispi nem değeri ise en düşük yaz aylarında en yüksek kış aylarında görülmüştür (Tablo1).

Tablo 1. 2013-2016 yılları arasındaki mevsimlere göre meteorolojik verilere ait ortalamalar ve standart hataları ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Mevsim	Günlük En Yüksek Sıcaklık (°C)	Günlük Ortalama Sıcaklık (°C)	Günlük Ortalama Nispi Nem (%)	SNI
Kış	8.24±0.30	3.19±0.23	78.53±0.66	44.08±0.45
İlkbahar	20.33±0.34	13.07±0.27	62.42±0.68	61.49±0.44
Yaz	30.55±0.20	23.07±0.15	55.39±0.53	75.45±0.21
Sonbahar	21.23±0.38	13.87±0.32	63.11±0.70	62.52±0.49

SNI: Sıcaklık nem indeksi, °C: Santigrat derece

Tablo 2. Döl verimi özelliklerine ait ortalamalar ve standart hataları ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

İncelenen Çevre Faktörleri	n	Servis Periyodu	n	Buzağılama Aralığı	n	GBTS
Buzağılama Yaşı	-	-	-	-	-	-
2-3	228	71.80±4.43	228	356.42±4.41	228	1.40±0.13
4-5	96	81.66±4.38	96	366.52±4.37	96	1.79±0.13
6+	83	83.67±3.54	83	368.72±3.53	83	1.82±0.11
SNI	-	-	-	-	-	-
<70	248	80.64±2.83	248	365.92±2.82	248	1.54±0.08
70-72	35	80.62±5.47	35	365.32±5.46	35	1.78±0.17
72<	124	74.27±5.09	124	358.72±5.07	124	1.63±0.15
Laktasyon sayısı	-	-	-	-	-	-
1	129	76.19±3.28	129	361.02±3.27	129	1.33±0.13
2	104	77.90±5.23	104	362.62±5.21	104	1.71±0.16
3	65	70.56±7.61	65	355.22±7.58	65	1.58±0.23
4+	109	84.42±4.08	109	369.52±4.07	109	1.78±0.12
Beklenen ortalama	407	78.16±2.66	407	363.02±2.66	407	1.64±0.08

GBTS: Gebelik Başına Düşen Tohumlama Sayısı, SNI: Sıcaklık-Nem İndeksi, -:önemsiz

Servis periyodu, gebelik başına tohumlama sayısı (GBTS) ve buzağılama aralığı

Araştırmada döl verimi özelliklerine ait ortalamalar Tablo 2'de verilmiştir. Buzağılama yaşı ve laktasyon sayısının artması ile birlikte servis periyodu artış göstermiş olmasına karşın istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Araştırmada, en yüksek servis periyodu (83.67 gün) 6 yaş ve üzeri ineklerde tespit edilmiştir. Sıcaklık-nem indeksi (SNI) sınıfları bakımından yapılan değerlendirmede ise SNI'nin artması ile birlikte servis periyodunun azaldığı tespit edilmiştir. Buzağılama yaşı, SNI ve laktasyon sayısının artışı ile birlikte GBTS ve buzağılama aralığının artma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Çevre faktörlerinin; servis periyodu, GBTS ve buzağılama aralığına etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

Laktasyon süt verimi

Araştırmada laktasyon periyodunda ait ortalamalar Tablo 3 'de verilmiştir. Buzağılama yaşı ve laktasyon sayısının artması ile birlikte 305 günlük süt veriminin genel olarak artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Buzağılama mevsimi bakımından en düşük süt verimi (4810.70 kg) yaz aylarında, en yüksek süt verimi (5679.68 kg) ise kış aylarında buzağılayan ineklerden

Tablo 3. Laktasyon periyoduna ait ortalamalar ve standart hataları ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

İncelenen Çevre Faktörleri	n	305 Günlük Süt Verimi	n	Laktasyon Süresi	n	Kuru Dönem
Buzağılama Yaşı		-		**		-
2-3	278	4755.50±130.31	286	318.52±6.03 ^a	278	59.16±1.64
4-5	106	5448.48±133.58	105	316.82±7.39 ^a	106	63.39±2.02
6+	102	5021.05±194.12	105	365.42±11.08 ^b	102	58.49±3.02
Buzağılama Mevsimi		***		**		-
Kış	70	5679.68±181.14 ^b	72	327.92±10.09 ^b	70	59.93±2.75
İlkbahar	111	4994.39±134.26 ^a	112	333.72±7.48 ^b	111	62.34±2.04
Yaz	178	4810.70±152.75 ^a	178	325.82±8.51 ^b	178	56.88±2.32
Sonbahar	127	5082.74±174.98 ^a	134	320.72±9.75 ^a	127	59.49±2.66
Laktasyon sayısı		***		-		-
1	158	4460.75±71.63 ^a	161	324.22±3.99	158	61.27±1.09
2	127	5491.82±171.19 ^c	131	320.52±9.54	127	64.60±2.60
3	71	5118.07±217.58 ^b	72	330.02±12.12	71	57.43±3.31
4+	130	5100.41±112.62 ^b	132	331.72±6.27	130	59.88±1.71
Beklenen ortalama	486	5126.05±81.35	496	326.72±4.53	486	60.98±1.23

a,b,c: Aynı sütündeki farklı harflerle gösterilen ortamlar istatistiksel olarak farklıdır.

***: P<0.001; **:P<0.01; -:önemsiz

sağlandığı tespit edilmiştir. 305 günlük süt verimi ortalamaları arasında farklılıklar buzağılama yaşı grubunda istatistiksel olarak önemsiz, buzağılama mevsimi ve laktasyon sayısı gruplarında istatistiksel olarak önemli (P<0.001) bulunmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Servis periyodu ve gebelik başına tohumlama sayısı (GBTS)

Servis periyodunun uzunluğu, süt sığırlarında dövl verimi performansının ölçülmesinde sıklıkla kullanılan özelliklerden birisidir. Sürü yönetiminde en uygun servis periyodu süresinin 60-80 gün arasında olması gerektiği bildirilmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999). Bu çalışmada servis periyodu; genel ortalaması 78.16 gün olarak bulunmuştur. Bu değer servis periyodu için kabul edilebilir sınırlar içerisinde. Bu çalışmada servis periyodu, buzağılama yaşı ve laktasyon sayısının artışına paralel olarak artma eğilimi gösterirken sıcaklık-nem indeksi sınıflarında indeks değeri yükseldikçe servis periyodu azalma eğilimindedir. Bu durumun buzağılama yaşı ve laktasyon sayısındaki artış ile birlikte metabolizmada meydana gelen farklılaşmadan dolayı olabileceği düşünülebilir.

Gebelik başına düşen tohumlama sayısının 1-1.5 arasında iyi, 1.5-2.0 arasında orta ve 2.0'ın üzerinde olduğu durumlarda ise kötü olarak kabul edilmektedir (Alpan ve Arpacık, 1998). Bu çalışmada GBTS genel ortalaması 1.64 olarak bulunmuştur. Bu sebeple GBTS'yi 1-1.5 seviyelerine çekebilmek için bu duruma etki edebilecek faktörlere (östrusların tespiti, ineklerin jinekolojik sağlığı, suni tohumlamayı uygulayan kişinin tecrübesi vb) dikkat edilmesi gerektiği söylene-

bilir. Buzağılama yaşı ve laktasyon sayısı artışı ile birlikte gebelik başına düşen tohumlama sayısında da artış olduğu belirlenmiştir. En düşük gebelik başına düşen tohumlama sayısı SNİ değerinin 70'in altında olduğu durumlarda 1.54 olarak tespit edilmiştir. Genellikle servis periyodu yüksek ise GBTS de yüksek olmaktadır. Zira, servis periyodu uzadıkça her seksüel sıklusta ineğe tohumlama yapılmaktadır. Servis periyodunun uzaması ile GBTS'nin artması arasındaki durum bu şekilde açıklanabilir. Bu çalışmada SNİ yükseldikçe servis periyodu azalma eğiliminde olmasına rağmen gebelik başına tohumlama sayısını yükseldiği görülmektedir. Bu durum yüksek SNİ değerlerinde fizyolojik bazı durumların etkili olabileceği düşünülebilir. Nitekim, SNİ'nin reproduksiyon ve fertilité üzerine olumsuz etkisinin bulunduğu, yani servis periyodunun uzadığı ve gebelik başına düşen tohumlama sayısının arttığı bildirilmesine rağmen servis periyodu ve gebelik başına düşen tohumlama sayısı ile SNİ arasında doğrusal bir ilişki bulunmadığı ve bu ilişkinin hormonal mekanizma ile yakından ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ghavi Hossein Zadeh ve ark., 2013).

Laktasyon süt verimi

Bu çalışmada buzağılama yaşının artması ile birlikte 305 günlük süt veriminde artış tespit edilmiştir. Buzağılama yaşı grupları arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen 305 günlük süt veriminin buzağılama yaşının artması ile birlikte artma eğiliminde olması bakımından kaynaklar ile uyum içinde olduğu söylenebilir (Gürses ve ark., 2014). Bu çalışmadaki ilkbahar (61.49) ve yaz (75.45) aylarındaki SNİ'nin Karaköy Harasında 1995-2005 yılları arasında yapılan bir

araştırmadaki ilkbahar (57.73) ve yaz (74.67) aylarındaki SNI'den yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, bu araştırmada bulunan 305 günlük ortalama süt verimi (5126.05 kg) Karaköy Harasında yapılan araştırmalarda bildirilen 305 günlük laktasyon süt verimlerinden, 3356 kg (Şahin, 2009), 3467 kg (Ünal ve Çankaya, 2010) ve 3786 kg (Teke ve Akdağ, 2010), yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın işletmelerde uygulanan bakım, besleme ve iklim koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, Jersey ırkı sığırların ısı stresine daha dayanıklı olduğunu bildiren kaynaklar bulunmaktadır (Bryant ve ark., 2007; Keister ve ark. 2002). Araştırmada laktasyon sayısı arttıkça süt veriminde artış tespit edilmiştir. Bu veri Karaköy Harasından Jersey ırkı ile yapılan araştırmalar ve diğer ırklar ile yapılan araştırmalar ile uyumludur (Gürses ve ark., 2014).

Sonuç olarak, Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesinde yetiştirilen Jersey sığırlarda, servis periyodunun kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu tespit edilmiştir. GBTS, SNI artışı ile artmış olmasına rağmen kabul edilebilir sınırlar içerisinde. Bu araştırmada elde edilen süt verimi sonuçlarının ise Karaköy Tarım İşletmesindeki süt verimi sonuçlarına göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Karaköy Tarım İşletmesinde yetiştirilen Jersey ırkı sığırların Amasya Gökhöyük Tarım İşletmesine nakledilmesi ve burada yetiştirilmesine devam edilmesinin verimler üzerinde kayıp oluşturmadığı söylenebilir.

Kaynaklar

- Akçapınar H, Özbeyaz C. Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri. İkinci Baskı. Ankara: Kariyer Matbaacılık Ltd Şti, 1999; s:73-87.
- Alpan O, Arpacık R. Sığır Yetiştiriciliği. İkinci Baskı. Ankara: Şahin Matbaası, 1998; s: 31-217.
- Anonim. SPSS21 Statistical Package in Social Sciences for Windows. Statistical Innovations. Inc., Chicago, USA, 2015.
- Berry IL, Shanklin MD, Johnson HD. Dairy shelter design based on milk production decline as affected by temperature and humidity. *Trans Am Soc Agric Eng* 1964; 7: 329-31.
- Bryant JR, Lopez-Villalobos, Pryce JE, Holmes CW, Johnson DL. Quantifying the effect of thermal environment on production traits in three breeds of dairy cattle in New Zealand. *NZJ Agric Res* 2007; 50(3): 327-38.
- Davis MS, Mader T, Holt SM, Parkhurst AM. Strategies to reduce feedlot cattle heat stress: Effect of tympanic temperature. *J Anim Sci* 2003; 81: 649-61.
- Freitas M, Misztal I, Bohmanova J, Torres R. Regional differences in heat stress in US Holsteins. *Proceedings of The Eight World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. August, 13- 26, 2006; Belo Horizonte-Brazil.
- Garcia-Peniche TB, Cassell BG, Pearson RE, Misztal I. Comparisons of Holstein with Brown Swiss and Jersey cows on the same farm forage at first calving and first calving interval. *J Dairy Sci* 2005; 88: 790-6.
- Ghavi Hossein Zadeh N, Mohit A, Azad N. Effect of temperature humidity index on productive and reproductive performances of Iranian Holstein cows. *Iran J Vet Res* 2013; 14(2): 106-12.
- Gürses M, Bayraktar M, Şimşek ÜG. Jersey ırkı sığırların süt ve döl verim özellikleri üzerine bazı çevre faktörlerinin etkileri. *FÜ Sağlık Bil Vet Derg* 2014; 28(3): 137-43.
- Gwazdauskas FC, Lineweaver JA, Vinson WE. Rates of conception by artificial insemination of dairy cattle. *J Dairy Sci* 1981; 64: 358-62.
- Hill DL, Wall E. Dairy cattle in a temperate climate: the effects of weather on milk yield and composition depend on management. *Animal* 2015; 9: 138-49.
- John PWM. *Statistical Design and Analysis of Experiments*. New York: Macmillan, 1971; p: 5-14.
- Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest Prod Sci* 2002; 77: 59-91.
- Keister ZO, Moss KD, Zhang HM, Teegerstrom T, Edlşng RA, Collier RJ, Ax RL. Physiological responses in thermal stressed Jersey cows subjected to different management strategies. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3217-24.
- NADIS (National Animal Disease Information Service). Managing heat stress in dairy cows. <http://www.nadis.org.uk/bulletins/managing-heatstress-indairy-cows.aspx>; Erişim Tarihi: 03.07.2017.
- Nardone A, Ronchi B, Lacetera N, Bernabucci U. Climate effects on reproductive traits in livestock. *Vet Res Commun* 2006; 30: 75-81.
- Purwanto BP, Abo Y, Sakamoto R, Furumoto F, Yamamoto S. Diurnal patterns of heat production and HR under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. *J Agric Sci (Camb)* 1990; 114: 139-42.
- Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J Dairy Sci* 2000; 83: 2120-5.

- Soydan E, Kuran M. The effect of calving season on productive performance of Jersey cows. *Mljekarstvo* 2017; 67(4): 297-304.
- Şahin A. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı işletmelerde yetiştirilen farklı sığır ırklarının süt ve dövl verimi özelliklerine ait genotipik ve fenotipik parametre tahmini, Doktora tezi, Gazi Osman Paşa Üniv Fen Bil Ens, Tokat 2009.
- Teke B, Akdağ F. Karaköy Tarım İşletmesinde yetiştirilen Jersey ineklerde bazı çevre faktörleri ve kurudönem uzunluğunun süt verimine etkisi. *Lalahan Hay Araş Enst Derg* 2010; 50: 65-72.
- Teke B, Akdağ F. The effect of heat stress on some reproductive traits in Jersey cows under semihumid conditions in Turkey. *Bulgarian J Agric Sci* 2012; 18(4): 506-10.
- Thom EC. Cooling degress: day air-conditioning, heating and ventilating. *Trans Am Soc Heat* 1958; 55: 65-9.
- Ünalın A, Çankaya S. Genetic parameters and correlations for lactation milk yields according to lactation numbers in Jersey cows. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2010; 16: 995-1000.
- Yaslıoğlu E, İlhan H. Güney Marmara süt sığırı yetiştiriciliğinin ısı stresi yönünden değertlendirilmesi. *JOTAF*2016; 13: 12-9.



Milk Traits of Damascus Goats at Different Lactation Stages: 1. Somatic Cell Counts and Milk Quality Parameters*

Hüseyin ÖZKAN¹, Akın YAKAN^{1,3}, Baran ÇAMDEVİREN², İrem KARAASLAN³

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Genetic, Hatay-TURKEY

²Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Genetics, Hatay-TURKEY

³Hatay Mustafa Kemal University, Technology and Research & Development Center (MARGEM), Hatay-TURKEY

Corresponding author: Huseyin OZKAN; hozkan@mku.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5753-8985

How to cite: Özkan H, Yakan A, Çamdeviren B, Karaaslan İ. Milk traits of Damascus goats at different lactation stages: 1. somatic cell counts and milk quality parameters. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(3): 318-324.

Summary: In this study, milk of healthy 20 goats in the 3rd - 4th lactation periods was analyzed in different lactation stages. While milk pH, fat, fat-free dry matter, protein, lactose and freezing point were similar between groups in all lactation stages, electrical conductivity and Somatic Cell Count (SCC) increased with the continuation of lactation ($P<0.05$; $P<0.001$). Nonspecific relations were found between SCC and electrical conductivity in mastitis-free goats. Also, correlations were found between milk quality parameters and different lactation stages at the significant levels ($P<0.05$, $P<0.01$). There was a positive correlation between SCC and milk fat in early lactation ($r=0.619$; $P<0.05$). On the other hand, a negative correlation was found between freezing point and electrical conductivity in the late lactation ($r=-0.474$; $P<0.05$). It was understood that milk composition and especially SCC values were different in different stages of lactation in Damascus goats. The relationship between the components of milk was found to be related to the lactation period. As a result, while the chemical composition of milk did not change during the lactation, it was concluded that the milk produced in the early lactation had lower SCC and electrical conductivity values than in the other lactation stages, and the milk produced in early lactation stage was higher quality.

