

e- ISSN : 2757-5179



Bozok Veterinary Sciences



Volume 4

Issue 1

June

2023

**ON BEHALF ON YOZGAT BOZOK UNIVERSITY FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
OWNER**

Prof. Dr. Ahmet KARADAĞ, Rektör

EDITOR-IN-CHIEF (BAŞ EDİTÖR)

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

ISSUE EDITOR - (SAYI EDİTÖRÜ)

Dr. Akın KIRBAŞ, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM

ASSISTANT EDITORS (EDİTÖR YARDIMCILARI)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- YOZGAT

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BASIC SCIENCE EDITORS (TEMEL BİLİM EDİTÖRLERİ)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Gökhan AKÇAKAVAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**PRECLINICAL SCIENCES- FOOD HYGIENE AND TECHNOLOGY EDITORS (KLİNİK ÖNCESİ
BİLİMLERİ- GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ EDİTÖRLERİ)**

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. İmran GARİP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

CLINICAL SCIENCES EDITORS (KLİNİK BİLİMLERİ EDİTÖRLERİ)

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**ZOOTECHNICS- ANIMAL NUTRITION AND NUTRITION DISEASES EDITORS (ZOOTEKNİ-
HAYVAN BESLEME VE BESLEME HASTALIKLARI EDİTÖRLERİ)**

Dr. Tunay KARAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

ENGLISH ADVISER (İNGİLİZCE DANIŞMANI)

Dr. Mehmet Ertuğ YAVUZ, Yozgat Bozok Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu-YOZGAT

STATISTICS ADVISER (İSTATİSTİK DANIŞMANI)

Araş. Gör. Güven GÜNGÖR, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi-BİNGÖL

TYPESETTER AND DESIGN (DİZGİ VE TASARIM)

Araş. Gör. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Nevzat Emre ASLAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

WEB DESIGN (WEB TASARIMI)

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Emre SAYAR, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BROADCAST BOARD (YAYIN KURULU)

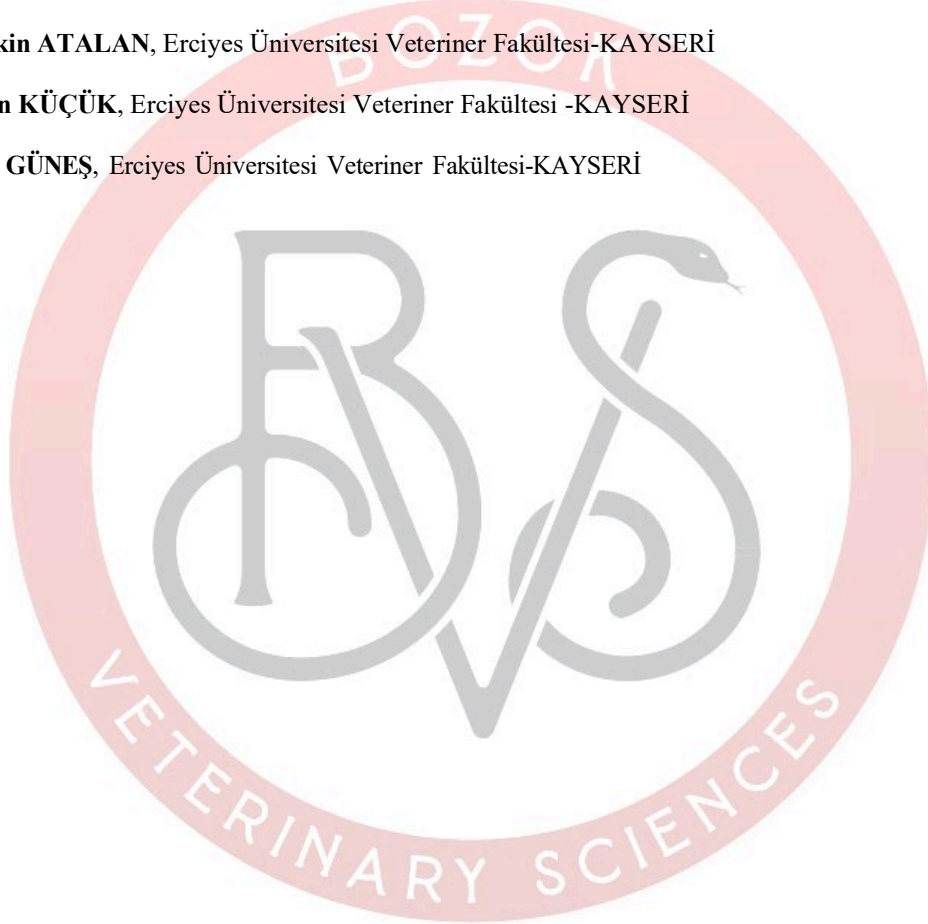
Dr. İsmail Hakkı NUR, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Çağrı Çağlar SİNMEZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Gültekin ATALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Osman KÜÇÜK, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi -KAYSERİ

Dr. Vehbi GÜNEŞ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ



NATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSAL DANIŞMA KURULU)

- Dr. Ali Cesur ONMAZ**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ
- Dr. Alper SEVİMLİ**, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi-AFYONKARAHİSAR
- Dr. Emin ŞENGÜL**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Enver YAZAR**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KONYA
- Dr. Didem PEKMEZCİ**, Ondokuzmayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SAMSUN
- Dr. Güner KÜÇÜKBAYRAM**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ
- Dr. Kürşat ALTAY**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SİVAS
- Dr. Mehmet ELMALI**, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi- HATAY
- Dr. Muammer ELMAS**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi- KONYA
- Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Mustafa ARICAN**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KONYA
- Dr. Mustafa İSSİ**, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi- ELAZIĞ
- Dr. Ramazan ERENLER**, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-TOKAT
- Dr. Selim KUL**, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi, YOZGAT
- Dr. Serkan YILDIRIM**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi-SİVAS
- Dr. Sinan VICIL**, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi-TEKİRDAĞ
- Dr. Siyami KARAHAN**, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KIRIKKALE
- Dr. Suat ERDOĞAN**, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi-EDİRNE

INTERNATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSLARARASI DANIŞMA KURULU) ,

- Dr. Askarbek TULEBAYEV**, Manas University, Faculty of Veterinary Medicine-KYRGYZSTAN
- Dr. Atiqur RAHMAN**, Jamia Millia Islamia University, Faculty of Natural Sciences-INDIA
- Dr. Csilla TOTHOVA**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Levan MAKARADZE**, Georgian State Agrarian University-GEORGIA
- Dr. Maged El-ASHKER**, Mansoura University, Faculty of Veterinary Medicine-EGYPT
- Dr. Oskar NAGY**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Rais AHMAD**, Cholistan University of Veterinary and Animal Sciences-PAKISTAN
- Dr. René van den HOVEN**, Vienna Veterinary University-AUSTRIA
- Dr. Ryane E. ENGLAR**, College of Veterinary Medicine, University of Arizona-USA
- Dr. Salah AKKAL**, University of Mentouri Constantine, Phytochemistry and Physico-chemical and Biological Analysis Laboratory- ALGERIA
- Dr. Zehra HAJRULAI-MUSLIU**, Skopje Faculty of Veterinary Medicine-MACEDONIA



Bozok Veterinary Sciences

2023; 4 (1)

BU SAYININ HAKEM KURULU

Prof. Dr. Mehmet ELMALI-Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi-HATAY

Prof. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE-Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ELAZIĞ

Prof. Dr. Gürkan UÇAR- Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KONYA

Prof. Dr. Mehmet GÜL-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM

Prof. Dr. Meryem ATASEVER-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM

Prof. Dr. Murat GÜLMEZ-Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SİİRT

Prof. Dr. Mustafa İSSİ-Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ELAZIĞ

Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN-Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ-Uşak Üniversitesi Mühendislik Fakültesi-UŞAK

Doç. Dr. Kadir BOZUKLUHAN-Kafkas Üniversitesi Kars Meslek Yüksekokulu-KARS

Doç. Dr. Recep GÜMÜŞ-Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SİVAS

Dr. Öğr. Üyesi. Kerim Emre YANAR-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM

Dr. Öğr. Üyesi. Sadık BÜYÜKYÖRÜK-Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-AYDIN

<i>Araştırma Makaleleri/ Research Articles</i>	Sayfa / Page
❖ Gülmez M, Bayhan KY, Üner S. <i>Efects of Pasteurized Sheep's Milk Use on Production and Maturation of Siirt Herby Cheese.</i>	1-11
❖ Güngör C, Gündoğ DA, Onmaz NE. <i>Mezbaha Ortamından İzole edilen Enterococcus faecalis izolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı.</i>	12-17
❖ Gündoğ DA, Güngör G, Güngör C, Onmaz NE ve Gönülalan Z. <i>Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi.</i>	18-26
❖ Tokaloğlu Ş, Gönülalan Z, Şimşek E, Onmaz NE ve Yılmaz E. <i>Bioaccumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish Species Retailed in Kayseri Region: Potential Public Health Hazard of Toxic Metals.</i>	27-36
<i>Derlemeler / Review Articles</i>	
❖ Sargın Ö, Bakırel U ve Or ME. <i>Ülkelere Göre Kuduz Karantina Tedbirleri ve Uygulanan Protokollerin Karşılaştırılması.</i>	37-40
❖ Uysal S. <i>Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesinin Kolostrum Üzerindeki Etkileri Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesi.</i>	41-44



Effects of Pasteurized Sheep's Milk Use on Production and Ripening of Siirt Herby Cheese

Murat GÜLMEZ¹, Kübranur Yıldız BAYHAN¹, Sefa ÜNER¹

¹Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Siirt/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 14.12.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 18.01.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Gülmez M, Bayhan KY, Üner S. Effects of Pasteurized Sheep's Milk Use on Production and Maturation of Siirt Herby Cheese. Bozok Vet Sci (2023) 4,(1):1-11.

Abstract: Siirt herby cheese is a variety of local cheeses, and raw sheep's and goat's milk are used in its production. The curds obtained by curdling the milk obtained in the highlands is sold in the city centre during the day or the next day. Siirt herby cheese is produced from the retail curds. Three different cheese samples from retail curd, raw sheep's and pasteurized sheep's milks were made. The samples were ripened at 4°C for 120 d. Hygienic quality of raw milk supplied from a farm and raw milk curd bought from local retailers did not have adequate hygiene. Coagulase positive staphylococci were $3.11 \pm 0.6 \log_{10}$ cfu/ml in raw milk, then it increased to $6.6 \pm 0.5 \log_{10}$ cfu/g in the curd before salting. Pasteurization of milk was decreased the total count of the coagulase positive staphylococci below the maximum permissible value (10^3 cfu/g) in the regulation on Microbiological Criteria of the Turkish Food Codex. These samples were only contained $>10^3$ cfu/g coagulase positive staphylococci at the 120th d of ripening. The pasteurization of milk allowed to obtain cheese that meets the desired hygienic criteria. In addition, sufficient acidity and pH development were observed in pasteurized dairy cheeses even though starter culture was not used. It was found that the traditional cheese production using both retail curd and raw milk may not be suitable for producing cheese in accordance with the official standards and regulations. It was concluded that in the case of the production of these cheeses, it is not appropriate to offer them for sale before the completion of the legal ripening period of 120 d. It was deemed necessary to conduct further research in order to draw up a production diagram including the parameters of the Siirt herby cheese production process.

Keywords: Siirt herby cheese, Hygiene, Pasteurised milk, Quality

Pastörize Koyun Sütü Kullanmanın Siirt Otlı Peynirinin Üretimi ve Olgunlaşması Üzerine Etkileri

Özet: Siirt otlu peyniri yöresel bir peynir çeşidi olup üretiminde çığ koyun ve keçi sütleri kullanılmaktadır. Yaylalarda elde edilen sütün mayalanması ile elde edilen teleme gün içerisinde veya ertesi gün şehir merkezlerinde satılmaktadır. Siirt otlu peyniri bu telemelerden üretilmektedir. Satın alınan teleme ile çığ ve pastörize koyun sütü kullanılarak 3 farklı peynir örneği yapıldı. Numuneler 4°C'de 120 gün süreyle olgunlaştırıldı. Bir çiftlikten temin edilen çığ sütün ve bu süttten yapılan telemenin hijyenik kalitesinin yeterli olmadığı gözlemlendi. Koagülaz pozitif stafilokoklar çığ sütte $3.11 \pm 0.6 \log_{10}$ kob/ml iken, tuzlamadan önceki aşamada telemede $6.6 \pm 0.5 \log_{10}$ kob/g'a ulaştığı gözlemlendi. Sütün pastörizasyonu Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde izin verilen maksimum değerin (10^3 kob/g) altına ancak 120. günde düştüğü gözlemlendi. Sütün pastörizasyonunun istenen hijyenik kriterlere uygun peynir elde edilmesini sağladı. Ayrıca pastörize süt peynirlerinde de starter kültür kullanılmadığı halde yeterli asitlik ve pH gelişimi gözlemlendi. Gerek satış yerlerindeki teleme ve gerekse çığ süt kullanarak geleneksel peynir üretiminin standart ve mevzuata uygun peynir üretmek için uygun olmayabilir. Bu peynirlerin üretilmesi durumunda yasal olgunlaştırma süresi olan 120 günün tamamlanmadan satışa sunulmasının uygun olmadığı sonucuna varıldı. Siirt otlu peyniri üretim prosesine ait parametreleri de içeren bir üretim şemasının çıkarılması için daha fazla araştırmanın yapılması gerekli görüldü.

Anahtar Kelimeler: Siirt otlu peyniri, Hijyen, Pastörize süt, Kalite

1.Introduction

While there are about 2000 types of cheese in the world, Türkiye, which has 193 of them, has been called "cheese heaven". The journey of each of these cheeses from production to consumption is different (1). It has been reported that the gastronomic value of this rich cheese variety should be brought to the fore (2). It has been stated that the production technology of many cheese varieties in Anatolia should be developed. So, the products should have been made at standard manners to increase export potential of these

cheeses should be used (3,4). A total of 753 thousand tons of cheese produced in Türkiye. We could not find out the knowledge about how much traditional cheese, and also how much herby cheese is produced in Türkiye (5). Nevertheless, it has been reported in a study that per capita consumption of herby cheese is 14.74 kg/year in Eastern Anatolia and South-eastern Anatolia regions, and the Türkiye average is 3.2 kg/year (6). The most produced type of herby cheese in Türkiye is Van herby cheese and it has a Geographical Indication Certificate (5). Other herby cheeses are Urfa, Bitlis, Hakkâri, Trabzon, Erzincan Keçene and Siirt herby

cheeses. Most of the previously made studies on the herby cheeses have been conducted on Van herby cheese (3,7-10).

The minimum technical and hygienic criteria for cheeses have been established with official documents and official inspections are carried out accordingly (11-13). Chemical and microbiological quality characteristics of herby cheeses have been investigated and possible health risks have been emphasized (7,14,15). However, it has been revealed by researchers that there are no product standards in local cheeses produced outside of commercial enterprises, the hygienic quality of these products is low and they do not provide sufficient assurance in terms of public health (16-18). It has been reported that the chemical qualities of herby cheeses on sale have not founded in accordance with related standards (19-23). It has also been reported in the previously made studies that hygienic quality of cheese samples examined have not been determined to be good (14,24-28).

Siirt herby cheese is generally produced from raw sheep's milk or a mixture of sheep's, cow's and goat's milk. While the main herb added to cheese is sirmo (sirik, *Allium* sp.), herbs called heliz (*Ferula orientalis*) and çiriş (*Eremurus spectabilis*) are also used depending on the taste of the household (6).

The unique qualities of cheese are shaped by many factors. Milk constituents, microbiota composition, process parameters used, ripening regimes and many other factors are prevailed effective on the quality characteristics of the cheese (29-34). Developing raw milk cheese technology is very difficult due to the risk of pathogenic bacteria (35). Many scientific researches on the process development for some of the other herby cheese varieties have been conducted previously (36-42). Few studies have been conducted on the Siirt herby cheese (6,23,24,27). Herby Cheese Standard is the reference regulation for making the cheese (43).

In this study, two different cheese samples were prepared; one from raw milk and the other pasteurised milk. Also, as for control samples, one old curd was purchased from the retail stores in the city centre and used for making herby cheese as for mimicking traditionally produced Siirt herby cheese. So, it is aimed to investigate in this study that differences between raw and pasteurized milk use, and also retailed curd use on the final chemical and microbiological composition of the Siirt herby cheese during a 120 d of ripening period.

2. Materials and Methods

Three different cheese samples were made from retail curd, raw milk and pasteurized milk. So, curd cheese, raw milk cheese and pasteurized milk cheese were made. Experimental cheese samples maintained at 4°C for ripening, and were analysed once a mo. for in a 4 mo. of ripening period.

Raw milk: A 25 l of newly milked sheep's milk was purchased from a sheep farm located in the city centre of Siirt. The milk was filtered through a cloth strainer and brought to the laboratory within 1 hour. Half of the milk was used raw, and the other half was pasteurized and used to make cheese.

Coagulant: A microbial cheese coagulant including rennet at 20.000 MCU/ml activity (Mayasan®, İstanbul Türkiye) was purchased from a local market and stored at 4 °C until use. **Herb (Sirmo, Sirik, Allium sp.):** Herbs collected from the highlands and sold by the citizens in the market were used. After the herbs were removed and washed with drinking water, they were chopped to a size of approximately 5 mm and added to the curd at a rate of 3%, w/w as recommended by many local Siirt herby chees producers (personal communications).

Salt: Rock salt from the region was used in cheese making was used in cheese making.

Press material: Plastic containers filled with water at a rate of 70 % of total weight of each portion milk used for making each part of the curd samples. Then, the water containers were used as press by putting them on the draining curd portions.

Making herby cheese by using raw milk: Raw sheep's milk was heated up to 35 °C. Calcium chloride (200 ppm, w/v) was added to the milk. Coagulant was added to the milk at 35 °C to be the same as applied to the pasteurized milk and waited for 40 min for coagulation. The clot was cut into 1x1x1 cm as made by Ocak et al. (38) and waited for 30 min for clot hardening. The clot was added in a press cloth and the press material was put on the curd for 60 min as make it standard for all the samples. So, we could not find a standard whey drainage time period in the literature applied for herby cheese making. The pressed curd was crumbled to the size of chickpeas. Then, a 3% (w/w) chopped Sirmo (*Allium* sp.) and a 3% salt was added to the crumbled curd and mixed. The same press material was put on the curd in cloth once again for 90 min to make extra drainage. The cheese samples obtained were separately crumbled to the size of chickpeas cheese and also separately filled tightly in 100 ml sample containers (5).

Making herby cheese using pasteurized milk: Raw milk in stainless steel container was heated at 72°C by using a kitchen type gas stove. The heat temperature was controlled by using a thermometer (Thermopro TP02S, ThermoPro Co., USA) Milk was stirred gently for 3 min after termination of the heating to make heat treatment more uniform. Then, the milk was cooled to 37°C by soaking the milk container in a cold water bath. All other processes were applied as in the production of raw milk cheese as mentioned above.

Making herby cheese using retail curd: A 2 kg of curd was bought from a local curd retailer in Siirt province and transferred to the laboratory under cold storage (4 °C) in 1 h.

The curd was crumbled to the size of chickpeas. Then it was mixed with 3% (w/w) herb (sirmo) and 3% (w/w) salt, then pressed for 90 min by applying a weight of equal to that of raw milk used. At the end of the pressing, the crumbled curd again in the size of chickpeas, and the plastic sample cups with a volume of 100 ml were filled in such a way that there was no air gap.

Raw milk analysis: pH measurement was made with a handheld pH meter (AZ 8685, Taiwan). Acidity determination was made by titrimetric method and the results were given as % l.a. In addition, milk analysis was performed with a milk analyser (Lactoscan LS, Nova Zagora, Bulgaria).

Determination of coagulant strength: A domestic commercial rennet used for cheese making was diluted 1/10. Raw milk was heated to 35 °C. A 1 ml of reconstituted coagulant was added to 50 ml of heated milk and the clot formation time was determined. Coagulant strength was calculated according to the formula (44).

Analysis of milk, curd and cheese: The pH was measured by using a digital pH meter (Milwaukee AZ8686, USA) (45). Titratable acidity (lactic acid, %) was determined by using 0.1 N NaOH and phenolphthalein indicator as stated to TS 591/March 2013 (46). The dry matter and ash were determined gravimetrically according to TS EN ISO 5534/AC (47). The fat content was determined by using Van Gulik method (TS ISO 3433) (48). Salt in dry matter was determined by titration according to TS EN ISO 5943; 2007 (49).

For microbiological analysis, reference methods were followed (50). Briefly, 10 g from each sample was used for making ten-fold serial dilutions in 90 ml of sterile physiological saline (PS). For count of total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM 0463) was used and the petri dishes were incubated at 30±2°C for 72 h for count of *Enterobacteriaceae*, Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid-CM0485) was used and the petri dishes were incubated at 37±2°C for 48 h. For

coliforms, Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA, Oxoid CM0107) was used and the petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. The growing pink-red colonies with a pink precipitation ring around were counted. For coagulase positive staphylococci, Baird Parker Agar plates including Baird Parker Agar Base (BPA, Oxoid CM1127) and Egg Yolk Tellurite Emulsion (Oxoid SR0054) were used. The plates were incubated at 37°C for 48 h. Black shiny coagulase positive colonies with a diameter of 1.5- 2.5 mm with a transparent zone around were counted. Then, 5 susceptible colonies selected randomly for each sample were tested for their coagulase reaction before calculation of cfu/g values. For yeasts and molds, Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGCA, Merck 1.16000) was used and the petri dishes were incubated at 25°C for 5 d. Colonies grown on the medium were counted.

The study was repeated in triplicate and each analysis was made in duplicate. The mean and standard deviation values were calculated by using the Microsoft Excel program. Means with a significant difference were compared by Duncan's multiple range tests by using SPSS v.15.00 program (Chicago, Illinois, USA) and P values <0.05 were considered statistically significant. The standard deviation values (±SD) are given in the Table 2 and Table 3.

3.Results

The mean values from the raw milk used in the study were as follows: pH 6.7, acidity (% l.a) 0.2, dry matter (% w/w) 12, protein (% w/w) 6.1, fat (% w/w) 7.2, lactose (% w/w) 4.8, salts (% w/w) 0.8 and density 1.034.

Raw milk was subjected to microbiological analysis within 1 hour after being taken from the farm. The results are given in Table 1. As seen in Table 1, it was determined that the bacterial and yeasts and molds loads were quite high in curd made with raw milk.

Table 1: Microorganism loads of raw milk and raw milk curd before salting (log₁₀ cfu/g).