Key words: Damascus goat, lactation period, milk quality

Farklı Laktasyon Dönemlerindeki Damascus Keçilerinde Süt Özellikleri: 1. Somatik Hücre Sayısı ve Süt Kalite Parametreleri

Özet: Bu çalışmada 3.-4. laktasyon dönemlerindeki sağlıklı 20 keçinin sütü farklı laktasyon aşamalarında analiz edilmiştir. Süt pH'sı, yağ, yağsız kuru madde, protein, laktoz ve donma noktası tüm laktasyon aşamalarında gruplar arasında benzerken, laktasyonun devamında elektriksel iletkenlik ve Somatik hücre sayısı (SHS) artmıştır ($P<0.05$; $P<0.001$). Mastitis olmayan keçilerde SHS ile elektrik iletkenliği arasında spesifik olmayan ilişkilerin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, farklı laktasyon aşamaları ile süt kalite parametreleri arasında önemli seviyelerde korelasyonlar bulunmuştur ($P<0.05$, $P<0.01$). Erken laktasyonda SHS ile süt yağı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r=0.619$; $P<0.05$). Diğer taraftan, geç laktasyonda donma noktası ile elektriksel iletkenlik arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0.474$; $P<0.05$). Damascus keçilerinde laktasyonun farklı dönemlerinde süt kompozisyonu ve özellikle SHS değerlerinin farklı olduğu anlaşılmıştır. Diğer taraftan sütün kimyasal kompozisyonunu oluşturan unsurlar arasındaki ilişkinin de laktasyon dönemi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, laktasyon boyunca sütün kimyasal kompozisyonu değişmezken laktasyonun erken dönemlerinde üretilen sütün SHS ve elektriksel iletkenlik değerlerinin diğer laktasyon dönemlerinden düşük olması bu sütlerin daha kaliteli olduğu kanaatini oluşturmuştur.

Anahtar kelimeler: Damascus keçisi, laktasyon periyodu, süt kalitesi

Introduction

Small ruminant breeding has great importance because of product quality and profitability. Goats, were domesticated about 10 thousand years ago, and have been breeding with increasing supply and demand (Yakan et al., 2019). Today, it is estimated that there are more than 1000 goat breeds in the world (Crisa et al., 2016). The importance of goat breeding is increasing day by day with the awareness of healthy nutrition (Yurchenkoo et al., 2018). While the number of goats around the world was around 750

million heads in the early 2000s, this number increased gradually and reached 1 billion heads as of 2018 (FAOSTAT, 2020).

Goat breeding is a source of quality animal products, especially for people with food allergies to milk and dairy products such as cheese and yoghurt, those with digestive system disorders and also for children (Albenzio et al., 2012; Yakan et al., 2019). Goat milk fat is more beneficial because of nutritional and dietetic parameters (Anghel et al., 2017). In ruminants, milk production depends on genetic and environmental factors such as nutrition. However, in general, goat's milk is richer in carbohydrate, fat and protein

values than cow's milk. In addition, the proportion of short and medium-length fatty acids in goat's milk is higher than in milk of other species (Zhu et al., 2014).

Physiology of animals changes during lactation period. Therefore, there are significant differences in milk composition at different lactation stages (Yakan et al., 2019). It is also reported that milk composition could be influenced by the energy balance in lactation goats (Zailan and Yaakub, 2018). On the other hand, it is known that somatic cell count (SCC) of milk is an important marker for mammary health and physiology. Goat milk has more SCC than cow milk, in general. However, SCC levels may change without infectious factors during the lactation period (Kuchtik et al., 2015; Raynal-Ljutovac et al., 2005).

Thanks to numerous studies, cow milk production and secretion process are well known (Sandolhm et al., 1995; William and Edmondson, 2010). There is also abundant information about milk production physiology of goat (Haenlein, 2004). On the other hand, it is estimated that there are important differences related to production and composition of milk in different goat species (Yakan et al., 2019). It is known that milk composition change in different lactation stage and this is an important factor for human nutrition consuming milk and dairy products. Due to its high milk and reproductive characteristics, especially in the last 20 years, Damascus goat breeding has increased in some countries such as Turkey, Syria, Lebanon, and other Mediterranean countries (Keskin et al., 2004; Yakan et al., 2019).

Production and secretion of milk in goats have some differences. In goats, milk secretion type is apocrine.

This physiological difference cause wide range of SCC even without mastitis. It is known that molecular activity in somatic cells may change the composition of milk (Zecconi et al., 2020). The aim of this study was to evaluate the variation of somatic cell count and chemical composition of milk according to the lactation stages in Damascus goats.

Materials and Methods

Animal materials

This study was done with 20 Damascus goats in the 3rd- 4th lactation periods. Animals were randomly selected from 200 heads flock. One week after parturition, goats were in pasture for grazing (06:00-18:00, in a day). After grazing, goats were housed in pen. Besides grazing, goats consumed 300 g/head/day concentrate feed (Table 1). All management and feeding procedures were practiced according to routine breeding procedure. Following births, 50 ml of milk was taken from each goat in the morning milking during the early [10-20 days after parturition, Early Lactation Stage (ELS)], mid [100-110 days after parturition, Mid Lactation Stage (MLS)] and late [200-210 days after parturition, Late Lactation Stage (LLS)] stages of lactation.

Table 1. Chemical and physical composition of concentrate feeds

Items contents	Proportions (%)
Wheat grain	18.50
Maize grain	21.60
Corngrain	17.00
Sunflower meal (crude protein 28-29%)	16.00
Cottonseed meal (crude protein 31-32%)	11.00
Barley grain	7.80
Wheat bran	2.00
Molasses	4.70
Marble powdered (38% Ca ⁺⁺)	0.50
NaCl	0.75
Vitamin mineral premix*	0.15
Total	100.00
Calculated nutrition value of concentrated feed	
Dry matter	89.81
Crude ash	5.97
Ether extract	2.54
Crude protein	16.75
Total Metabolic Energy (kcal/kg)	2767.16

*: Per 1.5 kg vitamin mineral premix contains 15 000 000 IU Vit A, 3 000 000 IU Vit D3, 50 000 IU Vit E, 50 g manganese, 50 g ferrous, 50 g zinc, 10 g copper, 0.8 g iodine, 0.2 g cobalt, 0.3 g selenium.

Milk sampling and measured parameters

After bringing the samples to the laboratory in the cold chain, SCC (Lactoscan SCC 6010) and pH (Hanna pH meter, HI83141) were determined. In addition, fat, fat-free dry matter (FFDM), protein, lactose, freezing point and electrical conductivity of milk samples were investigated (Milkotester Master Classic LM2 P1). Measurements were made within 2 hours of milking in two replicates and mean values were recorded.

Statistical analysis

Descriptive statistics were described as “Mean ± Standard error of mean”. Pearson correlation coefficient was performed to determine the relationships between the quality parameters of goat milk. MIXED procedure of SPSS (V22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyze the effect of the period of lactation as early, mid and late term on the quality parameters of goat milk by using the following model with repeated measures:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + e_{ijk}$$

Where, Y_{ijk} , dependent variable; μ , overall mean; P_i , effect of period of lactation (i = early, mid and late term); and e_{ijk} , residual error. Animals within group were assessed as a random effect, while period of assessed as a fixed effect. $P < 0.05$ was considered as significant in all analyses.

Results

In the study, SCC of animals were lower than 1000×10^3 /mL during all lactation stages (ELS, MLS, LLS). With the continuation of lactation, however, SCC in ELS, MLS and LLS groups were 183.07 ± 40.36 , 482.11 ± 108.43 and 517.41 ± 107.60 , respectively ($P < 0.05$). SCC of ELS group was lower than MLS and LLS groups ($P < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference in terms of SCC between the MLS and LLS groups (Table 2). While milk pH, fat (%), fat-free dry matter (%), protein (%), lactose (%) and freezing point were similar between groups, it was determined that electrical conductivity increased with the continuation of lactation ($P < 0.001$) (Table 2).

According to lactation periods, it was found that there was a positive and statistically significant correlation between SCC and fat in ELS group ($r = 0.619$; $P < 0.05$). In ELS group there was also negative correlation between fat with protein ($r = -0.545$; $P < 0.05$) and fat with lactose ($r = -0.545$; $P < 0.05$). In addition, while there was a high positive correlation between FFDM and protein ($r = 0.985$; $P < 0.01$) and lactose ($r = 0.996$; $P < 0.01$), it was found that there was a high negative and statistically significant correlation between FFDM and freezing point ($r = -0.986$; $P < 0.01$). Moreover, statistically important and highly positive correlation was found between protein and lactose ($r = 0.982$; $P < 0.01$). Finally, negative correlations were found between freezing point and protein ($r = -0.970$; $P < 0.01$) and lactose ($r = -0.978$; $P < 0.01$) in ELS group samples (Table 3).

MLS group was the group with the highest correlation among parameters. While negative correlations were found between pH with fat ($r = -0.511$; $P < 0.05$) and pH with freezing point ($r = -0.666$; $P < 0.01$), positive correlations were determined between pH and most of the other evaluated parameters with variable significances in MLS group (Table 3). Meanwhile, there were a negative and important correlations between milk fat and FFDM ($r = -0.591$; $P < 0.01$), protein ($r = -0.551$; $P < 0.05$), lactose ($r = -0.581$; $P < 0.01$) and electrical conductivity ($r = -0.746$; $P < 0.01$). Positive correlation was found between milk fat and freezing point ($r = 0.513$; $P < 0.05$). Three of the determined parameters (protein, lactose, and electrical conductivity) in MLS group were positively correlated with FFDM ($P < 0.05$).

On the other hand, a negative and a significant correlation was found between FFDM and freezing point ($r = -0.993$; $P < 0.01$) in MLS group. As the amount of FFDM in milk increases, a decrease will occur in the freezing point for the mineral load in it. This confirms the negative correlation detected between the two parameters. While positive correlations were found between protein and lactose ($r = 0.994$; $P < 0.01$) and electrical conductivity (0.483 ; $P < 0.05$), a negative correlation was determined with freezing point ($r = -0.992$; $P < 0.01$). In addition, a negative correlation was determined between the freezing point and electrical conductivity ($r = -0.474$; $P < 0.05$).

Table 2. Parameters of milk in different lactation periods (Mean±SE)

Parameters	Groups			P
	ELS	MLS	LLS	
SCC (x1000)	183.07±40.36 ^b	482.11±108.43 ^a	517.41±107.60 ^a	<0.05
pH	6.70±0.07	6.73±0.03	6.67±0.02	-
Fat (%)	4.05±0.31	4.45±0.23	3.69±0.20	-
FFDM (%)	8.62±0.13	8.79±0.18	8.77±0.07	-
Protein (%)	3.12±0.04	3.18±0.07	3.17±0.03	-
Lactose (%)	4.69±0.07	4.81±0.10	4.78±0.04	-
Freezing point	-0.58±0.01	-0.30±0.01	-0.60±0.01	-
E. Conductivity	4.65±0.02 ^c	4.73±0.03 ^b	4.85±0.02 ^a	<0.001

Different letters on the same line indicate the statistical difference between the groups; **FFDM**: Fat-free Dry Matter; **E. Conductivity**: Electrical Conductivity^{a, b, c}. Means with different letters in rows differ significantly

Table 3. Correlations of measured parameters in different lactation stages

Groups	Parameters	pH	Fat (%)	FFDM (%)	Protein (%)	Lactose	Freezing point	E. Conductivity
ELS	SCC	0.161	0.619*	-0.286	-0.266	-0.331	0.223	-0.078
	pH		0.029	0.177	0.145	0.169	-0.231	-0.354
	Fat (%)			-0.513	-0.545*	-0.545*	0.394	-0.126
	FFDM (%)				0.985**	0.996**	-0.986**	-0.386
	Protein					0.982**	-0.970**	-0.341
	Lactose (%)						-0.978**	-0.364
	Freezing point							0.393
MLS	SCC	0.346	-0.181	0.161	0.177	0.133	-0.186	0.325
	pH		-0.511*	0.685**	0.692**	0.661**	-0.666**	0.551*
	Fat (%)			-0.591**	-0.551*	-0.581**	0.513*	-0.746**
	FFDM (%)				0.995**	0.997**	-0.993**	0.515*
	Protein					0.994**	-0.992**	0.483*
	Lactose (%)						-0.992**	0.504*
	Freezing point							-0.474*
LLS	SCC	0.170	0.358	0.060	0.026	0.124	0.080	0.305
	pH		0.013	0.300	0.328	0.397	-0.050	0.241
	Fat (%)			0.277	0.137	0.311	-0.322	-0.471
	FFDM (%)				0.951**	0.978**	-0.569*	-0.446
	Protein					0.949**	-0.585*	-0.335
	Lactose (%)						-0.546*	-0.362
	Freezing point							0.279

*:P<0.05; **: P<0.01; **E. Conductivity:** Electrical Conductivity

In the LLS group, another group in which correlations between parameters were examined, positive correlations were determined between FFDM and protein ($r=0.951$; $P<0.01$) and lactose ($r=0.978$; $P<0.01$). Also, there was a negative correlation found between FFDM and freezing point ($r=-0.569$; $P<0.05$). Similarly, MLS negative correlations were determined between freezing point and protein ($r=-0.585$; $P<0.05$) and lactose ($r=-0.546$; $P<0.05$) in this group. Beside all these results, a highly positive correlation was found between lactose and protein ($r=0.949$; $P<0.01$). In addition to the changes in milk composition, the relationship between the parameters that make up the milk composition changed according to the lactation period.

Discussion and Conclusion

Somatic cell count is in a wide range in healthy goats because of secretion type (Souza et al., 2012). Physiological changes occur in the mammary gland following the start of lactation in the postpartum period. Although there are different reports of transition from colostrum to normal milk, the secretion passes to normal milk after the approximately 10th day of lactation (Lu et al., 2016; Marounek et al., 2012; Sanchez-Macias et al., 2014). Also, it is reported that milk somatic cell counts are influenced by lactation stage in

small ruminants and accuracy of mastitis by California Mastitis test are better in ewes than goats (Souza et al., 2012).

Leitner et al. (2004) are stated that healthy goat's milk SCC is approximately $450 \times 10^3/\text{mL}$ in their study. It is reported that SCC averages are under $575 \times 10^3/\text{mL}$ in Saanen goats, while Muricano-Granadina breeds averages are more than $1000 \times 10^3/\text{mL}$ (Sanchez et al., 2005; Granado et al., 2014). In our study, milk SCC of Damascus goats were under the $1000 \times 10^3/\text{mL}$ in all lactation periods. It is also reported that milk SCC might be between $270 - 2000 \times 10^3/\text{mL}$ in healthy goats and it is not possible to obtain reliable information about health of mammary gland and milk quality by determining only SCC, regardless of lactation period in goats (Moroni et al., 2005; Souza et al., 2012). Unlike cattle, it is reported that breed and lactation period (especially end of the lactation) are one of the most important parameters for SCC in goats (Granado et al., 2014; Kuchtik et al., 2015). Similar to the findings of this study, Yakan et al. (2019) reported that milk SCC increased in the late lactation stages in the same breed of goats. This is considered to be the lactation characteristic of Damascus goats. While it is reported that SCC does not change even if daily milking frequency increases in

Murciano-Granadine breed goats (Salama et al., 2003), in another study, it is reported that SCC decreases as daily milking frequency increases in Alpine breed goats (Komara et al., 2009). Granado et al. (2014) reports that this is due to the dilution effect of milk. Unlike other ruminants, the lactation characteristic of goats in terms of SCC depends on breed type along with other factors.

Electrical conductivity is a marker for early detection of mastitis in cattle farms (Cavero et al., 2006). There are contradictions in the literature about the relationship between electrical conductivity and mastitis due to breed factor in goats (Diaz et al., 2011). In a study, it is reported that lactation stage is an important factor for electrical conductivity of milk in goats (Diaz et al., 2011). In that study, it is reported that the significant and gradual increase of electrical conductivity was detected with the continuation of lactation.

Chemical composition of goat milk and cow milk are similar (Kuchtik et al., 2015). However, goat milk has more alkaline pH values. Hence, goat milk is more suitable than cow milk for those suffering from stomach acid imbalance (Kuchtik et al., 2015). On the other hand, pH is one of the most important factors in goats for dairy products like cheese (Yakan et al., 2019). In a study comparing different breeds, the pH of the milk is reported to be around 6.53-6.64 in the early period of lactation (Agnihotri and Rajkumar, 2007), while in this study, it is determined that the Damascus breed's pH value is around 6.67-6.70 during lactation stages. Considering the effect of lactation period on milk quality, it is determined that there are no significant differences in terms of measured pH according to lactation stage. In a study similar to this study, pH is reported to be similar during the early lactation period and other periods of lactation in Sahel, Sokoto Red, WAD and Damascus goat breeds (Addass et al., 2013; Yakan et al., 2019).

In a study investigating the effect of lactation period on milk composition in Baladi goats in Egypt, it is reported that lactose, which was around 4.00% in the early period, was similar in the mid-lactation period and decreased in the late period. However, it has been determined that there is no significant change in milk fat and protein (El-Tarabany et al., 2018). In another study conducted in Saanen X Kilis crossbreed goats, it is reported that milk fat, protein and lactose contents were 3.45, 4.00 and 4.00%, respectively (Güzeler et al., 2010). The Damascus goat's milk composition has some differences than other breeds at different lactation stages. It is thought that the possible reason of these differences are breed type and different environmental features.

ELS covers the period when the lactation curve is highest in Damascus goats, therefore, milk yield in this stage constitutes the peak of lactation (Yakan et

al., 2019). In the lactation periods with high lactation yield, the decrease of milk fat is normal physiological and biological property in ruminants. However, the milk protein ratio is generally stable in lactation. It is expected to be a pathological condition for this ratio to change. Therefore, a negative correlation between milk fat and milk protein in ELS confirms the relevant mechanisms.