	Total mesophilic aerobes	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliforms	Yeasts and molds	Coagulase positive staphylococci	Lactobacilli	Lactic streptococci
Raw milk	6.8±0.6	6.3±0.3	5.1±0.4	5.1±0.2	3.1±0.6	3.96±0.2	7.3±0.3
Raw milk curd (before salting)	9.8±0.2	8.2±0.2	8.9±0.5	9.8±0.4	6.6±0.5	9.70±0.3	10.65±0.6

The pH values of the retail curd, raw milk curd and pasteurized milk curd were found to be 6.7, 6.7 and 6.0, respectively, after the curd was filtered and herb was added. Acidity values were found to be 0.3, 0.2 and 0.15 in the same order. The findings are given in Figure 1.

Within the values before salting, the pH of the ready-made curd was found to be higher than the other two samples. Dry matter ratio of pasteurized milk curd was found to be higher than the other two samples (39.4%). There was no statistically significant difference among the samples in terms of fat ratios (Figure 1).

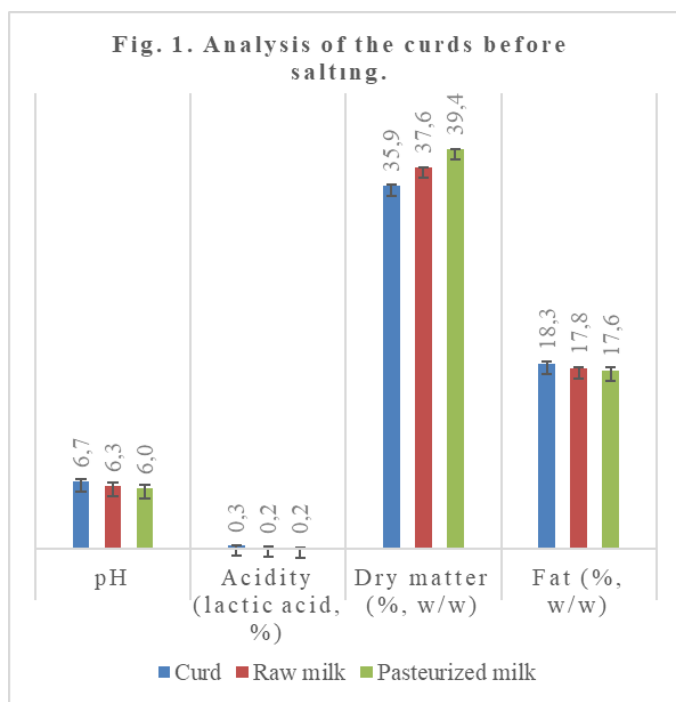


Figure 1: Values of physical and chemical analyzes of curds before salting

Three different cheeses were made by processing three different curds in the same way, and they were packaged in Ø63 x 65 mm polypropylene sample containers (L 102348, Lp Italiana) and kept in the cold. Analyses were performed on the 1st, 30th, 60th, 90th and 120th d of 4°C of cold storage. The pH and chemical analysis results are given in Figure 2.

While the initial pH values were similar in all three samples, the decrease in the following days was more in the retail curd samples ($p < 0.05$). After the 90th d, pH decreases followed an approximately horizontal course and decreased to the level of 5 at the 120th d (Figure 2a).

While the initial acidity values were similar in all three samples, the increase in the following days was more in the curd cheeses purchased from the seller. The increase in acidity continued in all three samples until the 120th d and the

highest (1.17 %) was observed in cheese made using curd bought from the seller ($p < 0.05$). In the other two samples, the acidity reached approximate values on the 90th and 120th d (Figure 2b).

When the values from high to low in terms of dry matter levels were ranked, cheese made from curd were raw milk cheese and pasteurized milk cheese. It was observed that the moisture loss in the samples was not at a significant level (Figure 2c).

While the fat levels were highest in cheese made from curd, this difference disappeared after the 90th d and the fat levels in all three samples were similar. It was observed that the cheese samples completed the ripening period with the fat level between 17.5% and 20.4% (Figure 2d).

In terms of salt levels, it was observed that cheeses made from curd were always high at 120th d, while pasteurized milk cheeses had the lowest salt values. It was observed that the salt added at the rate of 3% of the curd weight remained lower in pasteurized milk samples during ripening compared to the others (Figure 2e) ($p < 0.05$).

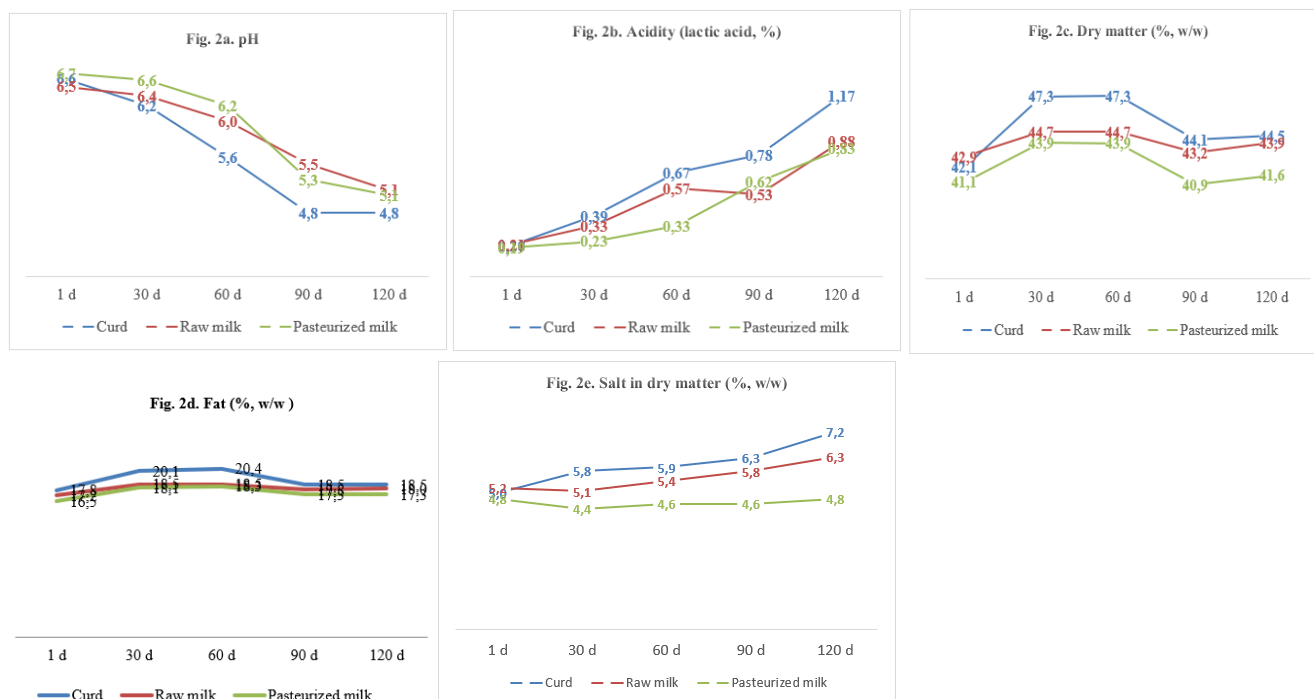


Figure 2 (a, b, c, d, e). Values of physical and chemical analyzes in 120-d cold storage in Siirt herby cheese samples produced by using retail curd, and also raw milk and pasteurized sheep's milk.

Table 2: The standard deviations (\pm SD) of values given at Figure 2.

Figure no.	Cheese / ripening d	1	30	60	90	120
Fig. 2a. pH	Retail curd cheese	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1
	Raw milk cheese	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1
	Pasteurized milk cheese	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1
Fig. 2b. Acidity, % l.a.	Retail curd cheese	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03
	Raw milk cheese	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02
	Pasteurized milk cheese	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03
Fig. 2c. Dry matter, %	Retail curd cheese	0,1	0,1	0,6	0,6	0,3
	Raw milk cheese	0,4	0,6	0,6	0,5	0,4
	Pasteurized milk cheese	0,8	0,3	0,3	0,5	0,3
Fig. 2d. Fat, %	Retail curd cheese	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
	Raw milk cheese	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
	Pasteurized milk cheese	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
Fig. 2e. Salt in dry matter, %	Retail curd cheese	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
	Raw milk cheese	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3
	Pasteurized milk cheese	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4

Total bacterial counts were found to be higher in retail curd and raw milk samples on the 1st and 30th d compared to pasteurized milk samples ($p < 0.05$). In the following period, the numbers were found to be similar in all three samples (Figure 3a).

Although the numbers of Enterobacteraceae decreased gradually in retail curd and raw milk samples, it was observed that they were in very high numbers than that of the pasteurised milk sample ($p < 0.05$). Enterobacteraceae counts were determined to be $3.68 \log_{10}$ cfu/g at 1st d of cold storage

and $> 1 \log_{10}$ cfu/g in pasteurized milk cheese samples at the 1st d of ripening (Figure 3b).

Although the numbers of coliforms decreased gradually in the curd and raw milk samples, it was observed that they were quite high. This number was determined as $3.20 \log_{10}$ cfu/g in pasteurized milk cheeses at the 1st d of ripening. Then, it was determined to decreased to the level of $> 1 \log_{10}$ cfu/g in the samples (Figure 3c).

Yeasts and molds counts were found to be considerably higher in retail curd and raw milk samples on the 1st and 30th d compared to pasteurized milk samples ($p < 0.05$). In the

following period, the numbers were found to be similar in all three samples. The level in raw milk sample was higher than the other two cheeses ($p < 0.05$). The values of the samples decreased by approaching each other at 120th d of ripening (Figure 3d).

While the lactobacilli level was found to be quite low (4.73 log₁₀ cfu/g) in pasteurized milk cheese on the first d compared to the other samples ($p < 0.05$), the values for all three samples were at an approximate level on the further analysis d. It was observed that lactobacilli level in

pasteurized milk samples was higher than that of other two cheese samples at 60th d (Figure 3f).

While the count of lactococci were determined to be quite low (5.36 log₁₀ cfu/g) in pasteurized milk samples on the first d ($p < 0.05$), as was in lactobacilli counts, on the other analysis days, the values of all three samples were at an approximate level. It was observed that the level in pasteurized milk samples was higher than that of other two cheese samples at 60th d. Although the 1st d level of lactococci was higher than that of lactobacilli, similar levels were observed in the following ripening d (Figure 3g).

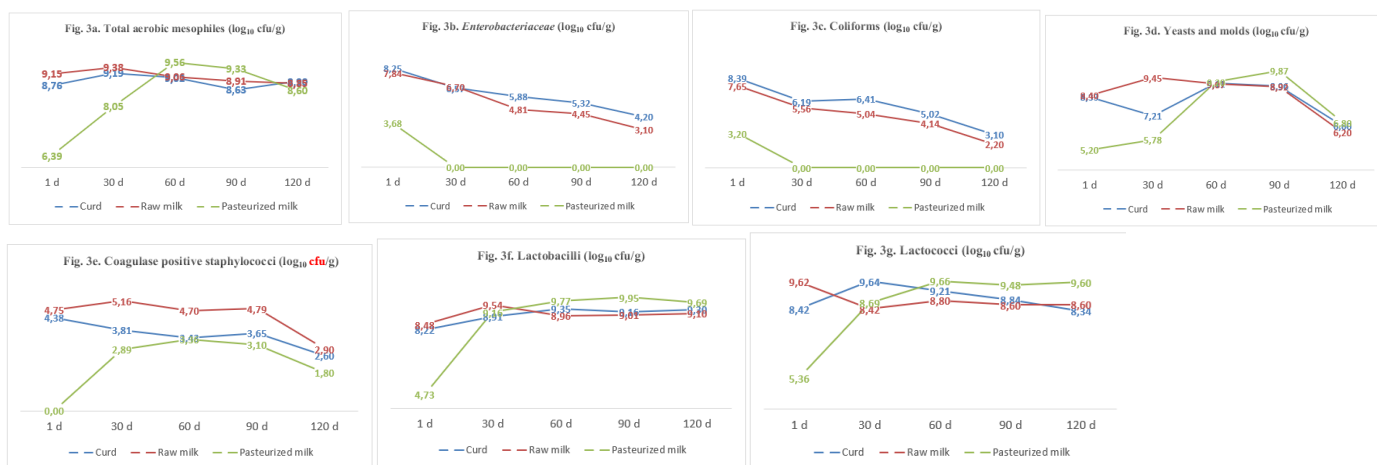


Figure 3 (a, b, c, d, e, f, g): Values of microbiological analyzes in 120-d cold storage in Siirt herby cheese samples produced by using retail curd, and also raw milk and pasteurized sheep's milk.

Table 3: The standard deviations (\pm SD) of values given at Figure 3.

Figure no.	Cheese / ripening d	1	30	60	90	120
Fig. 3a. Total aerobic mesophiles (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,34	0,31	0,22	0,16	0,34
	Raw milk cheese	0,26	0,14	0,41	0,37	0,27
	Pasteurized milk cheese	0,18	0,33	0,25	0,21	0,23
Fig. 3b. Enterobacteriaceae (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,13	0,23	0,41	0,33	0,21
	Raw milk cheese	0,32	0,34	0,21	0,24	0,11
	Pasteurized milk cheese	0,11	0,24	0,18	0,21	0,00
Fig. 3c. Coliforms (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,27	0,31	0,27	0,16	0,21
	Raw milk cheese	0,34	0,12	0,24	0,12	0,19
	Pasteurized milk cheese	0,22	0,30	0,00	0,00	0,00
Fig. 3d. Yeasts and molds (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,21	0,23	0,41	0,29	0,34
	Raw milk cheese	0,32	0,40	0,44	0,39	0,42
	Pasteurized milk cheese	0,16	0,32	0,30	0,33	0,18
Fig. 3e. Coagulase + staphylococci (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,16	0,21	0,23	0,11	0,13
	Raw milk cheese	0,23	0,20	0,20	0,23	0,21
	Pasteurized milk cheese	0,30	0,34	0,17	0,20	0,20
Fig. 3f. Lactobacilli (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,34	0,41	0,38	0,70	0,63
	Raw milk cheese	0,30	0,50	0,36	0,47	0,26
	Pasteurized milk cheese	0,22	0,21	0,44	0,44	0,33
Fig. 3g. Lactococci (log ₁₀ cfu/g)	Retail curd cheese	0,43	0,54	0,51	0,29	0,33
	Raw milk cheese	0,40	0,51	0,45	0,37	0,51
	Pasteurized milk cheese	5,36	0,27	0,39	0,40	0,37

4. Discussion and Conclusion

It is well known that factors such as breed, age, race, season, diet of dairy animal are effective on the milk composition. Also, milk composition and all the other applications of cheese making are effective on the cheese characteristics (19). Since the change made in each of these factors causes significant changes in the cheese, so many cheese varieties have been able to be produced. For production of a cheese variety, the effects of many factors separately and/or in combinations on its determinative characteristics have to be taken into consideration during the process. The cheeses traded must be produced in accordance with the standards established by official regulations (5,11-13,43,46).