Fat-free dry matter consists of a very large amount of lactose and protein and a very small amount of minerals and vitamins. Therefore, a very high positive correlation between lactose and protein is to be expected. On the other hand, as the amount of solids forming FFDM in milk increases, freezing point decreases, therefore the negative correlation between these two parameters confirms the relevant mechanisms.

It is known that protein, lactose, and electrical conductivity are significantly affected by lactation stages (Ceballos et al., 2009; Prasad et al., 2005; Yakan et al., 2019). Prasad et al. (2005) was reported that fat, protein and lactose parameters were strongly correlated in all lactation. It is understood with this study that MLS reflects the typical goat milk characteristics.

In a study, it was reported that positive and significant correlations were found between electrical conductivity and SCC ($<1000 \times 10^3/\text{mL}$ and $>2000 \times 10^3/\text{mL}$) in mastitis-free goats (Diaz et al., 2011). It was believed that it might also be related with mineral contents of milk. With our results and other studies (Bruckmaier et al., 2005; Diaz et al., 2011) it was understood that nonspecific relations were found between SCC and electrical conductivity in mastitis-free goats.

The results of this study showed that there were significant differences in milk composition during lactation periods. Beside the secretion type of goats, breed should be considered the most important factor. On the other hand, depending on the lactation period, it is understood that more than one parameter in milk is directly related to each other. For understanding the differences and relations, more studies on the molecular level are needed on about milk composition in Damascus goats.

Acknowledgements

This study was supported by Scientific Research Council of Hatay Mustafa Kemal University with 19M057 project number.

References

- Addass PA, Tizhe MA, Midau A, Alheri PA, Yahya MM. Effect of genotype, stage of lactation, season and parity on milk composition of goat in Mubi, Adamawa State, Nigeria. *Ann Biol Res* 2013; 4(8): 248-52.

- Agnihotri MK, Rajkumar V. Effect of breed, parity and stage of lactation on milk composition of western region goats of India. *Int J Dairy Sci* 2007; 2(2): 172-7.
- Albenzio M, Campanozzi A, D'apolito M, Santillo A, Mantovani MP, Sevi A. Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. *Small Rumin Res* 2012; 105(1-3): 202-5.
- Anghel A, Nadolu D, Sava A, Cismileanu A, Ropota M, Voicu I. Chemical composition and fatty acid profile of Carpathian goat milk as related to the stage of lactation. *Arch Zootech* 2017; 20(2): 59-68.
- Bruckmaier RM, Ontsouka C, Blum JW. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet Med* 2005; 49(8): 283-90.
- Cavero D, Tölle KH, Buxadé C, Krieter J. Mastitis detection in dairy cows by application of fuzzy logic. *Livest Sci* 2006; 105(1-3): 207-13.
- Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal* 2009; 22(4): 322-9.
- Crisà A, Ferrè F, Chillemi G, Moioli B. RNA-Sequencing for profiling goat milk transcriptome in colostrum and mature milk. *BMC Vet Res* 2016; 12(1): 264.
- Diaz JR, Romero G, Muelas R, Sendra E, Pantoja JCF, Paredes C. Analysis of the influence of variation factors on electrical conductivity of milk in Murciano-Granadina goats. *Int J Dairy Sci* 2011; 94(8): 3885-94.
- El-Tarabany MS, El-Tarabany AA, Roushdy EM. Impact of lactation stage on milk composition and blood biochemical and hematological parameters of dairy Baladi goats. *Saudi J Biol Sci* 2018; 25(8): 1632-8.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database <http://www.fao.org/faostat/en/#data>; Accessed date: 02.03.2020.
- Fekadu B, Soryal K, Zeng S, Van Hekken D, Bah B, Villaquiran M. Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. *Small Rumin Res* 2005; 59(1): 55-63.
- Granado RJ, Rodríguez MS, Arce C, Estévez VR. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Span J Agric Res* 2014; (1): 133-50.
- Güzeler N, Say D, Kaçar A. Compositional changes of Saanen X Kilis goats' milk during lactation. *Gida* 2010; 35(5): 325-30.
- Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 2004; 51(2): 155-63.
- Keskin M, Avşar YK, Biçer O, Güler MB. A comparative study on the milk yield and milk composition of two different goat genotypes under the climate of the Eastern Mediterranean. *Turk J Vet Anim Sci* 2004; 28(3): 531-6.
- Komara M, Boutinaud M, Chedly HB, Guinard-Flament J, Marnet PG. Once-daily milking effects in high-yielding Alpine dairy goats. *Int J Dairy Sci* 2009; 92(11): 5447-55.
- Kuchtík J, Králíčková Š, Zapletal D, Węglarzy K, Šustová K, Skrzyżalal I. Changes in physico-chemical characteristics, somatic cell count and fatty acid profile of Brown Short-haired goat milk during lactation. *AnimSci Pap Rep* 2015; 33(1): 71-83.
- Leitner G, Merin U, Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Int J Dairy Sci* 2004; 87(6): 1719-26.
- Lu J, Liu L, Pang X, Zhang S, Jia Z, Ma C, Lv J. Comparative proteomics of milk fat globule membrane in goat colostrum and mature milk. *Food Chem* 2016; 209: 10-6.
- Marounek M, Pavlata L, Mišurová L, Volek Z, Dvořák R. Changes in the composition of goat colostrum and milk fatty acids during the first month of lactation. *Czech J Anim Sci* 2012; 57: 28-33.
- Moroni P, Pisoni G, Ruffo G, Cortinovis I, Casazza G. Study of intramammary infections in dairy goats from mountainous regions in Italy. *N Z Vet J* 2005; 53(5): 375-6.
- Prasad H, Tewari HA, Sengar OPS. Milk yield and composition of the beetal breed and their crosses with Jamunapari, Barbari and Black Bengal breeds of goat. *Small Rumin Res* 2005; 58(2): 195-9.
- Raynal-Ljutovac K, Gaborit P, Lauret A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Rumin Res* 2005; 60(1-2): 167-77.
- Salama AAK, Such X, Caja G, Rovai M, Casals R, Albanell E, Marti A. Effects of once versus twice daily milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *Int J Dairy Sci* 2003; 86(5): 1673-80.
- Sanchez A, Sierra D, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, Contreras A, Gonzalo C. Influence of storage and preservation on Fossomatic cell count

- and composition of goat milk. *Int J Dairy Sci* 2005; 88(9): 3095-100.
- Sanchez-Macias D, Moreno-Indias I, Castro N, Morales-Delanuez A, Argüello A. From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *Int J Dairy Sci* 2014; 97(1): 10-6.
- Sandolhm M, Honkanen-Busalski T, Kaartinen L, Pyorola S, eds. *The Bovine Udder and Mastitis*. First Edition. Finland: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995; p.312.
- Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Rumin Res* 2012; 107(2-3): 65-75.
- William BR, Edmondson P. *Mastitis Control in Dairy Herds*. Second Edition. USA; Cabi, 2010; p. 53.
- Yakan A, Özkan H, Şakar AE, Ateş CT, Ünal N, Koçak Ö, Özbeyaz C. Milk yield and quality traits in different lactation stages of Damascus goats: Concentrate and pasture based feeding systems. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2019; 66: 117-29.
- Yurchenkoo S, Sats A, Tatar V, Kaart T, Mootse H, Jõudu I. Fatty acid profile of milk from Saanen and Swedish Landrace goats. *Food Chem* 2018; 254: 326-32.
- Zailan MZ, Yaakub H. Milk composition and fatty acids profile at different stages of lactation in Jamnapari crossbred goats. *Mal J Anim Sci* 2018; 21: 109-22.
- Zecconi A, Dell'Orco F, Vairani D, Rizzi N, Cipolla M, Zanini L. Differential Somatic Cell Count as a Marker for Changes of Milk Composition in Cows with Very Low Somatic Cell Count. *Anim* 2020; 10(4): 604.
- Zhu JJ, Luo J, Wang W, Yu K, Wang HB, Shi HB, Li J. Inhibition of FASN reduces the synthesis of medium-chain fatty acids in goat mammary gland. *Anim* 2014; 8(9): 1469-78.



Milk Traits of Damascus Goats at Different Lactation Stages: 2. Fatty Acid Profiles and Related Lipogenic Genes Expression Levels*

Hüseyin ÖZKAN¹, Akın YAKAN^{1, 2}, İrem KARAASLAN², Baran ÇAMDEVİREN³

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Genetics, Hatay-TURKEY

²Hatay Mustafa Kemal University, Technology and Research & Development Center (MARGEM), Hatay-TURKEY

³Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Genetics, Hatay-TURKEY

Corresponding author: Hüseyin ÖZKAN; E-posta:hozkan@mku.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5753-8985

How to cite: Özkan H, Yakan A, Karaslan İ, Çamdeviren B. Milk traits of Damascus goats at different lactation stages: 2. Fatty acid profiles and related lipogenic genes expression levels. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 325-333.

Summary:In the present study, goat milk fatty acid profile and some of the lipogenic genes activities in milk somatic cells were evaluated during the lactation periods in Damascus goats. Relationship between fatty acid profile and lipogenic genes during the lactation were also investigated. The lactation periods of goats were divided to three stages as early, mid and late lactation. Beside fatty acid profile, *FASN*, *SCD*, *ACACA*, *SREBPF1*, and *PPAR γ* genes expression levels were determined in milk. It was determined that fatty acid contents of milk samples changed during the lactation ($P<0.05$). *FASN* and *SCD* gene expression levels were downregulated in mid and late lactation stages ($P<0.05$). While *ACACA* was almost 3 folds upregulated in mid lactation stage ($P<0.05$), *SREBPF1* was approximately 9 folds downregulated in late lactation stage ($P<0.01$). Also, significant correlations were found between fatty acids and lipogenic genes in different lactation stages ($P<0.05$). In conclusion, it was determined that Damascus goats showed different metabolic activities in different stages of lactation in terms of both fatty acid profile and some lipogenic genes. It was thought that more studies at the molecular level is needed for understanding the complex milk fatty acid profile mechanism of goats.

Key words: Damascus goat, lactation period, lipogenic gene expression, milk fatty acids

Farklı Laktasyon Dönemlerindeki Damascus Keçilerinde Süt Özellikleri: 2. Yağ Asidi Profili ve Onunla İlişkili Bazı Lipogenik Genlerin Ekspresyon Seviyeleri

Özet: Bu çalışmada, laktasyon periyodundaki Damascus keçilerinde süt yağ asidi profili ve süt somatik hücrelerinde bazı lipogenik genlerin aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, laktasyon boyunca yağ asidi profili ile lipogenik genler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Keçilerin laktasyon dönemleri erken, orta ve geç laktasyon dönemi olarak üçe ayrılmıştır. Yağ asidi profilinin yanı sıra sütte *FASN*, *SCD*, *ACACA*, *SREBPF1* ve *PPAR γ* genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Süt örneklerinde yağ asidi içeriğinin laktasyon boyunca değiştiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). *FASN* ve *SCD* gen ekspresyon seviyeleri erken ve geç laktasyon dönemlerinde az ifade edilmiştir ($P<0.05$). *ACACA* orta laktasyon döneminde yaklaşık 3 kat fazla ifade edilirken ($P<0.05$), *SREBPF1* geç laktasyon döneminde yaklaşık 9 kat az ifade edilmiştir ($P<0.01$). Ayrıca farklı laktasyon dönemlerinde yağ asitleri ve lipogenik genler arasında anlamlı korelasyonlar bulunmuştur ($P<0.05$). Sonuç olarak Damascus keçilerinin laktasyonun farklı dönemlerinde hem yağ asidi profili hem de bazı lipogenik genler bakımından değişik metabolik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Keçilerin karmaşık olan süt yağ asidi profili mekanizmasını anlamak için moleküler düzeyde daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Damascus keçisi, laktasyon periyodu, lipogenik gen ekspresyonu, süt yağ asitleri

Introduction

Major advances in animal breeding have been achieved over the past century with effective breeding techniques. Goat is one of the most important farm animals and goat milk and dairy products are valuable dietary resources for human nutrition (Albenzio et al., 2012). Fatty acid profile is a significant parameter for nutritional quality of milk and goat milk has substantial differences in terms of milk fatty acid profile (Bernard et al., 2012).

Fatty acids are essential components of mammals

(Suburu et al., 2014). The proportions of dietary fatty acids affect sustainable health of human. While over-feeding with a diet rich in saturated fatty acids such as C12:0, C14:0 and C16:0 have negative effects on human health, it is reported that some of the short fatty acids such as C4:0 has positive effects (Bernard et al., 2012). Goat milk has higher levels of fatty acids compared to cow's milk (Lin et al., 2013). Also, goat milk is richer than cow's milk in C6:0, C8:0 and C10:0 fatty acids than cow's milk (Chillard, 1997; Marounek et al., 2012).

In ruminants, a number of fatty acids in milk are *de novo* synthesized in the mammary gland. It is reported that those fatty acids shorter fatty acids than

C16:0 are derived mammary epithelial cells (Zhang et al., 2015). On the other hand, arterial blood is the other source of milk fatty acids and long chain fatty acids are derived from triacylglycerides or non-esterified fatty acids (NEFA) in arterial blood (Bernard et al., 2012; Zhang et al., 2015). Sources of C16:0 are either mammary gland or arterial blood (Zhang et al., 2015).

As well as nutrition, lactation stage has an important effect on milk fatty acid profile in ruminants. A series of physiological changes occur in the ruminants during the lactation period. In lactation the molecular activity of the mammary glands along with lipogenic organs changes. Therefore, a number of alterations occur in the milk fatty acid profile directly and indirectly depending on the complex molecular mechanisms of mammary gland (Suburu et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Thanks to the development of technology in the last 20 years, the functioning of molecular mechanisms has become more comprehensible. On the other hand, molecular mechanism of fatty acids synthesis in mammary gland has not completely understood, yet (Ataşoğlu et al., 2009; Sun et al., 2016). In this study, goat milk fatty acid profile and some of the lipogenic genes activities in milk somatic cells are evaluated during the lactation periods in Damascus goats. Relationship between fatty acid profile and lipogenic genes during the lactation has also been investigated.

Materials and Methods

Animals and milk sampling

In the present study, milk samples of healthy 20 goats randomly selected from 200 animals were used. The breed type of goats was Damascus. On the other hand, goats were in 3rd-4th lactation periods. A week after births, goats were on the pasture for grazing (06:00 to 18:00 a day). Goats consumed concentrate feed (300 g/head/day) in addition to grazing. The lactation periods of goats were divided to into three stages: Early (10-20 days after parturition, Early Lactation Stage (ELS)), mid (100-110 days after parturition, Mid Lactation Stage (MLS)) and late (200-210 days after parturition, Late Lactation Stage (LLS)). Milk samples were collected in these three stages of lactation.

Collection of cream layer and somatic cells

Approximately 50 mL volume milk samples were centrifuged at + 4 °C at 1800 xg for 15 min. Following the centrifugation, samples were kept at -20 °C for about 15 min. Cream layers of samples were collected in new sterile tubes with a volume of 1.5 mL when they were ready to be collected for fatty acid analyzes. Cream samples were kept at -20 °C until fatty acid

analyzes.

After removing the cream layers, the supernatants were removed and the cell pellets were taken to new 15 ml volume sterile and RNase-DNase free falcon tubes with the help of PBS (Phosphate Buffered Saline). Cell suspensions in the falcon tubes were completed with PBS to 15 mL and centrifuged at + 4 °C at 1800 xg for 15 min. After centrifugation, supernatants of samples were discarded and approximately 1 mL TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich, USA) was added to pellets for total RNA isolation. Pellets were homogenized with TRIzol Reagent and stored -80 °C until molecular analyzes.

Fatty acid analyzes

Fatty acid profile of samples was determined with using approximately 500 µL cream from each sample. After homogenization the creams with 2 mL of 2N methanolic KOH for 4 min at room temperature, 4 mL n-Heptane (Merck, USA) was added to the samples. After waiting at room temperature for 2 min, samples were centrifuged at 200 xg for 5 min. Aqua phase containing Methyl esters was transferred to vials with a volume 1.5 mL. Fatty acids of milk samples were analyzed by Gas Chromatography equipped with flame ionization detector (Shimadzu GC-2025, Japan), auto-injector (Shimadzu AOC-20i, Japan) and Restek Rt-2560 column (100 m length, 0.25 mm ID x 0.20 µm). Temperatures of injector and detector were both kept at 250 °C. Hydrogen was used as carrier gas and the gas flow was 1.20 mL/min. Injection mode was split mode with split ratio of 1:50 and total injection volume was 1 µL. Injector was rinsed with n-heptan, three times pre-run and six times post-run. Temperature gradient program was used. The initial oven temperature was 100 °C (hold for 2 min) and it was then increased by 4 °C/min until 250 °C (hold for 15 min). The run was 54.50 min. For the verification of fatty acids, the determined sample peaks retention times were compared with that of internal standard (FAME Mix, Restek, USA).

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA's of samples were isolated according to the TRIzol Reagent kit protocol (Rio et al., 2010). Protocol of kit was as follows: After waiting approximately 15 min at room temperature, 0.25 mL chloroform was added to each sample and the samples were gently homogenized. Samples were centrifuged with chloroform at + 4 °C at 12000 xg for 15 min after waiting 10 min at room temperature. Following the separation of RNA with centrifugation, 400 µL aqua phases were transferred to new 1.5 mL nuclease free -sterile eppendorf tubes immediately afterwards. Isopropyl alcohol was added (half of using TRIzol) for precipitation of RNA and then centrifuged at + 4 °C at 12000 xg for 10 min. Thereafter, supernatant of sam-

ples were discarded and 70% ethyl alcohol was added to the each sample. Samples were centrifuged at + 4 °C at 7500 xg for 5 min and supernatants were discarded. This step was repeated twice. Finally, RNA pellets were centrifuged for washing with 99% ethyl alcohol at + 4 °C at 7500 xg for 5 min. Supernatants was discarded from samples, and RNA pellets were dried at room temperature for about 10-15 min.