In the Herby Cheese Standard (43), it is stated that rate of milk fat in dry matter has to be at least 45%, humidity at most 60% and salt at most 7.5%. The minimum, (average) and maximum values of this cheese in the geographical indication document of Van herby cheese are listed as follows: Dry matter (%) 43.81 (46.78) 47.78, protein (%) 20.60 (22.17) 25.52, fat (%) 16.75 (17 .29) 19.21, ash (%) 5.07 (6.85) 7.45, salt (%) 4.60 (5.73) 6.9. When it is classified in terms of % Moisture (in fat free dry matter) in cheese standards, herby cheese has been reported to be from the group of semi-hard cheeses that fall between 57-64% (5). A fully demonstrated process follow-up instruction for making herby cheese including critic control points such as curd break point, press end point, packaging point, and also critic limits such as acidity, pH, dry matter, salt levels at the critic control points has not been documented yet. Van herby cheese is currently being produced and sold by many large companies in Türkiye. However, we could have no information about their production processes. It can be proposed that each company is free for development its own process parameters and the production is made in accordance with the regulations. Although there are many scientific studies conducted on this subject, a complete process definition has not yet been revealed as a result of these studies. Also, this study is a narrowly comprehensive study focused on the pasteurization of sheep's milk only. It may be concluded for this situation that a full scientific study is needed for documentation of a complete herby cheese producing process.

In a study that we compared together with the findings of our own study by previously made studies conducted on herby cheeses, and it was revealed that most of the herby cheeses on sale do not comply with the regulations (51). The production and sale of these cheeses, which are traditionally produced by local people, should be made in accordance with the regulations. In our opinion, the most effective public health measure that can be applied in the current conditions is to prevent the production of raw milk cheese by producers who do not comply with the Special Hygiene Rules Regulation for Animal Food (11) and Microbiological Criteria Regulation (12). It would be a good decision to impose the obligation to

pasteurize milk to such enterprises. Because in order to make raw milk cheese, it is necessary to use the milk of animals free from disease and ripening period have to be minimum 4 mo. as mentioned in Cheese Regulation (13). Akyüz and Kurt (52) have reported in 1984 that primitive conditions should be abandoned and production should be carried out in modern factories.

Since we could not come across to a complete process definition, we only followed regulatory parameters for making Siirt herby cheese (5,11-13,43,46). In order for us to take one of the previous studies as a reference, our other parameters should have been similar to those in the reference study. For this reason, we decided to use our own process parameters and our own method with the condition of complying with the regulations. So, pasteurisation of the bulk milk was made at 72°C for 3 min. Coagulation was made at 35 °C for 40 min. The clot was cut into 1x1x1 cm as made by Ocak et al. (38) and waited for 30 min for clot hardening. The clot was added in a press cloth and the press material was put on the curd for 60 min as make it standard for all the samples. The press weight was determined as the rate of 70 % of total weight of each portion milk used for making each part of the curd samples. The press was applied 60 min before salting and 90 min after salting to make a good drainage from the curd samples. We applied dry salting to the crumbled curd and salt was used at a 3% of curd weighed after the first pressing. At the end of many preliminary studies, we realized to follow the parameters of pH between 5.5-6.0 and lactic acid between 0.3-0.5 in the curd before salting, minimum pH of 4.5 and maximum 1% lactic acid, humidity maximum 50%, the protein minimum 20% and the fat minimum 20% in cheese after 120 d of ripening. The parameters followed in this study for making Siirt herby cheese has to be confirmed in comparison with other process parameters that effect the resultant cheese regulatory parameters.

According to the Regulation on supply of raw milk (53), which is required for raw milk trade, animals must be free from disease. Also, milk has to be cooled to 4°C and below immediately after milking and the temperature during transport should not exceed 4°C. The supply of raw milk to the final consumer is carried out within 24 hours after milking. If raw milk obtained from other species other than cow's milk is to be used in the production of raw milk cheese without any heat treatment, the TAMB grown at 30°C in per ml of the milk have to be $\leq 500,000$ (11). Most of the herby cheeses are made with the sheep's' milked in the highlands in the form of herby cheese curd in Siirt. Raw milk curd is produced by clotting the milk at milking temperature after draining from strainer cloth. The drained curd is brought to the provincial and district centres in sacks and then sold in the same d or other d. Individuals or small outlet owners buy these retail curds and process it into herby cheese for household use or sale. It was determined in this study that the

number of TAMB in the raw milk was as high as 6.77 log₁₀ cfu/ml (Table 1). It can be difficult to obtain milk with the desired bacterial load in existing sheep barns and by hand milking. For these reasons, it is inevitable that the cheese produced from raw milk or retail curd cheese. It has been pointed out in previously made studies that Siirt herby cheese on sale have not met the regulatory criteria (6,23,24,27,51). We have also determined in this study that both raw milk and retail curd may not ensure the minimum hygiene requirements (Figure 3).

In this study, it was observed that acidity development continued with pH decrease in the samples during ripening (Figure 2a, 2b). This change occurred in the pasteurized milk samples as well as retail curd and raw milk samples. Although the microorganisms causing these changes were not extensively investigated in this study, it was determined that the numbers of lactic acid bacteria and lactic streptococci increased in all three types of cheese during the ripening period (Figure 3f, 3g). However, we did not use any microbial culture for ripening, natural microbiota presented in the samples or secondary contaminated microorganisms could have pH and acidity development in all the samples. Ripening microbiota in the pasteurized milk samples may have come from the herbs used, and/or from raw milk flora that survived pasteurization and/or microorganisms transmitted by secondary contamination during cheese making. In a previous study, the pH of herby cheese has been stated to be decreased from 4.89 to 4.52 and the acidity (% lactic acid) increased from 0.62 to 1.05 during the 90-d ripening period (54). Emirmustafaoğlu and Coçkun have demonstrated significant differences from goat's cheese than that of cow's and ewes' cheese (55).

Tuncturk et al. (21) have prepared cheese samples by both raw milk and pasteurized milk. According to the changes recorded in the ripening period, it has been reported that difference in bulk milk do not adversely affect the products chemical composition, and pasteurized milk cheeses have been found to have harder structure. We also could not have determined a difference between raw and pasteurized milk samples. More research could be needed for making a net decision on the matter.

Although the production methods of herby tulum cheese is different, its composition and physical appearance are resembling to Tulum (leather bottle) cheese. The humidity rate has been regulated to be maximum 45% for full fat Tulum cheese and maximum 50% for low-fat and fat-free Tulum cheese (13). The minimum, (average) and maximum dry matter (%) values in the Geographical Indication Certificate of Van herby cheese are as follows: 43.81 (46.78) 47.78. In our previously made study and also in this study we determined dry matter mean values close to 45% (Figure 2c) (51). We experienced in this study that the cheese could be more wet and sticky when the dry matter was as high as 60%.

However, in the Herby Cheese Standard, humidity rate has been regulated as maximum 60% (43). This value is the same as the value of white cheese (13). It has been reported that Van herby cheese is produced similarly to white cheese in commercial production enterprises, the moisture rate in the cheese is high, and therefore it would be more appropriate to call these cheeses as herby white cheese instead of Van herb cheese (20). Thus, dry matter or humidity regulations for herby cheese could be reconsidered.

A maximum salt content in the dry matter of Tulum cheese is regulated as 5% (13). It is understood that the salt in Tulum cheese should be maximum 2.25%. Nevertheless, salt value has been regulated as maximum 7.5% in the Herby Cheese Standard (43), and also as 6.9% in the geographical indication document for Van herby cheese. In this study, dry salting was done by adding 3% of salt to the pressed curd as similar manner as the traditional method. So, the salt ratios the cheese samples have been determined to be higher than 2.25%. In most of the previously made studies, the salt rate from the retailed cheeses examined by us and other researchers have been generally higher than 5% (51). Because in our face-to-face interviews, people who produce herby cheese reported that they need more salt to prevent the cheese from spoilage. The salt content of the cheese at retail have to be decreased for public health. The salt content has already been reduced in other cheese varieties (13, 46).

In the Regulation on Turkish Food Codex Microbiological Criteria (12), it has been reported that the number of Enterobacteriaceae in pasteurized drink milk can be maximum 10 cfu/ml as a hygiene criterion. There are no coliform and coagulase positive staphylococcal values for pasteurized milk in the Regulation. In this case, it could be understood that these two microorganisms should not be present in pasteurized milk. As can be seen in Table 1, the numbers detected in all analysed microorganism were quite high. It has been revealed in the studies that the products on sale that are analysed have a high microorganism load and do not comply with the standards (51). The TAMB count in raw milk used in this study have been determined to be 6.77 log₁₀ cfu/ml, and was higher than 500.000 / ml level which is stated in the Regulation (11) and Regulation on Turkish Food Codex Microbiological Criteria (12). Also, coagulase positive staphylococci are allowed to be a maximum 103 cfu/g in in Tulum cheese (12).

The total mesophilic aerobic bacteria, coliforms and yeasts and molds counts determined in this study have not been stated in the Regulation (12). These analyses were made for a possibility of use in next process development studies. When Table 1 and Figure 3 are comparatively examined, it could be understood that the hygienic quality of the samples has been improved by using pasteurized milk, since counts of Enterobacteriaceae, coliforms and coagulase positive staphylococci were lower than that of raw milk and retail curd

cheese samples. The reason for the presence of microorganism load in cheese samples above the standard values reported above may be that the samples were made with traditional methods. Drain cloth, strainer, utensils and other materials used in the study were used without sterilization and only by washing with tap water to mimic the traditional way. Under controlled production conditions, it is possible to reduce these values below the levels allowed in the standards. For this, the milk must be pasteurized and the materials used must be pasteurized or sterilized. The hygiene of the coagulant used should also be checked. Starter culture and/or ripening culture can be used to provide early acidity development and pH reduction in cheese. However, new studies are needed to obtain such microbial cultures.

Tunçtürk et al. (21) have made Van herby cheese by using raw and milk and brine salted the samples. A decrease of 1 log₁₀ cfu/g in the TAMB on the 30th d of the ripening period has been documented. Also, coliforms (log₁₀ cfu/g) has been decreased from 7 to 5.41 on the 30th d, 3.85 on the 60th d, 2.45 on the 90th d and to uncountable level on the 120th d. In this study, the initial bacterial levels were found to be high, similar to the researchers' findings. In parallel to the findings of the researchers, we were also determined high counts of the microorganisms from the 1st d of the ripening. However, unlike the findings of other researchers, it was observed in this study that the numbers of coliforms and coagulase positive staphylococci in the samples decreased to acceptable levels (102-103 cfu/g) after 60th d of the ripening (Fig. 3d, 3f).

Yeasts and molds counts were found to be high in our study and other previously made studies (Fig 3e) (51). When the situation that the number of yeasts and molds gradually increases during the ripening period is accepted as certain, it may be necessary to bring a new interpretation with a new perspective on the acceptance of this parameter as a criterion in hygiene monitoring. More research on this subject should be done to reveal the positive and negative aspects of yeasts and molds growth.

As a result, the positive effect of pasteurization in terms of hygiene assurance was determined. Hygiene may be difficult for producing herby cheese by using retail curd or raw ewe's milk. Regulative standards about moisture and salt content for the herby cheese could be valuable if are reevaluated. Since not a fully informative regulatory or another published process schematic has not been documented yet, initial studies such as this study could be more valuable for future studies. This study alone is not enough to propose process parameters, critical control points and critical limits. Nevertheless, accessing the following parameters can be considered as the basic process parameters for further studies. In the process development studies for Siirt herby cheese, following parameters may be valuable to evaluate complex studies including multi-variable parameters. By this way,

homogeneity of the future studies may be increased. Then, making new inferences from the results of the studies may be easier. We propose pH between 5.5-6.0 and lactic acid value between 0.3-0.5 in curd before salting, minimum pH of 4.5 and maximum 1% lactic acid in cheese after 120 days of ripening. For full-fat Tulum cheese, it would be appropriate to develop an appropriate process so that the humidity is at most 50%, the protein at least 20% and the fat at least 20%. It may probably be the first time that these values, which are not included in the regulations, are proposed by us.

Acknowledgment

We thank to Siirt University Agriculture and Livestock Specialization Coordination Center for their efforts and the monetary funds. This research was a part of the project supported by Siirt University within the scope of SIU specialization projects (Project No. 2021-SIUHT-VET-06).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dinçkal F. Anadolu Peynirleri. 2015; E-Kitap, 59 s. İnternet erişimi. Erişim tarihi: 10/10/2022.
2. Karaca OB. Geleneksel peynirlerimizin gastronomi turizmindeki önemi. Journal of Tourism and Gastronomy Studies 2016; 4(2): 17-39 (article in Turkish with an English abstract).
3. Durlu Özkaya F, Gün İ. Anadolu'da Peynir Kültürü. ICANAS 38 Uluslararası Asya ve Kuzey Afrika Çalışmaları Kongresi, Eylül, 10-15, 2007; Ankara-Türkiye.
4. Demirhan Ö, Cihangir E. Van otlı peynirinin geleneksel üretim hikayesi. J Tourism and Gastronomy Studies 2021; 9(3): 2286-2319. doi: 1021325/jotags2021893.
5. Anon. Van Otlı Peyniri Menşesi Tescilli. Van Sanayi ve Ticaret Odası 2018; Van-Türkiye.
6. Doğan N. Siirt ilinde üretilen Siirt otlı peynirinin bazı özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Harran Üniv. Fen Bil. Ens, Şanlıurfa 2012, 108s (thesis in Turkish with an English abstract).
7. İzmen ER, Kaptan N. Doğu illerinde yapılan mahalli peynirlerden otlı peynirler üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Ziraat Fakültesi Yayınları 1996; 45 s, Ankara-Türkiye.
8. Hayaloglu AA, Fox PF. Cheeses of Turkey: 3 varieties containing herbs or spices. Dairy Science and Technology 2008; 88: 245-325.
9. Örmeci Kart MÇ, Demircan V. Dünya'da ve Türkiye'de süt ve süt ürünleri üretimi tüketimi ve ticaretindeki gelişmeler. Akademik Gıda 2014; 12(1): 78-96 (article in Turkish with an English abstract).
10. Ünsal A. Süt Uyuyunca - Türkiye Peynirleri. Yapı Kredi Yayınları 2003; İstanbul-Türkiye.
11. Türk Gıda Kodeksi- Hayvansal Gıdaların Resmi Kontrollerine İlişkin Özel Kuralları Belirleyen Yönetmelik. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2011; Ankara-Türkiye.
12. Türk Gıda Kodeksi- Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (3 Mükerrer). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2011; Ankara-Türkiye.
13. Türk Gıda Kodeksi- Peynir Tebliği. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2015; Ankara-Türkiye.