RNA pellets were dissolved and homogenized with 30-100 µL of nuclease free water and checked for

Cat no: 4367659) was used for qPCR analyses. The reaction was arranged 10 min at 95 °C, followed by 15 sec at 95 °C, 60 sec at 60 °C, and 40 cycles in qPCR (Bio-Rad CFX-96 Touch Real time PCR, USA). Each cDNA sample was studied as duplicate and *G6PD* gene was used as reference gene. Primers forward and reverse sequences were shown in Table 1.

Table 1. Forward and reverse sequences of primers amplified genes

Genes	Forward and Reverse Sequences of Primers	Product Length
<i>FASN</i> *	F: 5'-GCACACAATATGGACCCCA-3' R: 5'-CATGCTGTAGCCTACGAGGG-3'	183
<i>SCD</i> *	F: 5'-ATCGCCCTTACGACAAGACC-3' R: 5'-CATAAGCCAGACCGATGGCA-3'	186
<i>ACACA</i> *	F: 5'- GCCTGCCCGAGTTTTGAGTG-3' R: 5'-CGCACTCTGGAGCGGATAAA-3'	105
<i>PPARγ</i> *	F: 5'-GTTCAACGCGCTGGAATTAG-3' R: 5'-GGGCTTCACATTCAGCAAAC-3'	97
<i>SREBP1</i> *	F: 5'-AACATCTGTTGGAGCGAGCA-3' R: 5'-TCCAGCCATATCCGAACAGC-3'	134
<i>G6PD</i> #	F: 5'-TGACCTATGGCAACCGATACAA-3' R: 5'-CCGAAAAGACATCCAGGAT-3'	76

*: Sequences of Primers were designed by authors, #:Sequences of primer were designed by Garcia-Crespo et al. (2005)

quality. Samples purity and concentration were controlled in the nucleic acid meter (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer). In addition to this step, rRNA subunits (28S and 18S rRNAs) were evaluated in 1% agarose gel electrophoresis (100V and 25 min).

After DNA digestion was performed for possible genomic DNA contamination with DNase kit (DNase I, RNase free, Thermo Scientific, USA, Cat no: EN0525), RNA samples were converted to cDNA via RevertAid first Strand cDNA synthesis kit (Thermo-Scientific, USA). Thermal cyler (Bio-Rad T100, USA) protocol was as follows: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C, and 5 min at 85 °C. Following the reaction, samples volumes were completed to 200 µL with nuclease-free water and stored – 80 °C until qPCR analyzes.

Quantitative Real-Time PCR application

After converting total RNA samples to cDNA, *FASN* (Fatty Acid Synthase), *SCD* (Sterol CoA Desaturase), *ACACA* (Acetyl-CoA Carboxylase Alpha), *SREBP1* (Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1), and *PPAR γ* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) genes expression levels were determined. Amplification of target genes was performed using 10 µL of each cDNA of samples. SYBR Green dye containing kit (Power SYBR® Green PCR Master, ThermoFisher Scientific, USA,

Statistical analysis

Descriptive statistics were described as "Mean±Standard error of mean". Pearson correlation coefficient was performed to determine the relationships between the fatty acids and genes of goat milk. MIXED procedure of SPSS (V22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyses the effect of the period of lactation as early, mid and late term on the fatty acid parameters of goat milk by using the following model with repeated measures:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + e_{ijk}$$

Where, Y_{ijk} , dependent variable; μ , overall mean; P_i , effect of period of lactation (i = early, mid and late term); and e_{ijk} , residual error.

Animals within group were assessed as a random effect, while period of assessed as a fixed effect. $P < 0.05$ was considered as significant in all analyses. Thrombogenic and atherogenic indexes were calculated using fatty acid parameters (Ulbricht and Southgate, 1991). On the other hand, the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used for gene expression calculations, and results were given as fold changes (Livak and Schmitgen 2001).

Results

Table 2. Fatty acids profile of milk samples in different stages of lactation (Means±SE)

Fatty acids	ELS	MLS	LLS	P
C4:0 (%)	1.52±0.12 ^{ab}	1.47±0.10 ^b	1.87±0.15 ^a	<0.05
C6:0 (%)	1.92±0.15	2.25±0.14	2.19±0.15	-
C8:0 (%)	2.14±0.23 ^b	3.25±0.20 ^a	2.58±0.17 ^b	<0.01
C10:0 (%)	5.98±0.72 ^c	10.94±0.67 ^a	8.65±0.44 ^b	<0.001
C12:0 (%)	2.22±0.23 ^c	4.56±0.33 ^a	3.28±0.16 ^b	<0.001
C14:0 (%)	6.41±0.46 ^b	9.68±0.64 ^a	9.94±0.23 ^a	<0.001
C14:1 (%)	0.06±0.01 ^c	0.14±0.03 ^b	0.42±0.02 ^a	<0.001
C15:0 (%)	0.46±0.03 ^b	1.02±0.05 ^a	1.04±0.03 ^a	<0.001
C15:1 (%)	0.28±0.01 ^a	0.24±0.01 ^b	0.29±0.01 ^a	<0.01
C16:0 (%)	22.69±0.75 ^b	24.71±1.11 ^b	28.64±0.69 ^a	<0.001
C16:1 (%)	1.01±0.03 ^a	0.99±0.09 ^a	0.76±0.02 ^b	<0.01
C17:0 (%)	1.28±0.18 ^a	1.11±0.11 ^a	0.74±0.01 ^b	<0.01
C17:1 (%)	0.74±0.08 ^a	0.78±0.09 ^a	0.24±0.03 ^b	<0.001
C18:0 (%)	18.63±0.96 ^a	12.57±0.91 ^b	13.61±0.52 ^b	<0.001
C18:1 (%)	20.17±0.93	19.10±1.06	21.30±0.79	-
C18:2 n6 trans (%)	1.16±0.20 ^a	0.98±0.08 ^a	0.28±0.02 ^b	<0.001
C18:2 n6 cis (%)	5.39±0.55 ^a	2.74±0.17 ^b	2.03±0.06 ^b	<0.001
C20:0 (%)	0.64±0.07 ^a	0.34±0.06 ^b	0.04±0.01 ^c	<0.001
C18:3 n6 (%)	0.56±0.07 ^b	0.90±0.08 ^a	0.46±0.04 ^b	<0.001
C18:3 n3 (%)	2.74±0.53 ^a	1.09±0.16 ^b	0.72±0.03 ^b	<0.001
C20:1 (%)	2.39±0.32 ^a	0.20±0.05 ^b	0.06±0.01 ^b	<0.001
C20:2 n6 (%)	0.82±0.14 ^a	0.14±0.05 ^b	0.11±0.01 ^b	<0.001
C22:0 (%)	0.16±0.03	0.14±0.06	0.11±0.01	-
C20:3 n3 (%)	0.12±0.03 ^b	0.11±0.03 ^b	0.20±0.02 ^a	<0.05
C20:4 n6 (%)	0.28±0.05	0.33±0.07	0.17±0.02	-
C22:2 n6 (%)	0.09±0.01	0.13±0.02	0.09±0.01	-
C20:5 n3 (%)	0.09±0.01 ^{ab}	0.06±0.01 ^b	0.10±0.01 ^a	<0.05
C22:6 n3 (%)	0.04±0.01 ^b	0.04±0.02 ^b	0.10±0.01 ^a	<0.001
∑SFA	64.05±1.62 ^b	72.05±1.24 ^a	72.68±0.84 ^a	<0.001
∑MUFA	24.66±0.90 ^a	21.45±1.04 ^b	23.07±0.80 ^{ab}	<0.05
∑PUFA	11.29±1.34 ^a	6.51±0.53 ^b	4.25±0.10 ^c	<0.001
∑UFA	35.95±1.62 ^a	27.95±1.24 ^b	27.32±0.84 ^b	<0.001
∑n-6	8.42±0.88 ^a	5.32±0.39 ^b	3.33±0.09 ^c	<0.001
∑n-3	2.99±0.56 ^a	1.30±0.19 ^b	1.12±0.04 ^b	<0.001
∑n6/n3	3.54±0.40 ^b	4.68±0.32 ^a	3.02±0.11 ^b	<0.001
OI	11.57±1.12 ^b	17.91±0.02 ^a	15.28±0.83 ^a	<0.001
NV	1.73±0.09 ^a	1.34±0.09 ^b	1.24±0.06 ^b	<0.001
AI	1.35±0.10 ^b	2.13±0.19 ^a	2.12±0.10 ^a	<0.001
TI	1.27±0.07 ^b	1.56±0.11 ^a	1.75±0.06 ^a	<0.001

SFA: Saturated Fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated Fatty acids; UFA: Unsaturated fatty acids; OI: Odour index; NV: Nutritive Value; AI: Atherogenic index;

TI: Thrombogenic index

OI= (C4:0+C6:0+C8:0+C10:0);

NV=(C18:0+C18:1)/C16:0;

AI= (C12:0+(4*C14:0)+C18:0)/∑UFA;

TI= (C14:0+C16:0+C18:0)/((0.5*C18:1)+(0.5*∑MUFA)+(0.5*∑n6)+(3*∑n3)+(∑n3/∑n6));

a, b, c, ab: Means with different letters in rows differ significantly

It was determined that most of the fatty acids levels of milk samples changed during the lactation period. In ELS, besides C16:1, C17:0, C18:0, C18:2 n6 *trans*, C18:2 n6 *cis*, C20:0, C18:3 n3, C20:1 fatty acids, polyunsaturated fatty acid (PUFA), unsaturated fatty acid (UFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), n6, n3, and nutritive value levels were highest, while C10:0, C12:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0, SFA (saturated fatty acid), odour index, atherogenic index and thrombogenic index levels were lowest. On the other hand, C4:0, C15:1, C18:0, C20:5 n3 fatty acids, and MUFA levels were the lowest, meanwhile C8:0, C10:0, C12:0 fatty acids, n6/n3 ratio, and odour index levels were highest in the MLS. In addition, the levels of C4:0, C20:3 n3, C20:5 n3, C22:6 n3 fatty acids were highest, while C16:1, C17:1, C18:2 n6 *trans*, C18:2 n6 *cis*, C20:0, C18:3 n6, C18:3 n3, C20:1, PUFA, n6, n3, n6/n3, nutritive value were lowest in LLS (Table 2).

Significant changes were also determined in gene expression levels. Compared to ELS, *FASN* and *SCD* genes expression levels were downregulated almost 10 folds in MLS and LLS (P<0.05). On the other hand, *ACACA* gene expression levels were almost 3 folds upregulated in MLS. In addition to this, *SREBPF1* were approximately 9 folds downregulated in LLS (Figure 1).

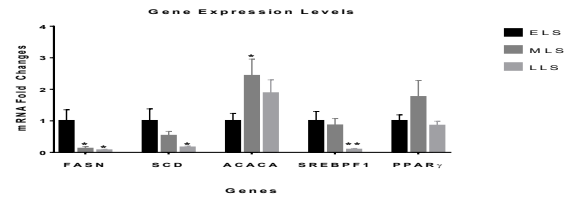


Figure 1. Expression levels of lipogenic genes in somatic cells during early, mid and late lactation
*: P<0.05; **: P<0.01

Table 3. Correlations between lipogenic genes and fatty acid parameters in different lactation stages

Parameters	ELS			MLS				LLS					
	<i>FASN</i>	<i>SCD</i>	<i>ACA-CA</i>	<i>SREB-PF1</i>	<i>PPARγ</i>	<i>FASN</i>	<i>SCD</i>	<i>SREB-PF1</i>	<i>PPARγ</i>	<i>FASN</i>	<i>SCD</i>	<i>SREB-PF1</i>	<i>PPARγ</i>
<i>FASN</i>		0.969***											
<i>SCD</i>						0.940***	0.815***			0.723**	0.661**		
<i>ACA-CA</i>				-0.600*				-0.595*	0.706**				0.699**
<i>SREB-PF1</i>									-0.531*				
C4:0 (%)	0.522*	0.513*		0.501*	-0.729**	0.496*	0.577*	0.566*					
C6:0 (%)	0.668**	0.624*											
C8:0 (%)	0.587*	0.549*											
C15:0 (%)			0.628*		0.554*								
C15:1 (%)									0.609*				
C16:1 (%)			0.647*							-0.552*	-0.564*		
C18:2 <i>trans</i> (%)									0.574*				
C20:2 n6 (%)													-0.477*
C22:0 (%)										-0.473*	-0.474*	-0.688**	
C20:4 n6 (%)										-0.534*	-0.469*	-0.496*	
C22:2 n6 (%)									0.488*				
C20:5 n3 (%)							-0.583*						
ΣPUFA													-0.471*
OI	0.584*	0.557*											
AI		0.507*											

PUFA: Polyunsaturated Fatty acids; **OI:** Odour index; **NV:**Nutritional Value; **AI:** Atherogenic index

OI= (C4:0+C6:0+C8:0+C10:0);

NV= (C18:0+C18:1)/C16:0;

AI = (C12:0+(4*C14:0)+C18:0)/ΣUFA*: P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001; -:P>0.05

*:P<0.05; **: P<0.01

Only statistically significant differences were showed in Table 3.

In addition to determining fatty acid profile and lipogenic genes expression levels in milk during lactation periods, correlations between these parameters were also investigated. Regulation of C4:0 fatty acid syntheses were found significantly correlated with *FASN* and *SCD* genes in ELS and MLS. However, no correlation was found between C4:0 fatty acids and the gene studied in LLS. Also, positive and significant correlations were found between other short-chain fatty acids with *FASN* and *SCD* in ELS. In the meantime, *FASN* ($r=0.584$; $P<0.05$) and *SCD* ($r=0.557$; $P<0.05$) were found significantly correlated with odour index in this stage of lactation. Atherogenic index of ELS samples were also correlated with expression levels of *SCD* ($r=0.507$; $P<0.05$).

C15:0 fatty acid was found positively correlated with *ACACA* ($r=0.628$; $P<0.05$) and *PPAR γ* ($r=0.554$; $P<0.05$) genes in ELS. On the other hand, there was also positive correlation between C15:1 fatty acid and *PPAR γ* in MLS ($r=0.609$; $P<0.05$). While C16:1 fatty acid was correlated with *ACACA* ($r=0.647$; $P<0.05$) in ELS, negative correlations were determined between this fatty acid with *FASN* ($r=-0.552$; $P<0.05$) and *SCD* ($r=-0.564$; $P<0.05$) in LLS. C18:2 n6 *trans*, one of the longer fatty acid, positively correlated with *PPAR γ* in MLS ($r=0.574$; $P<0.05$).

Some of the fatty acids longer than C16:0 were found strongly correlated especially in MLS and LLS ($P<0.05$). While *SCD* gene expression levels were found negatively correlated with C20:5 n3 ($r=-0.583$; $P<0.05$), positive correlation was found between *PPAR γ* and C22:2 n6 fatty acid ($r=0.488$; $P<0.05$). Once again, negative correlations were found between C22:0 fatty acids with *SCD* ($r=-0.473$; $P<0.05$), *SREBPF1* ($r=-0.474$; $P<0.05$), and *PPAR γ* ($r=-0.688$; $P<0.01$) in LLS. Similar correlations were also found C20:4 n6 and *SCD* ($r=-0.534$; $P<0.05$), *SREBPF1* ($r=-0.469$; $P<0.05$), and *PPAR γ* ($r=-0.496$; $P<0.01$) in this stage of lactation. On the other hand, PUFA and *PPAR γ* were found negatively correlated in LLS ($r=-0.471$; $P<0.05$) (Table 3).

Correlations between studied genes were also investigated (Table 3). *FASN* and *SCD* were found significantly and highly correlated in all lactation stages ($P<0.01$). Also, *FASN* and *SCD* gene expression levels were significantly correlated with *SREBPF1* gene expression levels in MLS and LLS samples ($P<0.01$). While *ACACA*, the major regulator of fatty acid biosynthesis, were positively correlated with *PPAR γ* in MLS ($r=0.706$; $P<0.01$) and LLS ($r=0.699$; $P<0.01$), negative correlations were found between *ACACA* and *SREBPF1* genes in ELS ($r=-0.600$; $P<0.05$) and MLS ($r=-0.595$; $P<0.05$). But in this study, *SREBPF1*, major lipogenic transcription factor, were negatively correlated with *PPAR γ* in MLS ($r=-0.531$; $P<0.05$) (Table 3).

Discussion and Conclusion

It was reported that the levels of C4:0, C6:0, C8:0 and C10:0 fatty acids were higher in goat milk than cow milk and all these fatty acids were more responsible for milk odour index (Kompan and Komprej, 2012; Sun et al., 2016). C6:0, C8:0 and C10:0 fatty acids were relatively abundant in goat milk, so they were named as caproic, caprylic, and capric acid, respectively (Kompan and Komprej, 2012). In a study conducted on semi-intensive feeding Damascus goats, a similar breed of this study, it was reported that the ratios of C4:0-C8:0 fatty acids were similar levels in all lactation stages (Güler et al., 2007). Unlike the results of Güler et al. (2007), the highest level of C4:0, also known as butyric acid, was found in LLS. Besides, the highest levels of C6:0, C8:0, and C10:0 fatty acids were in MLS as expected. The main reason for this difference was thought to be the factors such as the age and season of lactation. It was reported that the amount of C6:0-C10:0 fatty acids increased during the peak period of lactation in goats (Strzałkowska et al., 2009).

While positive correlations were determined between C4:0 fatty acids and most of the targeted genes expression levels in ELS and MLS, no correlation was found between C4:0 and any other gene in LLS. Mammary gland was reported to be the primary organ where the synthesis of short-chain fatty acids in milk occurs (Zhang et al., 2015). Therefore, physiological changes at the molecular levels in the mammary gland were thought to be the main reason for the reduction of C4:0 fatty acids in MLS.

FASN, a vital enzyme expressed in many tissues at different levels, was reported to perform majority of the enzymatic stages of fatty acid synthesis (Badaoui et al., 2007; Suburu et al., 2014). In most of the studies, researchers were focused on the relation between *FASN* gene and long chain fatty acid (Kadegowda et al., 2009; Suburu et al., 2014; Zhu et al., 2014). *FASN* is a multi-functional polypeptide enzyme that produces saturated fatty acids and is a priority for the synthesis of C16:0 fatty acid (Suburu et al., 2014). It is reported to be responsible for the production of C14:0 and C18:0 as well as C16:0 fatty acids (Jayakumar et al., 1995). On the other hand, a limited number of studies are found to investigate the relationship between *FASN* and short chain fatty acids in goat milk (Izadi et al., 2016; Zhu et al., 2014). Although *FASN* and *SCD* genes were reported to be crucial in fatty acid metabolism, it was found that these genes do not have a direct relationship to the short-chain fatty acid ratios causing high odour index in Damascus goat's milk. It is because *FASN* and *SCD* gene expression levels decreased significantly in MLS and LLS while odour index was high. It was reported in a study conducted on goats, *de novo* lipogenesis mediated by *SREBPF1* in mammary gland

(Zhang et al., 2018). Also, *SREBPF1* was reported to be involved in the desaturation of fatty acids (Sun et al., 2016). This transcription factor was reported to be particularly effective on *FASN* and partially *ACACA* gene (Yao et al., 2017; Xu et al., 2016). It was thought that lower level of C15:0 might be caused by the association of C15:0 with *ACACA* and *PPAR γ* in ELS (Table 3). There was also positive correlation between C15:1 and *PPAR γ* in MLS ($P < 0.05$). It was reported that *PPAR γ* , one of the leading regulators of lipogenesis, had a close relationship with lipogenic genes such as *FASN* and *ACACA* (Zhu et al., 2015). It was reported that SCD was directly regulated in the mammary gland by *SREBPF1* and *PPAR γ* (Shi et al., 2013). In another study, it was reported that *FASN* and *SCD* genes positively affect fatty acid composition of ruminant milk in terms of human consumption (Izadi et al., 2016).

While C16:1 fatty acid was positively correlated to *ACACA* in ELS ($P < 0.05$), negative correlation was found between this fatty acid and *FASN* and *SCD* in LLS ($P < 0.05$). Also some of the fatty acids longer than C16:0 were found strongly correlated in MLS and LLS ($P < 0.05$). Although arterial blood was showed as the source of long chain fatty acids (Zhang et al., 2015), it was understood with this study that the mammary gland and milk somatic cells were also responsible for the long fatty acids in goat milk.

It was reported in a study that *ACACA* is one of the most important target genes of *SREBPF1* in goat mammary epithelial cells (Xu et al., 2018). *PPAR γ* was also reported to regulate genes associated with fatty acid metabolism throughout lactation by triggering *SREBPF1* (Bionaz and Looor, 2008; Kast-Woelber et al., 2004; Shi et al., 2013). Likewise, in a study conducted on bovine mammary epithelial cells, *PPAR γ* and long chain fatty acids were reported to affect the regulation of lipogenic genes (Kadegowda et al., 2009). But in this study, *SREBPF1*, a major lipogenic transcription factor, was negatively correlated with *PPAR γ* in MLS ($r = -0.531$; $P < 0.05$). It was understood that the correlation between these two genes in mammary gland might change in the different lactation stages in goats and lipogenic pathway in mammary gland were re-regulated with the metabolism-responsible tissues of the organism in different lactation stages. Izadi et al. (2016) and Yao et al. (2017) were reported that *SCD* has a key role in synthesis of MUFA and long chain fatty acids in general. In this study, however, it was determined that there was no direct relationship between *SCD* gene expression levels and MUFA in milk. Although *SCD* known as an enzyme responsible for the synthesis of MUFA and long-chain fatty acids, it was understood from this study that *SCD* did not have the same effect on somatic cells at every stage of lactation (Yao et al., 2017). MUFA's, relatively longer fatty acids, were reported to have largely originated from arterial blood

(Bernard et al., 2012; Zhang et al., 2015). Therefore, it was thought that tissue specific activity of *SCD* gene might led to these results.

Although it was reported that the synthesis of long chain fatty acids mostly depends on diet (Zidi et al., 2010), positive correlations were found between longer fatty acids and expression levels of lipogenic genes in milk somatic cells.

Synthesis of fatty acids in goat mammary gland has not fully been understood at the molecular level. However, the main cause of differences between breed in terms of fatty acid profile is reported to be genetic (Zidi et al., 2010). Genetic factors at the DNA levels are responsible for the formation of quantitative characters but more studies are needed for understanding the environmental effects to molecular activity. Studies about fatty acid synthesis in goat mammary gland are mostly conducted through cell culture (Shi et al., 2013; Sun et al., 2016). This is one of the factors that limit the understanding of the physiological process of the milk fatty acid profile of goats. On the other hand, the role of lipogenic genes in mammary gland of goats remains unclear. While obtained results, such as nutritive value and odour index, show that milk is more preferable in the first period of lactation (ELS), it is thought that other lipogenic genes should be investigated in goat milk with new studies on the regulation of milk fatty acid composition.

In conclusion, the relationship between molecular activity in milk somatic cells and milk fatty acid profile was investigated in different lactation stages with this study. In this way, substantial data was obtained from Damascus goat milk. Researches about molecular mechanism of mammary gland of goats were mostly focused on cell culture studies. On the other hand, it is generally known that long chain fatty acids in milk originate from arterial blood. But in this study, significant correlations were found between long chain fatty acids in milk and lipogenic genes expressed in milk somatic cells. In this context, it was understood that more studies are needed for understanding the complex mechanism of regulation the milk fatty acid profile of goats.

Acknowledgement

This study was supported by Scientific Research Council of Hatay Mustafa Kemal University with 19M057 project number.

References

- Albenzio M, Campanozzi A, D'apolito M, Santillo A, Mantovani MP, Sevi A. Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein

- allergy. *Small Rum Res* 2012; 105(1-3): 202-5.
- Ataşoğlu C, Uysal-Pala Ç, Karagül-Yüceer Y. Changes in milk fatty acid composition of goats during lactation in a semi-intensive production system. *Arch Anim Breed* 2009; 52(6): 627-36.
- Badaoui B, Serradilla JM, Tomas A, Urrutia B, Ares JL, Carrizosa J, Amills M. Goat acetyl-coenzyme A carboxylase α : Molecular characterization, polymorphism, and association with milk traits. *Int J Dairy Sci* 2007; 90(2): 1039-43.
- Bernard L, Leroux C, Rouel J, Bonnet M, Chilliard Y. Effect of the level and type of starchy concentrate on tissue lipid metabolism, gene expression and milk fatty acid secretion in Alpine goats receiving a diet rich in sunflower-seed oil. *Br J Nut* 2012; 107(8): 1147-59.
- Bionaz M, Looor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC genomics* 2008; 9(1): 366.
- Chilliard Y. Biochemical characteristics of goat milk lipids. A comparison with cow's and human milk. *Colloq l'INRA* 1997; 81(1): 51-61.
- Garcia-Crespo D, Juste RA, Hurtado A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet Res* 2005; 1(1): 3.
- Güler Z, Keskin M, Masatçioğlu T, Gül S, Bicer O. Effects of breed and lactation period on some characteristics and free fatty acid composition of raw milk from Damascus goats and German fawn x Hair goat b_1 crossbreeds. *Turk J Vet Anim Sci* 2007; 31(5): 347-54.
- Izadi MS, Naserian AA, Nasiri MR, Heravi RM, Valizadeh R. Evaluation of SCD and FASN Gene Expression in Baluchi, Iran-Black, and Arman Sheep. *Rep Biochem Mol Biol* 2016; 5(1): 33.
- Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, Al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Waki SJ. Human fatty acid synthase: Properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(19): 8695-99.
- Kadegowda AKG, Bionaz M, Piperova LS, Erdman RA, Looor JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *Int J Dairy Sci* 2009; 92(9): 4276-89.
- Kast-Woelbern HR, Dana SL, Cesario RM, Sun L, de Grandpre LY, Brooks ME, Leibowitz MD. Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor γ and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 23908-15.
- Kompan D, Komprij A. The effect of fatty acids in goat milk on health. In: *Milk Production-An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*. New York: Intech Open 2012; pp. 12-15.
- Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. MiR-103 controls milk fat accumulation in goat (*Capra hircus*) mammary gland during lactation. *PLoS One* 2013; 8(11): 79258.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- Marounek M, Pavlata L, Mišurová L, Volek Z, Dvořák R. Changes in the composition of goat colostrum and milk fatty acids during the first month of lactation. *Czech J Anim Sci* 2012; 57: 28-33.
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* 2010; (6): 5439.
- Shi H, Luo J, Zhu J, Li J, Sun Y, Lin X, Shi H. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *PPAR Res* 2013; 310948.
- Strzałkowska N, Jóźwik A, Bagnicka E, Krzyżewski J, Horbańczuk K, Pyzel B, Horbańczuk JO. Chemical composition, physical traits and fatty acid profile of goat milk as related to the stage of lactation. *Anim Sci Pap Rep* 2009; 27(4): 311-20.
- Suburu J, Shi L, Wu J, Wang S, Samuel M, Thomas MJ, Chen YQ. Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *Am J Physiol-Endoc M* 2014; 306(10): 1132-43.
- Sun Y, Luo J, Zhu J, Shi H, Li J, Qiu S, Looor JJ. Effect of short-chain fatty acids on triacylglycerol accumulation, lipid droplet formation and lipogenic gene expression in goat mammary epithelial cells. *Anim Sci J* 2016; 87(2): 242-9.
- Ulbricht TLV, Southgate DAT. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet* 1991; 338(8773): 985-92.
- Xu H, Luo J, Ma G, Zhang X, Yao D, Li M, Looor JJ. Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (ACSS2) is regulated by SREBP-1 and plays a role in fatty acid synthesis in caprine mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 2018; 233(2): 1005-16.

- Xu HF, Luo J, Zhao WS, Yang YC, Tian HB, Shi HB, Bionaz M. Overexpression of SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) promotes de novo fatty acid synthesis and triacylglycerol accumulation in goat mammary epithelial cells. *Int J Dairy Sci* 2016; 99(1): 783-95.
- Yao D, Luo J, He Q, Shi H, Li J, Wang H, Looor JJ. SCD1 alters long-chain fatty acid (LCFA) composition and its expression is directly regulated by SREBP-1 and PPAR γ 1 in dairy goat mammary cells. *J Cell Physiol* 2017; 232(3): 635-49.
- Zhang H, Ao CJ, Song LW, Zhang XF. Effects of different model diets on milk composition and expression of genes related to fatty acid synthesis in the mammary gland of lactating dairy goats. *Int J Dairy Sci* 2015; 98(7): 4619-28.
- Zhang T, Huang J, Yi Y, Zhang X, Looor JJ, Cao Y, Luo J. Akt serine/threonine kinase 1 regulates de novo fatty acid synthesis through the mammalian target of rapamycin/sterol regulatory element binding protein 1 axis in dairy goat mammary epithelial cells. *J Agric Food Chem* 2018; 66(5): 1197-205.
- Zhu J, Sun Y, Luo J, Wu M, Li J, Cao Y. Specificity protein 1 regulates gene expression related to fatty acid metabolism in goat mammary epithelial cells. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1): 1806-20.
- Zhu JJ, Luo J, Wang W, Yu K, Wang HB, Shi HB, Li J. Inhibition of FASN reduces the synthesis of medium-chain fatty acids in goat mammary gland. *Animal* 2014; 8(9): 1469-78.
- Zidi A, Fernández-Cabanás VM, Urrutia B, Carrizosa J, Polvillo O, González-Redondo P, Serradilla JM. Association between the polymorphism of the goat stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene and milk fatty acid composition in Murciano-Granadina goats. *Int J Dairy Sci* 2010; 93(9): 4332-9.



Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Uygulamalarında Kullanılan RNA'ların Kalite Kontrolleri ve Önemi

Ali Osman TURGUT, Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Ali Osman TURGUT; E-posta: aoturgut@mehmetakif.edu.tr; ORCID: 0000-0001-6863-0939.

Atıf yapmak için: Turgut AO, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) uygulamalarında kullanılan RNA'ların kalite kontrolleri ve önemi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 334-341.

Özet: RNA kalitesi, RT-qPCR performansı ve güvenilirliği açısından dikkat edilmesi gereken önemli bir husustur. RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirilmesine dikkat edilmemesi, yapılan bilimsel çalışmaların güvenilirliği açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu noktada, RT-qPCR çalışmasının her aşamasında gerekli standartlara uyulması ve RNA kalite değerlendirmesinin mutlaka yapılması gerekmektedir. RNA kalitesinin çalışmanın her aşamasında yüksek tutulması, RT-qPCR verimliliğinin ve elde edilen sonuçların güvenilirliğinin artırılmasına olanak tanımaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçları üzerine olan etkisini ve RNA kalite değerlendirmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu derlemede, RNA kalitesi, RNA kalite değerlendirmesine kullanılan yöntemler ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerinden bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gen ekspresyonu, MIQE, RNA kalitesi, RT-qPCR

Quality Controls and Importance of RNAs Used in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Applications

Summary: RNA quality is an important consideration for RT-qPCR performance and reliability. The lack of attention to RNA quality assessment poses a significant risk for the reliability of scientific studies in RT-qPCR studies. At this point, the required standards must be followed, and RNA quality assessment must be performed at every stage of the RT-qPCR study. Maintaining high RNA quality at each stage of the study enables to increase efficiency of RT-qPCR and reliability of the results. Numerous studies have demonstrated the effect of RNA quality on RT-qPCR results and the need for RNA quality assessment. In this review; RNA quality, methods used for RNA quality assessment and the effects of RNA quality on RT-qPCR performance are discussed.

Key words: Gene expression, MIQE, RNA quality, RT-qPCR

Giriş

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction; RT-qPCR); her bir PCR siklusu süresince oluşan PCR ürünlerin gerçek zamanlı olarak tespitine ve miktarının belirlenmesine olanak sağlayan moleküler bir tekniktir (VanGuilder ve ark., 2008). RT-qPCR'da oluşan PCR ürünlerinin gerçek zamanlı olarak görümlenmesi, çift iplikçikli DNA'ya bağlanan floresan boyalar yardımıyla mümkün olmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan boyalardan biri Syber Green I'dir (Li ve ark., 2016). Bunun yanı sıra, TaqMan prob ve moleküler boncuk (molecular beacon) gibi, yükseltgen bölgeye bağlanarak floresan ışığı yapan daha gelişmiş ve spesifik oligonükleotid temelli sistemler de bulunmaktadır (Kozera ve Rapacz, 2013). RT-qPCR; gen ekspresyon çalışmaları (Agaoglu ve ark., 2015; Agaoglu ve ark., 2016), genomik ve viral DNA kopya sayısı hesaplanması (Ingham, 2005), allelik varyasyonların incelenmesi (Johnson ve ark., 2004) ile genlerin spesifik sığıpları

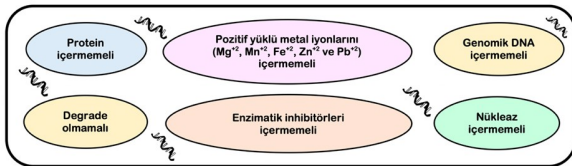
(splicing) varyantlarının ekspresyon analizleri (Sethi ve Palefsky, 2004) gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Ancak, RT-qPCR özellikle gen ekspresyon çalışmalarında daha yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Kozera ve Rapacz, 2013; Green ve Sambrook, 2018). RT-qPCR tekniğinde; genetik bilginin transkripsiyonu sonucu oluşan mesajcı RNA (messenger RNA; mRNA), reverse transkriptaz (reverse transcriptase; RT) enzimi ile komplementer DNA'ya (complementary DNA; cDNA) dönüştürülmektedir. Oluşan bu cDNA'lar qPCR reaksiyonunda hedef DNA olarak kullanılmaktadır. Bu sayede ilgili genin ekspresyon düzeyinin tespiti mümkün olmaktadır (Valasek ve Repa, 2005).

RT-qPCR çalışmalarının ilk adımını örneklerin toplanması, saklanması ve RNA'nın izole edilmesi oluşturmaktadır. RNA izolasyonunda dikkat edilmesi gereken bazı kriterler bildirilmiştir (Fleige ve Pfaffl, 2006) (Şekil 1). Bu anlamda, izole edilen RNA'ların kalite ve kantite kontrollerinin yapılması önemlidir (Green ve Sambrook, 2018). Öyle ki, yapılan çok sayıda çalışma, RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçlarının güvenilirliği açısından kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Imbeaud ve ark., 2005; Fleige ve ark., 2006; Becker ve ark., 2010; Vermeulen ve ark., 2011;

Geliş Tarihi/Submission Date : 03.09.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.02.2020

McGovern ve ark., 2018). RNA oldukça hassas bir moleküldür (Becker ve ark., 2010). RNA'nın uzun süre saklanması, olumsuz saklama koşulları, UV ışınlar, alkalik pH, yüksek ısı, metal iyonları ve ortamda sürekli olarak bulanabilen ribonükleazlar (RNaz) RNA'nın kalitesi açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Becker ve ark., 2010; Nielsen, 2010; Vermeulen ve ark., 2011). Alkalik pH, nükleotidler arasındaki fosfat gruplarının yapısını bozarak, RNA'nın hızlı bir şekilde yıkımlanmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, RNA ile çalışırken pH'nın nötral veya hafif asidik değerlerde bulunması gerektiği belirtilmektedir (Nielsen, 2010; Nilsen, 2013). Benzer şekilde, yüksek ısı RNA'nın yıkımlanmasına sebep olmaktadır (Nielsen, 2010). Bu nedenle, toplanan örnekler sıvı nitrojen içerisinde dondurularak (Nilsen, 2013) veya koruyucu solüsyonlar (RNALater) ile muamele edilerek ısıya bağlı RNA kalitesinin düşmesinin engellenmesi sağlanabilmektedir (Nielsen, 2010). Ayrıca, RT-qPCR çalışmalarında kullanılan RNA'ların kalitesinin korunabilmesi için yapılan uygulamaların buz üzerinde (0-4 °C) gerçekleştirilmesi önerilmektedir (Das ve ark., 2010; Nielsen, 2010). Pozitif yüklü metal iyonları (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2}) ise nötral pH'da fosfat grupları ile etkileşim halinde bulunmaktadır. pH'nın yükselmesi durumunda metal iyonları hidrolizi tetikleyerek RNA zincirinin kırılmasına sebep olmaktadır (Nilsen, 2013). Ancak, RNA kalitesine etki eden en önemli faktör RNaz'dır (Nilsen, 2013). RNaz; yüksek ısı ve kimyasal uygulamalara karşı oldukça dirençli bir ribonükleazdır (Nilsen ve ark., 2013). RNaz; iyi temizlenmemiş cam malzemelerde, bakterilerde, insan derisinde, kontamine olmuş pipet ve malzemelerde bulunmakta ve RNA moleküllerini hızlı bir biçimde yıkımlayarak, RNA kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Nielsen, 2010; Green ve Sambrook, 2018). Bu nedenle; RT-qPCR çalışmalarında; cDNA aşamasından önce izole edilen RNA'nın yeterli kalitede ve miktarda olduğunun kesin olarak belirlenmesi ve PCR reaksiyonunun yüksek kalitedeki RNA ile sürdürülmesi gerekmektedir (Green ve Sambrook, 2018). Bu sayede, RT-PCR çalışmalarında daha güvenli sonuçların elde edilmesi mümkün olmaktadır (Fleige ve ark., 2006; Green ve Sambrook, 2018).



Şekil 1. RNA izolasyonunda dikkat edilmesi gereken bazı önemli kriterler

RT-qPCR uygulamalarında; gen ekspresyon profillerinin daha sağlıklı bir şekilde ortaya konulabilmesi için PCR aşamalarında izlenilmesi gereken temel gereksinimleri içeren bir makale (Minimum Information for

Publication of Quantitative Real Time PCR; MIQE guidelines) yayımlanmıştır (Bustin ve ark., 2009). RT-PCR uygulamaları için belirlenen bu standartlar sayesinde, yapılan çalışmaların güvenilirliğinin ve verimliliğinin artırılması ve farklı laboratuvarlar arasında uygulama birliği oluşturulması hedeflenmiştir (Becker ve ark., 2010). MIQE standartlarında, RNA kalite değerlendirmesi üzerinde önemle durulmuş ve dikkat edilmesi gereken hususlar belirtilmiştir (Bustin ve ark., 2009).

Bu derlemede, RNA'nın kalite kontrolü, RNA'nın kalite kontrolünde kullanılan yöntemler, RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçlarının güvenilirliği üzerine olan etkileri ve önemi hakkında bilgiler özetlenmiştir.

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu amacıyla geliştirilmiş farklı yöntemler bulunmaktadır. Genel olarak bu yöntemler; solüsyon temelli yöntemler (klasik RNA izolasyon yöntemi) ve kolon temelli yöntemler (katı faz nükleik asit izolasyonu) olarak sınıflandırılmaktadır ve bu yöntemlerle ilgili geliştirilmiş çok sayıda ticari kit bulunmaktadır (Tan ve Yiap, 2009).

Klasik RNA İzolasyon Yöntemi

Nükleik asitlerin izolasyonu; hücrenin ve hücresel bileşenlerin parçalanması, nükleaz aktivitesinin engellenmesi ve istenilen nükleik asit moleküllerinin hücresel bileşenlerden ayrılarak saflaştırılması aşamalarından oluşmaktadır (Nilsen ve ark., 2013). İzolasyon işlemi, RNA'nın izole edileceği materyalin organik bir çözücü de yıkımlanması ile başlamaktadır (Li ve ark., 2016). Guanidin izotiyosinat ve sodyum dodesil sülfat (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) gibi kimyasallar, RNA izolasyonu amacıyla kullanılan materyalin yıkımlanması ve RNaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Nilsen, 2013).

Guanidin izotiyosinat kullanılarak RNA izolasyonu, ilk olarak Ullrich ve ark., (1977) tarafından yapılmıştır. Daha sonra bu yöntem Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından modifiye edilerek, tek bir adımdan oluşan bir izolasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin prensibi, RNA'nın guanidin izotiyosinat, fenol ve kloroformdan oluşan asidik solüsyon içerisinde, DNA'dan ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Chomczynski ve Sacchi 2006). Fenol, proteinlerin hızlı bir şekilde yıkımlanmasını sağlamaktadır (Sambrook ve Russel, 2001). Kloroform ise RNA'nın, DNA ve diğer hücresel moleküllerden ayrıştırılması için gerekli faz oluşumunu sağlamaktadır. Kloroform, solüsyonda üç ayrı faz oluşturmaktadır (Li ve ark., 2016). Alt kısımda proteinleri içeren organik faz (organic phase), üst kısımda izole edilecek RNA'yı içeren sıvı faz (aqueous phase) bulunmaktadır (Nilsen ve ark., 2013; Li ve ark., 2016). İki faz arasında ise (interfaz) DNA ve bazı denatüras-

yonu uğramış proteinler bulunmaktadır (Nilsen, 2013). Kloroform aynı zamanda sıvı faz içerisindeki fenolün uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Nielsen, 2010). İzolasyon sırasında kontaminasyonu engellemek için sadece RNA'yı içeren üstteki sıvı fazın alınması ve kullanılan pipetin diğer fazlara temasından kaçınılması gerekmektedir (Nilsen ve ark., 2013). Sıvı faz alındıktan sonra izopropanol ile muamele edilerek izole edilen RNA'nın saflığı artırılabilir (Sambrook ve Russel, 2001).

RNA izolasyonunda fenol ve guanidin izotiyosinat içeren TRIzol solüsyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2016; Green ve Sambrook; 2018). TRIzol, hücreleri ve hücresel bileşenleri hızlı bir şekilde yıkımlayarak total RNA'nın izole edilmesine olanak tanımaktadır. (Nilsen, 2013). RNA izolasyonunda TRIzol kullanımının; kullanılan kimyasalların hazır olması, elde edilen RNA miktarının yüksek olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması gibi avantajları bulunmaktadır (Nilsen, 2013; Green ve Sambrook, 2018). Ancak TRIzol solüsyonunda bulunan fenolik bileşikler, RT-qPCR'in inhibisyonuna neden olabilmektedir (Nilsen, 2013). Bu nedenle, izole edilen RNA'daki tüm fenol bileşiklerinin kesin olarak uzaklaştırılması gerektiği belirtilmektedir (Green ve Sambrook, 2018). RNA izolasyonu sonrasında, RNA pelletini içeren sıvı kısmın berrak olması gerekmektedir. Herhangi bir bulanıklık, RNA'nın kontamine olduğuna işaret etmektedir. Böyle bir durumda izolasyon işleminin tekrarlanması gerektiği bildirilmektedir (Nilsen, 2013).

Katı Faz Nükleik Asit İzolasyon Yöntemleri

Katı faz nükleik asit izolasyonu, çoğu ticari RNA izolasyon kitinin temel prensibini oluşturmaktadır (Tan ve Yiap, 2009). Bu yöntem, klasik izolasyon yöntemi ile kıyaslandığında nükleik asitlerin hızlı ve etkili bir şekilde izolasyonuna olanak tanımaktadır (Esser ve ark., 2005). Ayrıca klasik yöntemde karşılaşılan faz oluşumu ile ilgili problemleri de ortadan kaldırmaktadır (Tan ve Yiap, 2009). Katı faz nükleik asit izolasyonunda, nükleik asitleri (RNA ve DNA) bir silika membran üzerinde toplayan saflaştırma kolonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Rio ve ark., 2010a; Li ve ark., 2016). Kolon içerisindeki membranlar nükleik asitleri tutarken, nükleik asitler dışındaki diğer moleküllerin geçişine izin vermekte ve bu sayede RNA'nın saflaştırılmasını sağlamaktadır (Li ve ark., 2016). Ancak cam partikül, diyatumlu toprak ve manyetik boncuk gibi farklı prensiplerde çalışan katı faz nükleik asit izolasyon sistemleri de bulunmaktadır (Tan ve Yiap, 2009; Rio ve ark., 2010a).

Katı faz izolasyon yöntemi; hücrenin parçalanması, nükleik asitlerin adsorpsiyonu, yıkama ve elüsyon aşamalarından oluşmaktadır (Kojima ve Ozawa, 2002). İlk aşamada biyolojik materyal bir lizis solüsyonu kullanılarak yıkımlanmakta ve saflaştırma kolonlarına aktarılmaktadır. Daha sonra, yüksek pH ve tuz

konsantrasyonunun yardımıyla nükleik asitler kolonlardaki membranlara tutunmaktadır (Gjerse ve ark., 2009). Nükleik asitlerin yanı sıra proteinler de membranlara tutunabilmektedir (Tan ve Yiap, 2009). Bu nedenle, proteinler çeşitli yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmaktadır. Proteinler uzaklaştırıldıktan sonra, elüsyon solüsyonları ile nükleik asit membranlardan ayrılmaktadır (Gjerse ve ark., 2009). Yıkama ve elüsyon aşamalarında yüksek devirlerde santrifüj uygulanarak RNA izole edilmektedir (Tan ve Yiap, 2009).

Katı faz RNA izolasyonu amacıyla farklı firmalar tarafından geliştirilmiş ticari kitler kullanılmaktadır (Tan ve Yiap, 2009; Rio ve ark., 2010a). Bu RNA izolasyon kitlerinin bazıları total RNA izolasyonu amacıyla kullanılırken, bazıları da istenilen spesifik RNA fragmentlerinin [microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), transfer RNA (tRNA), small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), mRNA] izolasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Rio ve ark., 2010a).

RNA İzolasyonu Sonrası RNA Kalitesinin Artırılması İçin Yapılan Uygulamalar

RNA saflığının artırılması için izolasyon sonrası ilave protokollerin uygulanması gerekebilmektedir (Nolan ve Bustin, 2008). RNA hidrofilik bir yapıdadır ve suda kolayca çözünebilmektedir (Rio ve ark., 2010b). Bu nedenle, RNA'nın hidrofilik yapısının azaltılması ve RNA saflığının artırılması için örneklere etanol presipitasyonu yapılması önerilmektedir (Rio ve ark., 2010b; Nilsen, 2013; Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonunda, RNA'nın hidrofilik yapısının azaltılması için pozitif yüklü tuz molekülleri (sodyum asetat, amonyum asetat, lityum klorid) kullanılmaktadır. Pozitif yüklü tuz molekülleri RNA'nın negatif yükünü nötralize etmektedir. Etanol ise tuz molekülleri ile RNA'nın daha rahat bir şekilde etkileşime geçmesini sağlayarak, RNA'nın santrifüj sonrası rahat bir şekilde çöktürülmesine olanak tanımaktadır (Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonunda, tuz moleküllü olarak sodyum asetat yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nilsen, 2013; Walker ve Lorsch, 2013). Sodyum asetat RNA moleküllerinin etkili bir şekilde çöktürülmesine yardımcı olurken, herhangi bir reaksiyonun inhibisyonuna neden olmamaktadır (Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonu sayesinde, 15 nükleotid ve daha büyük RNA fragmentleri kolayca çöktürülmekte ve RNA saflığı artırılabilir (Rio ve ark., 2010b). Ancak etanol presipitasyonu için RNA örneklerinin konsantrasyonunun en az 10 µg/mL olması gerektiği belirtilmektedir (Rio ve ark., 2010b; Nilsen, 2013).

RNA izolasyonu sonrasında, RNA'nın saflığının artırılması için yapılan bir diğer işlem genomik DNA'nın uzaklaştırılmasıdır (Nolan ve Bustin, 2008; Green ve Sambrook; 2018). Genomik DNA, PCR sırasında hedef mRNA ile birlikte yükseltgenerek yanıltıcı sonuçlara sebep olabilmektedir. Hedef mRNA miktarı-

nın yüksek olması durumunda, genomik DNA'nın yükseltgenmesi önemsiz olarak değerlendirilebilmektedir. Ancak hedef mRNA miktarının düşük olması durumunda genomik DNA'nın yükseltgenmesi, hedef mRNA'nın yükseltgendiği şeklinde değerlendirilebilmektedir (Green ve Sambrook, 2018). Bu nedenle, genomik DNA'nın uzaklaştırılması ve RNA saflığının artırılması için RNA örneklerine DNaz uygulaması yapılması önerilmektedir (Nolan ve Bustin; 2008; Bustin ve ark., 2009).

RT-qPCR Uygulamaları İçin Kullanılan RNA'nın Kalite Kontrolleri ve Önemi

RNA kalitesi, izole edilen RNA'nın bütünlüğüne (RNA integrity) ve saflığına (RNA purify) bakılarak değerlendirilmektedir (Becker ve ark., 2010). RNA'nın saflığı ve bütünlüğü farklı kavramlardır. Bu nedenle, RNA saflığı ve bütünlüğü ile ilgili ölçümlerin birbirinden bağımsız bir biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir (Die ve Román, 2012). Güvenilir RT-qPCR çalışmaları için RNA bütünlüğünün ve saflığının iyi olması gerekmektedir (Fleige ve Pfaffl, 2006; McGroven ve ark., 2018). Bu nedenle de çalışma öncesi RNA kalitesinin belirlenmesi önem taşımaktadır (Green ve Sambrook, 2018).

RNA Kalite ve Kantite Kontrolleri

RNA'nın kalite kontrolü için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak RNA kalite kontrolleri genel olarak; klasik jel elektroforezi, spektrofotometrik yöntemler, mikrofluidik kapiller elektroforez sistemi ve 3':5' oranı kullanılarak yapılmaktadır (Fleige ve Pfaffl, 2006; Becker ve ark., 2010; Green ve Sambrook, 2018).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan klasik bir yöntemdir. Bu yöntem, ribozomal RNA (rRNA) kalitesinin aynı zamanda mRNA kalitesini yansıttığı prensibine dayanmaktadır (Die ve Román, 2012). Bu yöntemde, rRNA bantlarının yoğunlukları birbirine oranlanarak (28S/18S) değerlendirme yapılmaktadır. Bu oranın 2'ye yakın olması; RNA bütünlüğünün iyi olduğuna dair bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Becker ve ark., 2010; Nilsen, 2013). Ancak bu yöntemde rRNA bantlarının görünümü; elektroforez şartlarına, yüklenen rRNA miktarına ve floresan ışığa amacıyla kullanılan kimyasala göre değişebilmektedir. Bu nedenle, bu yöntem diğer yöntemlere kıyasla daha az güvenilir kabul edilmektedir (Die ve Román, 2012). Ayrıca hassasiyet ve spesifitenin düşük olması (Fleige ve Pfaffl, 2006) ve etidyum bromid gibi toksik kimyasalların kullanılması bu yöntemin diğer dezavantajlarından (Huang ve Fu, 2005). Buna rağmen RNA jel elektroforezi, RNA kalitesinin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerin doğruluğunun teyit edilmesi ve güvenilirliğin artırılması için kullanılmaya devam edilmektedir (Die ve Román, 2012).

Spektrofotometrik Yöntemler

RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem, RNA kalitesinin optik yoğunluğun (optical density; OD) ölçümüdür (Becker ve ark., 2010). Bu yöntemde RNA'nın saflığı, örneklerin farklı dalga boylarındaki ölçümlerine bakılarak yapılmaktadır (Die ve Román, 2012). Nükleik asitler 260 nm ve proteinler 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahipken, kontamine edici faktörler 230 nm ve 320 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahiptir (Becker ve ark., 2010). RNA saflığının değerlendirilmesinde çoğunlukla, örneklerin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerinin 280 nm dalga boyundaki absorbans değerine oranı ($OD_{260/280}$) dikkate alınmaktadır. Bu oranın 1.8-2.0 arası olması durumunda, fenol ve protein kontaminasyonunun olmadığı ve RNA saflığının iyi olduğu kabul edilmektedir (Taylor ve ark., 2010). Ancak bu yöntemin, RNA'nın bütünlüğünün ve yıkılma durumunun (degradation) tespiti noktasında yetersiz kaldığı belirtilmektedir (Nolan ve Bustin, 2008).

Mikrofluidik Kapiller Elektroforez

Bu sistem, total RNA bütünlüğünün ölçülmesinde kullanılan kapiller elektroforez temelli otomatize bir sistemdir (Becker ve ark., 2010). RNA kalite kontrolü amacıyla, farklı firmalar tarafından geliştirilmiş ticari ürünler (Agilent Technologies; 2100 Bioanalyzer ve Bio-Rad Laboratories; Experion) bulunmaktadır (Becker ve ark., 2010; Die ve Román, 2012). Bu sistemde, bir çip üzerine yüklenen örneklerin elektroforezdeki pik değerleri kaydedilerek değerlendirme yapılmaktadır. Sistem aynı zamanda örneklerin jel benzeri bir görüntüsünü oluşturmaktadır. Elde edilen pik değerleri kullanılarak örneklerin 28S/18S oranı hesaplanmaktadır. Örneklerin bütünlüğünü değerlendirmek için ise RNA bütünlük değeri (RNA Integrity Number; RIN) ve RNA kalite göstergesi (RNA Quality Indicator; RQI) değerleri hesaplanmaktadır (Becker ve ark., 2010).

RIN değeri; 28S pikinin yüksekliği, 18S ve 5S pikleri arasındaki alanın oranı (fast area ratio) ve belirteç pikinin yüksekliği dikkate alınarak hesaplanmaktadır. RQI değeri ise; 28S, 18S ve pre-18S alanları değerlendirmeye alınarak hesaplanmaktadır. Elde edilen RIN/RQI değerleri 1-10 arasında sınıflandırılmaktadır (Die ve Román, 2012). En düşük RIN/RQI değeri olan 1; tüm RNA'nın yıkıldığını gösterirken; RIN/RQI değeri 10; RNA örneklerinin bütünlüğünün iyi ve RNA'nın kaliteli olduğunu göstermektedir (Becker ve ark., 2010; Die ve Román, 2012). Bu iki RNA kalite değerlendirme sisteminin de benzer güvenilirlik oranına sahip olduğunu bildirilmektedir (Riedmaier ve ark., 2011). RIN değerlerinin 8'in üzerinde olması sağlam, yüksek kaliteli RNA örneklerini, 5 ile 8 arasında olması orta derecede bozulmuş örnekleri, 5'in altında olması ise yıkılmış RNA örneklerini işaret etmekte-

dir (Fleige ve Pfaffl, 2006; Pazzagli ve ark., 2013). Buradan hareketle, RIN değerleri 5'in üzerinde olan RNA örneklerinin kullanılması, RT-qPCR ile güvenilir bir şekilde sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır (Fleige ve Pfaffl, 2006; Pazzagli ve ark., 2013).

Genel olarak, ürün boyutu 400 baz çiftinden (bç) daha uzun olan RNA fragmentlerinin yükseltgenmesinde RNA bütünlüğünün önemli olduğu ve böyle bir durumda örneklerin RIN değerlerinin en az 5 olması gerektiği ifade edilmektedir. Ürün boyutunun 70-250 bç arası olması durumunda ise RNA bütünlüğünün daha az önem taşıdığı belirtilmektedir. RNA kalitesinin RT-qPCR üzerine olan etkisinin azaltılması için primerlerin genin daha iç bölgelerinden dizayn edilmesinin bir çözüm yolu olabileceği belirtilmektedir (Fleige ve Pfaffl, 2006).

RNA Kalitesinin Değerlendirilmesinde 3':5' Oranı

RNA kalite değerlendirmesinde kullanılan 3':5' oranı, bir referans genin cDNA sentezi sonucu oluşan ampliconlarının tüm mRNA kalitesini yansıttığı prensibine dayanmaktadır (Nolan ve ark., 2006; Die ve Román, 2012). Buna göre, bir referans genin mRNA'sının 3' ucundaki poli A kuyruğuna bağlanan RT enzimi, 5' uçta herhangi bir yıkılma olması durumunda bu bölgeyi atlamaktadır. Bunun sonucunda 5' ucuna yakın olan dizilerin cDNA ürün miktarı, 3' uçtaki poli A kuyruğuna yakın dizilere göre daha az olmaktadır (Nolan ve ark., 2006; Die ve Román, 2012). Bu oranın 1 olması durumunda RNA kalitesinin iyi olduğu, 5 üzeri olması durumunda RNA kalitesinin düşük olduğu kabul edilmektedir (Nolan ve ark., 2006; Nolan ve Bustin, 2008). Bu yöntemin avantajı, RNA kalitesinin rRNA bütünlüğüne göre değil, direkt olarak mRNA kalitesine göre değerlendiriliyor olmasıdır (Vermeulen ve ark., 2011; Die ve Román, 2012). Dezavantajı ise, cDNA sentezinde kullanılan oligo dT primerlerin birden fazla diziyi hedef almasıdır. Böyle bir durumda, hedef mRNA kısmen yıkılmış olsa bile, hedef dışı dizilerin yükseltgenmesine bağlı olarak RNA kalitesinin yanlış yorumlanabileceği belirtilmektedir (Die ve Román, 2012).

Gen Ekspresyonu Çalışmalarında RNA Kalitesinin Önemi

RNA Kalitesinin RT-qPCR Performansı Üzerine Etkisi

Yapılan çok sayıda çalışmada, RNA kalitesinin RT-qPCR performansını önemli ölçüde etkileyebileceği ortaya konmuştur (Imbeaud ve ark., 2005; Fleige ve ark., 2006; Vermeulen ve ark., 2011; McGovern ve ark., 2018). Imbeaud ve ark. (2005) insanlarda farklı dokulardan RNA'yı izole etmiş ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RIN değerine sahip örneklerin ekspresyon düzeyinin daha düşük RIN değerine sahip örneklerle göre daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Bu ne-

denle, RNA bütünlüğünün RT-qPCR sonuçlarına önemli bir etkisi olduğunu ve farklı RNA bütünlük değerlerinin gen ekspresyon seviyesinin 2-7 kata kadar etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Fleige ve ark. (2006) sığırlara ait farklı doku örneklerinden RNA'yı izole etmişler ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla deneysel olarak belli oranlarda RNA'yı yıkımlamışlardır. Çalışma sonunda RIN değerleri ile Cq (quantification cycle) değerleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirlemişler ve düşük kalitedeki RNA'nın Cq değerini artırdığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirmesinin gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. Hammerle-Fickinger ve ark. (2009) sığır kan örneklerinden farklı izolasyon yöntemlerini kullanarak total RNA izole etmişler ve RNA kalitesinin RT-qPCR üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RIN değerine sahip örneklerde RT-qPCR etkinliğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Becker ve ark. (2010) farklı sığır dokularında (karaciğer, kas ve akyuvarlar) yaptıkları çalışmada, RNA yıkılmasının RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yıkılma oranının artmasıyla, örneklerin RIN değerlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. RIN değeri ve Cq arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirlemişler ve düşük RNA kalitesinin RT-qPCR performansını olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Vermeulen ve ark. (2011) nöroblastoma hücre hattı ve biyopsilerinden izole edilen RNA örneklerinin kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RNA kalitesinin RT-qPCR performansını artırdığını ve bu nedenle RNA kalite kontrolünün, daha güvenilir sonuçlar için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Karlsson ve ark. (2016) ratlarda yaptıkları çalışmada donmuş ve stabilizatör kullanılmış doku örneklerindeki (oda sıcaklığında) RNA kalitesini ve bu RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Donmuş doku örneklerinde RIN değerinin stabilizatör kullanılmış örneklerden 1 birim daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca spektrofotometrik ölçümlerde de RNA kalitesinin stabilizatör kullanılan örneklerde daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebinin stabilizatör kullanılan örneklerde devam eden RNaz aktivitesinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak her iki yöntemde de RT-qPCR performansı arasında önemli bir farklılık bulunmadığını rapor etmişlerdir. McGovern ve ark. (2018) kuzularda yaptıkları çalışmada, ölüm sonrası sürenin (karaciğer, dalak, iskelet kası, ileum, tiroid) farklı post-mortem dokularda RNA kalitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sürenin artmasıyla birlikte dokuların çoğunda RNA örneklerinin RIN değerlerinin düştüğünü (karaciğer hariç), buna bağlı olarak tiroid, iskelet kası ve ileum örneklerinde RT-qPCR performansının azaldığını bildirmişlerdir.

RNA bütünlüğünün, gen ekspresyon çalışmalarından elde edilecek sonuçların güvenilirliği açısından önem-

li olduğu vurgulansa da, kısmi olarak yıkılanmış RNA örnekleri ile de güvenilir sonuçların elde edilebileceği belirtilmektedir (Özalp ve ark., 2010; Die ve Román, 2012; Romero ve ark., 2014). Özalp ve ark. (2010) sıcaklığın RNA saflığı ve bütünlüğünü olumsuz etkilediğini ancak buna karşın bütünlüğü iyi olmayan RNA örnekleri ile de RT-qPCR uygulamasının başarılı bir şekilde yürütülebileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Romero ve ark. (2014) da düşük kalitedeki RNA ile gen ekspresyon çalışmalarının yürütülebileceğini ifade etmişlerdir.

RNA Kalitesinin Referans Gen Stabilitesi Üzerine Etkisi

Referans genler veya diğer bir adıyla housekeeping genler; RT-qPCR sonuçlarının normalizasyonu amacıyla kullanılan genlerdir (Bustin ve ark., 2009). RT-qPCR çalışmalarında, RNA bütünlüğündeki varyasyonların normalizasyon ile birlikte elimine edileceği düşünülmektedir (Die ve Román, 2012). Ancak Pérez-Novo ve ark. (2005) RT-qPCR çalışmalarında kullanılan 10 farklı referans genin, kısmen yıkılanmış ve RNA kalitesi iyi olan örneklerdeki stabilitesini karşılaştırmışlar ve bu referans genlerin ekspresyon seviyelerinin, kısmen yıkılanmış RNA örneklerinde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle, düşük RNA kalitesinin RT-qPCR normalizasyonu açısından bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Vermeulen ve ark. (2011) da benzer şekilde RNA kalitesinin referans gen stabilitesini etkilediğini ve düşük RNA kalitesinin referans gen stabilitesinde azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir. McGovern ve ark. (2018) post-mortem kuzu dokularında RIN değerinin düşmesine bağlı olarak referans gen stabilitesinin azaldığını belirlemişlerdir. RIN değerlerindeki ufak düşüşlerin bile normalizasyon için risk oluşturduğunu, bu nedenle daha güvenilir RT-qPCR sonuçları için RIN değerlerinin de dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Genel olarak RNA kalitesi düşük örneklerde normalizasyon işlemi yapmanın güvenilir sonuçlar vermeyeceği ve bu örneklerin değerlendirilmeden çıkarılması gerektiği ifade edilmektedir (Pérez-Novo ve ark., 2005; McGroven ve ark., 2018).

RNA Kalitesinin Tüm Genom Gen Ekspresyon Profili Üzerine Etkileri

RNA kalitesi yalnızca RT-qPCR sonuçlarını değil, mikroçipler ile yapılan tüm genom gen ekspresyon profillemeye sonuçlarını da etkileyebilmektedir. Schoor ve ark. (2003) RNA yıkılanmasının tüm genom gen ekspresyon profili üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kısmi RNA yıkılanmasının gen ekspresyon profilini az bir oranda da olsa olumsuz etkilediğini belirlemişlerdir. RT-qPCR ile de gen ekspresyon profili sonuçlarını doğrulamışlardır. Buna karşın, kısmi olarak yıkılanmış RNA örnekleri ile gen ekspresyon çalışmalarının yapılabileceğini ve güvenilir sonuçların elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Opitz ve ark. (2010)

düşük RNA kalitesinin gen ekspresyon profili üzerine etkilerini araştırmışlardır. Deneysel olarak kanser biyopsi örneklerini 60 °C'de farklı sürelerde tutarak, RNA'yı farklı derecelerde yıkılamışlardır. RNA yıkılanmasının artmasıyla RIN değerlerinde azalma olduğunu ve RNA yıkılanmasının çip üzerinde test edilen 41000 probdan 275'ini etkilediğini belirlemişlerdir. Yıkılanmış RNA örneklerinin gen ekspresyon profili değerlendirmesinin yanlış yorumlamaya sebep olacağını ve bu nedenle gen ekspresyon analizinde düşük kalitedeki RNA örneklerinin ekspresyon profillerinin değerlendirilmeden çıkarılması gerektiğini bildirmişlerdir. Romero ve ark. (2014) ise, savunma sistemi hücrelerinden elde ettikleri RNA örneklerini farklı oranda yıkımlayarak RNA kalitesinin tüm genom gen ekspresyonu profili üzerine etkilerini incelemişlerdir. Oda sıcaklığında RNA örneklerini; 0-12, 12-24, 24-48 ve 48-84 saat arasında değişen farklı sürelerde yıkılamışlardır. Yıkılanma süresinin artmasıyla örneklerin RIN değerlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. RIN değeri azalmasına bağlı olarak ekspresyonu etkilenen gen sayısında artış olduğunu ve düşük RIN değerine sahip örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Buna rağmen, farklı bir normalizasyon stratejisi oluşturarak, düşük RIN değerine sahip örneklerin gen ekspresyon profillerinin değerlendirilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Sonuç

RT-qPCR sonuçlarını etkileyen RNA kalitesinin önemli bir faktör olması sebebiyle, çalışmanın her aşamasında MIQE standartlarına uyulması ve çalışma öncesinde güncel kalite kontrol yöntemleriyle RNA kalite değerlendirilmesinin yapılması önem taşımaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma, RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, gen ekspresyon analizi çalışmalarının yüksek kalitede RNA ile yürütülmesi gerekmektedir. Bu anlamda gen ekspresyonu çalışmalarında RT-qPCR performansının artması ve daha güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

- Agaoglu OK, Agaoglu AR, Guzeloglu A, Aslan S, Kurar E, Kayis SA, Schäfer-Somi S. Gene expression profiles of some cytokines, growth factors, receptors and enzymes (GM-CSF, IFN γ , MMP-2, IGF-II, EGF, TGF- β , IGF-IIR) during pregnancy in the cat uterus. *Theriogenology* 2016; 85(4): 638-44.
- Agaoglu OK, Agaoglu AR, Guzeloglu A, Kurar E, Kayis SA, Ozmen O, Aslan S. Expression of hypoxia inducible factors and vascular endothelial growth factor during pregnancy in the feline uterus. *Theriogenology* 2015; 84(1): 24-33.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl

- MW. mRNA and MicroRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010; 50(4): 237-43.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1(2): 581-5.
- Das PJ, Pari N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, Chaki SP, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* 2010; 74 (6): 1099-106.
- Die JV, Román B. RNA Quality assessment: A view induces from plant qPCR Studies. *J Exp Bot* 2012; 63(17): 6069-77.
- Esser KH, Marx WH, Lisowsky T. Nucleic acid free matrix: regeneration of DNA binding columns. *Biotechniques* 2005; 39(2): 270-1.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 126-39.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 1601-13.
- Gjerse DT, Hoang L, Hornby D. RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography. First Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2009; p. 4.
- Green MR, Sambrook J. Quantification of RNA by Real-Time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 10: 847-56.
- Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Becker C, Meyer HHD, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses. *Biotechnol Lett* 2009; 32: 35-44.
- Huang Q, Fu WL. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(8): 841-2.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(6): 1-12.
- Ingham DJ. The study of transgene copy number and organization. *Methods Mol Biol* 2005; 286: 273-90.
- Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine* 2004; 27: 135-41.
- Karlsson O, Segerström L, Sjöback R, Nylander I, Boren Mats. QPCR Based mRNA quality score show intact mRNA after heat stabilization. *Biomol Detect Quantif* 2016; 7: 21-6.
- Kojima K, Ozawa S. Method for isolating and purifying nucleic acids. United State patent 2002; Patent no: US 6,905,825 B2.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in Real-Time PCR. *J Appl Genetics* 2013; 54: 391-406.
- Li Y, Wang K, Chen L, Zhu X, Zhou J. Quantification of mRNA levels using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). *Methods Mol Biol* 2016; 1406: 73-9.
- McGovern F, Tommy B, Marion R, Torres S. Assessment of RNA stability in postmortem tissue from New-Born lambs. *Anim Biotechnol* 2018; 29(4): 269-75.
- Nielsen H. Working with RNA. Nielsen H eds. *Methods in Molecular Biology*. 2010; pp. 15-28.
- Nilsen TW. The fundamentals of RNA purification. *Cold Spring Harb Protoc* 2013; 7: 618-24.
- Nolan T, Bustin SA. Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. Keer JT, Birch L. eds. In: *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*, 2008; pp.189-207.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using Real-Time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1559-82.
- Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beissbarth T, Gaedcke J. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genet* 2010; 3 (36): 1-14.
- Özalp GR, Şimşek G, Akçağlar S, Shenavai S. Trizol

- RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek plasentomu için oldukça etkili metod değerlendirmesi. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2010; 29(1): 1-6.
- Pazzagli M, Malentacchi F, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Günther K, Hartmann CC, Verderio P, Pizzamiglio S, Ciniselli CM, Tichopad A, Kubista M, Gelmini S. SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods* 2013; 59(1): 20-31.
- Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, Van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *BioTechniques* 2005; 39: 52-56
- Riedmaier I, Bergmaier M, Pfaffl MW. Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnol Biotec Eq* 2011; 24: 2154-9.
- Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Ethanol precipitation of RNA and the use of carriers. *Cold Spring Harb Protoc* 2010b; 6: 1-5.
- Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Guidelines for the use of RNA purification kits. *Cold Spring Harb Protoc* 2010a; 7: 1-4.
- Romero IG, Pai AA, Tung J, Gilad Y. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol* 2014; 12(42): 1-13.
- Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; p. 613.
- Schoor O, Weinschenk T, Hennenlotter J, Corvin S, Stenzl A, Rammensee H-G, Stevanović S. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques* 2003; 35: 1192-201.
- Sethi N, Palefsky J. Transcriptional profiling of dysplastic lesions in K14-HPV16 transgenic mice using laser microdissection. *FASEB J* 2004; 18(1): 1243-5.
- Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 1-10.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A Practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010; 50(4): 1-5.
- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, Goodman HM. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 1977; 196(4296): 1313-9.
- Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29(3): 151-9.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44(5): 619-26.
- Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(9): e63.
- Walker SE, Lorsch J. RNA Purification - Precipitation Methods. *Methods Enzymol* 2013; 530: 337-43



Bir Buzağıda Çoklu Kongenital Anomali Olgusu

İbrahim YURDAKUL¹, Mustafa YALÇIN¹, Özhan KARATAŞ²

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi ABD, Sivas-TÜRKİYE

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji ABD, Sivas-TÜRKİYE

Sorumlu Yazar: İbrahim YURDAKUL; E-posta: ibrahimyurdakul5858@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-5696-5069

Atıf yapmak için: Yurdakul İ, Yalçın M, Karataş Ö. Bir buzağıda çoklu kongenital anomali olgusu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(3): 342-345.

Özet: Bu olgu sunumunda Simmental ırkı 2 günlük bir buzağıda karşılaşılan koksigeal agenezi, atresia ani et vulva, vaginal ektopi ile beraber seyreden çoklu kongenital anomali olgusunun tanısı ve sağaltım sonuçları değerlendirildi. Olguyu kuyruk, anüs ve vulvanın olmaması şikayeti ile kliniğimize getirilen 2 günlük Simmental ırkı bir buzağı oluşturdu. Yapılan klinik muayenede; kuyruk agenezisi, atresia ani et vulva ve buzağının dışkı ve idrarını perineal bölgede ektopik vaginadan köken alan yumuşak fluktuan bir kitlenin delinmesi sonucu yapmakta olduğu saptandı. Operatif olarak uzaklaştırılan kitlenin histopatolojik incelemesinde vagina mukozası ile uyumlu non-keratinize çok katlı yassı epitel belirlendi. Sonuç olarak; nadir olarak rastlanılan bu vakanın klinik pratiğe ve literatüre katkı sağlayacak nitelikte olduğu düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Anomali, atrezia ani et vulva, buzağı, kaudal agenezis, kloaka oluşumu

A Case of Multiple Congenital Anomaly in Calf

Summary: In this case report, the diagnosis and treatment results of multiple congenital anomalies accompanied by coaxial agenesis, atresia ani et vulva, vaginal ectopy in a 2-day-old Simmental calf were evaluated. Our case is composed of a 2-days old simmental calf brought to our clinic with the complaint of absence of tail, anus and vulva. Clinical examination revealed tail agenesis, atresia ani et vulva. It was also detected that the calf was excreting stool and urine in the perineal region as a result of perforation of a soft fluctuant mass originating from the ectopic vagina. Histopathologic examination of the operatively removed mass revealed non-keratinized multilayer squamous epithelium consistent with vaginal mucosa. As a result, we think that this case, which is quite interesting, will contribute to clinical practice and literature.

Key words: Anomaly, atresia ani et vulva, calf, caudal agenesis, cloacal formation

Giriş

Doğumdan sonra vücudu oluşturan her türlü yapı ve organlarda fonksiyon bozukluğu şeklinde görülen kusurlar kongenital anomali olarak tanımlanmaktadır (Bademkiran ve ark., 2009; Abdel-Hakim ve Aref, 2012). Kongenital anomaliler çiftlik hayvanlarında nadir görülmesine rağmen ekonomik olarak önemli kayıplara yol açması ve kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılması sebebiyle büyük önem arz etmektedir (Belge ve ark., 2000). Evcil hayvanlarda kongenital anomalilere oldukça sık rastlanmasına rağmen çoklu kongenital anomalilere sayıca az rastlanıldığı bildirilmektedir (Bademkiran ve ark., 2009; Demiraslan ve ark., 2014; Yayla ve ark., 2017).

Kongenital anomalilerin sebebi kesin olarak bilinmemektedir ancak; embriyogenezis veya fetal gelişiminin çeşitli evrelerinde genetik, çevresel veya genetik çevre etkileşimlerine bağlı yaygın olarak oluşabileceği belirtilmektedir (Newman ve ark., 1999; Yurdakul, 2019). Ayrıca beslenme bozuklukları, stres faktörleri, hatalı damızlık seçimi, gebelik döneminde embriyo gelişimi için zararlı olan çeşitli ilaçların kullanılması ve gebeliğin erken tanısı amacı ile uygulanan rektal pal-

pasyonun etkili olacağı ifade edilmektedir (Alkan ve ark., 1997; Belge ve ark., 2000; Atiba ve Farrag, 2016).

Bu olgu sunumunda; 2 günlük Simmental ırkı bir buzağıda şekillenen çoklu kongenital anomalilerin tanısı ve uygulanan sağaltım sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Olgu Tanımı

Bu olgu sunumunun materyalini; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı kliniğine kuyruk, anüs ve vulvasının olmaması şikayeti ile getirilen 2 günlük, 25-30 kg arasında Simmental ırkı bir buzağı oluşturdu. Yapılan klinik muayenede buzağının perineal bölgesinde yumuşak ve hafif fluktuan kıvamda bir kitlenin olduğu, buzağı sahibinin bu fluktuan kitleyi uç noktasından kesici bir alet ile delmesi neticesinde buzağının ürinyasyon ve defekasyonunu fluktuan kitlede sonradan şekillenen fistül aracılığı ile yaptığı tespit edildi (Şekil 1).

Doğusal çoklu ürogenital sistem anomali tanısı konan olguya cerrahi olarak operasyon yapılmasına karar verildi. Operasyon bölgesinin gerekli rutin hazırlıklarını takiben intramusküler olarak 0.2 mg/kg dozunda kullanılan Ksilazin HCl (Rompun®, Bayer) ile

sedasyon sağlandıktan sonra operasyon masasına ventro-dorsal pozisyonda yatırılan buzağının operasyon bölgesine 15-20 ml Lidokain (L-Anestin®, Alke) ile infiltrasyon anestezisi uygulandı. Anomali olarak kabul edilen kitle dip kısmından uç kısmına doğru sıvazlanarak kitle içeriği fistül ağzından böbrek küvet içerisine boşaltıldı. Boşaltılan içeriğin dışkı ve idrarla karışık olduğu görüldü. Operasyon bölgesinin aseptis-antisepsisini takiben bölge steril örtülerle sınırlandırıldı. Bölge operasyon için hazır hale getirildikten sonra aseptik koşullarda fistül ağzı barsak pensi ile kapatıldı (Şekil 2). Perineal bölgede belirlenen kitlenin dip kısmına sirküler bir şekilde ensizyon yapıldı ve deri altı bağ dokuları küt diseksiyonla ayırt edilerek bölgeye ulaşıldı. Kitlenin lümenli yapısından dolayı vagina olabileceği düşünüldü ve bu lümenli yapısında dorsalde rektum ile birleşerek kloakal bir yapı oluşturduğu tespit edildi. Operasyonda dorsalde yer alan kloakal yapıya herhangi bir müdahalede bulunulmaksızın bölgede oluşan kitle ekstirpe edildi. Daha sonra açığa çıkan lümenli yapı basit ayrı dikişler ile bölgedeki kaslara dikildi. Kitle bölgesindeki kas ve deri karşı karşıya getirilerek bölge kapatıldı ve operasyon tamamlandı (Şekil 3).

Operasyonla alınan kitle 48 saat formaldehit çözeltisinde bekletildikten sonra trimlenip alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Bloklanan dokulardan mikrotomda 5'er mikron kalınlığında lam



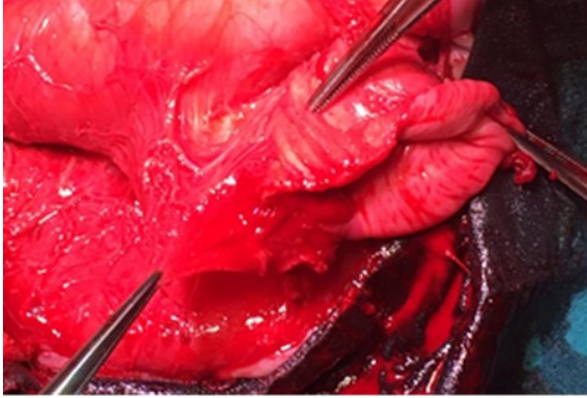
Şekil 1. Olgunun klinik muayenedeki görünümü

üzerine kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Alınan doku örneğinin histopatolojik incelenmesi sonucunda mukozanın non-keratinize çok katlı yassı epitel ile döşeli olduğu ve epitel dokunun altında bez yapısı bulunmayıp bol miktarda kan damarı tespit edildi. Dokunun mikroskopik görüntüsünün vajinal dokusu ile uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 4).

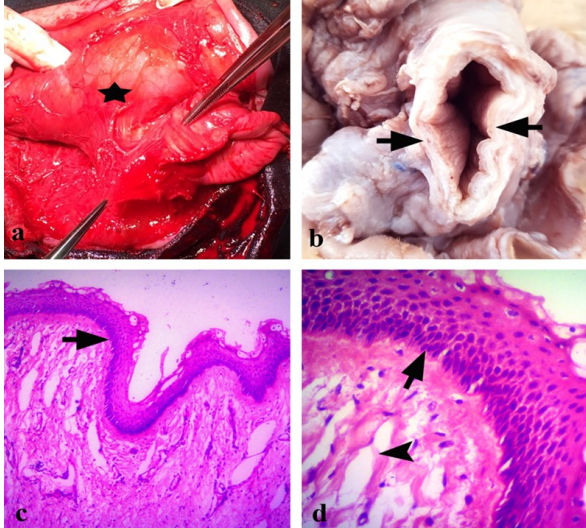
Operasyon tamamlandıktan sonra hayvan sahibine postoperatif 7 gün süreyle 2 ml / 25 kg parenteral olarak penisilin+streptomisin (Reptopen S, CEVA-DİF) ve operasyon yaralarına da lokal antiseptik uygulamalarının yapılması önerildi. Olgunun durumu hakkında postoperatif 1 ay süreyle hasta sahibinden alınan bilgiler doğrultusunda hayvanın ürinyasyon ve defekasyonunu sorunsuz bir şekilde bu kloakal yapıdan yaptığı ve buzağının genel durumunun iyi olduğu öğrenildi (Şekil 5).



Şekil 2. Dışkı ile bulaşık fistülleşmiş kloakal kitlenin preoperatif görünümü



Şekil 3. Kitle ekstirpe edildikten sonra ektopik vaginal yapı



Şekil 4. a. Kapalı olan anüs bölgesi (yıldız), b. Alınan kitlenin oluşturduğu kloaka bölgesinin formaldehit tespitinden sonraki kesit yüzü (okların sınırladığı alan), c. Non-keratinize çok katlı yassı epitel ile döşeli mukoza (ok), HE, X10, d. Çok katlı yassı epitelin bazal membranı (ok) ve epitel altındaki kan damarları (ok başı), HE, X40



Şekil 5. Olgunun postoperatif görünümü

Tartışma ve Sonuç

Kongenital anomalilerin sıklıkla kas-iskelet, sindirim ve santral sinir sistemini az sayıda ise ürogenital, göz ve deri defektlerini içerdiği belirtilmektedir (Pamuk ve ark., 2010). Çiftlik hayvanlarında artrogripozis, hidro-sefali, kist dermoid, atresia ani ve atresia rekti, atresia ani, atresia ani ve rektovaginal fistül, arkür, bülütür, göbek fitki ve kongenital damak yarığının en sık karşılaşılan anomaliler olduğu bildirilmektedir (Belge ve ark., 2000; İşler ve ark., 2016). Evcil hayvanlarda kongenital anomalilere sayıca çok rastlanmasına rağmen, multiple kongenital anomalilere oldukça az sayıda rastlanıldığı belirtilmektedir (Krishna ve ark., 2009; Demiraslan ve ark., 2014). Cerrahi kliniğimize ilk kez çoklu ürogenital sistem anomalili bir olgunun gelmesi multiple kongenital anomalilere çok az sayıda rastlanıldığını doğrulamaktadır.

Kliniğimize getirilen bu olguda kaudal agenezis, atresia ani ve vulva, kloaka oluşumu ve vaginal ektopinin bir arada görülmesinden dolayı olguya doğmasal çoklu ürogenital sistem anomalisi tanısı konuldu. Sunulan bu vakada ektopik vaginadan oluşan ampulvari bir kese içerisinde kloakal kanaldan gelen dışkı ve idrar karışımı kitle içerisinde birikerek kitlenin zamanla büyümesine, yumuşak ve fluktuan olmasına neden olduğu düşünüldü. Ayrıca buzağının perineal bölgesindeki ampulvari fluktuan kitlenin uç kısmındaki fistül aracılığı ile ürinyasyon ve defekasyonunu yaptığı ve perineal bölgenin yer yer dışkı ile bulaşık olduğu görüldü. Operasyon ile alınan ampulvari kloakal kitlenin histopatolojik muayenesinde vagina mukozası ile uyumlu non-keratinize çok katlı yassı epitel dokusu ile döşeli olduğu ve bez yapılarına rastlanmadığı ve

çok sayıda kan damarı bulunduğu tespit edilmiş olup olguya ektopik mega vagina tanısı da konmuştur. Sonuç olarak çoklu kongenital anomalilere çok az sayıda rastlanmasına karşın olguların çoğunun tedavisinin zor olmasından ve çoğunlukla ölümlü sonuçlanmasından dolayı bu tür olguların erken tanı ve erken cerrahi sağaltım ile uzun süre yaşamlarını devam ettirebileceği ve ekonomik kayıpların en aza indirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Alkan İ, Ağaoğlu ZT, Gençcelep M, Altuğ ME. Melez buzağıda megasekum, atresia koli, parsiyel kolon agenezis'i ve megakolon olgusu. *Vet Cer Derg* 1997; 3(2): 63-6.
- Abdel-Hakiem MAH, Aref NM. Prospective study on ano-rectal anomalies in neonatal farm animals. *J Vet Adv* 2012; 2(12): 595-604.
- Atiba AS, Farrag FA. Comparison between colostomy and coloanal reconstruction technique for colonic atresia in calves. *Alexandria J Vet Sci* 2016; 48: 27-33.
- Bademkiran S, İçen H, Kurt D. Congenital recto vaginal fistula with atresia ani in a heifer. *YYÜ Vet Fak Derg* 2009; 20: 61-4.
- Belge A, Gönenci R, Biricik HS, Ormancı S. Buzağılarda doğumsal anomali olguları. *YYÜ Vet Fak Derg* 2000; 11(2): 23-6.
- Demiraslan Y, Aslan K, Gürbüz İ, Özen H. Simental bir buzağıda görülen çoklu konjenital anomaliler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20(4): 629-32.
- İşler CT, Altuğ ME, Gönenci R, Aytakin İ. 2005-2009 Yılları arasında Bolu bölgesinde buzağılarda tespit edilen anomali olgularının değerlendirilmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg* 2016; 5(2): 100-4.
- Krishna H, Prasad VD, Rao M. Agnesis of vulva and terminal urethra with atresia ani et recti in a buffalo calf. *Buffalo Bulletin* 2009; 28(4): 165-7.
- Newman SJ, Bailey TL, Jones JC, DiGrassie WA, Whittier WD. Multiple congenital anomalies in a calf. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 368-71.
- Pamuk K, Korkmaz M, Sarıtaş ZK, Orhan İÖ. Simental ırkı bir buzağıda hypospadiasis ve urogenital anomali. *Kocatepe Vet J* 2010; 3(2): 39-42.
- Yayla S, Kılıç E, Özen H, Baran V, Aydın U, Karakurt E. Simental ırkı bir buzağıda çoklu ürogenital sistem anomalisi, *Harran Üniv Vet Fak Derg* 2017; 6(1): 95-8.
- Yurdakul İ. Clinical and treatment evaluation of congenital intestinal atresia cases in calves. *Van Vet J* 2019; 30(1): 31-6.

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlamalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayımlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
14. Ondalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. Kaynaklar metin içinde cümle sonunda belirtilmelidir. Yazar soy isimleri ve tarihi yazı içinde her kaynağa ait yayın yılı yazar isminden hemen sonra parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak iki isimli ise isimler belirtilmeli (örn; Kaldhone ve Nayak, 2008). Kaynakta yazar sayısı ikiden fazla ise sorumlu yazar "ve ark." şeklinde belirtilmelidir (örn, Kaldhone ve ark., 2008). Eğer kaynak cümlenin başında kullanılıyorsa yazar isimlerinden sonra parantez içinde yayın yılı belirtilmelidir.
19. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, kaynaklar bölümünde 0.5 cm içeri doğru asılı halde yazılmalıdır. Noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**
Kaynaklar;
19.1. Kaynak süreli yayın ise;
Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;
Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Krusbeek AM, Marguiles DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
19.3. Kaynak kitap ise;
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
19.4. Kaynak editörlü kitap ise;
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafkl KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;
Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
19.6. Kaynak tez ise;
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;
Örnek: TÜİK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references.
4. Manuscripts should be sent to ercvet@gmail.com. For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 words) with no paragraph and not more than five Key words in Turkish and English. Key words must be placed below summary with an alphabetical order (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be specified in the text at the end of the sentence. Author surnames and the date of publication should be specified in parentheses. If the reference has two names, the names should be given after the publication year (eg, Kaldhone and Nayak, 2008). If the reference has more than two names should be given as "et al.," (eg, Kaldhone et al., 2008). If the source is used at the beginning of the sentence, the year of publication should be specified in parentheses after the names of the authors.
19. References should be placed in alphabetical order and hanging 0.5 cm inwards in the references section. Punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.** References;
 - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;
Example: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaidd DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
 - 19.2. If the reference is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below;
Example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 19.3. If the reference is a book, citation must be done as shown below;
Example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 19.4. If the reference is whole book with an editor, citation must be as below;
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. If the reference is from meeting, citation must be done as shown below;
Example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; Izmir-Türkiye.
 - 19.6. If the reference is from a thesis, citation must be done as shown below;
Example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, Izmir-Turkey, 1993.
 - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tujk.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.