14. Akkoç Z. Otlu peynirlerde histamin düzeyi ve mikrobiyolojik kalitenin araştırılması. Yüksek lisans tezi. Fırat Üniv Sağlık Bil Ens Elazığ 2016; (thesis in Turkish with an English abstract).
15. Ocak E, Köse Ş. Van otlu peynirinin üretimi ve mineral madde içeriği. *Gıda* 2016; 40(6): 343-348 (article in Turkish with an English abstract).
16. Gülmez M, Güven A, Çetinkaya A. Kars'ta tüketime sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2011; 7(1): 55-62 (article in Turkish with an English abstract).
17. Gülmez M, Güven A. Kars ilinde satışa sunulan çeçil (civil) peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2001; 7(1): 63-70 (article in Turkish with an English abstract).
18. Gülmez M, Oral N, Güven A, Baz E, Sezer Ç, Duman B. Kars'ta tüketime sunulan kaşar peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10(2): 183-188 (article in Turkish with an English abstract).
19. Oğur S, Duruk M. Bitlis otlu peynirinin besin kompozisyonunun ve kimyasal bileşiminin standartlara göre değerlendirilmesi. *Food and Health* 2021; 7(2): 91-102. doi: 103153/FH21011 (article in Turkish with an English abstract).
20. Coşkun H, Öztürk B. Otlu peynirler adı altında üretilen peynirler üzerinde bir araştırma. *Gıda Mühendisliği Dergisi* 2021; 10: 19-23 (article in Turkish with an English abstract).
21. Tunçtürk Y, Ocak E, Köse Ş. Farklı süt türlerinden üretilen Van otlu peynirlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile proteoliz profillerinde olgunlaşma sürecinde meydana gelen değişimler. *Gıda* 2014; 39(3): 163-170 (article in Turkish with an English abstract).
22. Kara S, Köse Ş. Geleneksel yöntemle üretilen otlu peynirlerin bazı kalite özelliklerinin ve biyoaktivitesinin belirlenmesi. *Gıda* 2020; 45(5): 942-953 (article in Turkish with an English abstract).
23. Koyuncu M, Tunçtürk Y. Evaluation of the quality characteristics of Siirt herby cheese: a traditional Turkish variety. *Journal of the Institute of Science and Technology* 2020; 10(2): 1023-1029.
24. Şenel E, Yıldız F, Yetişemiyen A, Durlu-Özkaya F, Öztekin FŞ, Şanlı E. Evaluation of the biogenic amine content and some chemical and microbiological properties of Urfa and Van herby cheeses. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012; 18 (4): 537-544. doi: 109775/kvfd20115475.
25. Özer E, Bostan K, Sağun E. Van otlu peynirlerinde mikrobiyolojik kalite ve küf florası. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1992; 3(1-2): 53-59 (article in Turkish with an English abstract).
26. Hallaç B, Güçer Y, Kılınççeker O, Poyrazoğlu ES. Geleneksel Siirt peynirlerinin mikrobiyolojik kimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenerek halk sağlığı açısından değerlendirilmesi. *ADYÜTAYAM* 2021; 9(1): 61-72 (article in Turkish with an English abstract).
27. Ektiren D, Güneş S, Vardın H. Siirt ve çevresinde üretilen otlu peynirlerin fizikokimyasal mikrobiyolojik ve duyuşsal özelliklerinin belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi* 2020; 5(3): 260-267 (article in Turkish with an English abstract).
28. İşleyici Ö, Akyüz N. Van ilinde satışa sunulan otlu peynirlerde mikrofloranın ve laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2009; 20(2): 59-64 (article in Turkish with an English abstract).
46. Türk Standartları. Beyaz Peynir (TS 591). Türk Standartları Enstitüsü 2013; Ankara-Türkiye.
29. Güler Z, Türkmen D, Dursun A, Masatcıoğlu MT, Köksal Kavrak M. Farklı ticari rennetlerle peynir pıhtıları üretimi sırasında fiziko-kimyasal, tekstürel ve mikroyapısal nitelikler. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 2021; 26(2): 211-227. doi: 10.37908/mkutbd.830584 (article in Turkish with an English abstract).
30. Tarakci, Z. The effects of packaging materials and filling methods on some characteristics of herby cheese (Otlu peynir). *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)*. September, 16-20, 2007; Copenhagen-Denmark.
31. Ocak E, Javidipour I, Tunçtürk Y. Volatile compounds of Van herby cheeses produced with raw and pasteurized milks from different species. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52(7): 4315-4323. doi: 10.1007/s13197-014-1458-8.
32. Köse Ş, Ocak E. Mineral composition of herby cheese produced from raw and pasteurized milk. *Applied Ecology and Environmental Research* 2019; 17(3): 7189-7201. doi: 10.15666/aeer/1703_71897201.
33. Aydın E, Tarakçı Z. Effects of different types of herbs on colour and texture properties of Kashar cheese. *Food and Health* 2021; 7(2), 120-127. doi: 10.3153/FH21013.
34. Kavaz A, Bakırcı İ, Kaban G. Some Physico-chemical properties and organic acid profiles of herby cheeses. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 19 (1): 89-95. doi: 10.9775/kvfd.2012.7242.
35. Babaoglu UT, Oğutucu H, Demir G, Sanli D, Babaoglu AB, Oymak S. Prevalence of Brucella in raw milk: An example from Turkey. *Niger Journal of Clinical Practices* 2018; 21: 907-11.
36. Özbek H, Aksoy H, Uğraş S, Öztürk G, Türkdoğan K, Tuncer İ. Van otlu peynirinin sığan sindirim sistemi ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Genel Tıp Dergisi* 2015; 15(1): 5-10 (article in Turkish with an English abstract).
37. Durmaz H, Sağun E. Otlu peynirlerin üretim ve olgunlaşma sürelerinin *Listeria monocytogenes*'in üremesi üzerine etkileri. *Veteriner Bilimler Dergisi* 2004; 20(2): 87-93.
38. İşleyici Ö, Sancak YC. Van otlu peyniri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 8(1-2): 48-58 (article in Turkish with an English abstract).
39. Ocak E, Tunçtürk Y, Javidipour I, Köse Ş. Farklı süt türlerinden üretilen van otlu peynirlerinde olgunlaşma boyunca meydana gelen değişiklikler: Mikrobiyolojik değişiklikler, lipoliz ve serbest yağ asitleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 2015; 25(2): 164-173 (article in Turkish with an English abstract).
40. Andıç S, Tunçtürk Y, Javidipour I, Gençcelep H. Farklı otların otlu peynirin biyojen amin içeriği ve bazı özellikleri üzerine etkisi. *Gıda* 2015; 40(1): 1-8 (article in Turkish with an English abstract).
41. Kıcı K, Okut H, İşleyici Ö, Sancak YC, Tuncay RM. The determination of some microbiological and chemical features in herby cheese. *Foods* 2019; 11;8(1): 23-34. doi: 10.3390/foods8010023.
42. Andic S, Gençcelep H, Kose S. Determination of biogenic amines in herby cheese. *International Journal of Food Properties* 2010; 13(6): 1300-1314.
43. Türk Standartları. Otlu Peynir (TS 13205). Türk Standartları Enstitüsü 2016; Ankara-Türkiye.
44. Turkish Standards. Rennet (TS 3844), Turkish Standards Institute 1996; Ankara-Türkiye.
45. Sadler GD, Murphy PA. pH and Titratable Acidity. In: *Food Analysis*. New York: Springer, p207-225, 2003.
47. Türk Standartları. Peynir ve İşlenmiş Peynir- Toplam Kuru Madde İçeriği Tayini (TS EN ISO 5534/AC). Türk Standartları Enstitüsü 2014; Ankara-Türkiye.

48. Türk Standartları. Peynir - Yağ Muhtevası Tayini - Van Gulik Yöntemi (TS ISO 3433). Türk Standartları Enstitüsü 2015; Ankara-Türkiye.
49. Türk Standartları. Peynir ve Eritme Peynir Ürünleri- Klorür Miktarı Tayini- Potansiyometrik Titrasyon Metodu (TS EN ISO 5943). Türk Standartları Enstitüsü 2007; Ankara-Türkiye.
50. Pouch DF, Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington DC: American Health Association, 2001.
51. Gülmez M, Yıldız Bayhan K, Üner S. Technical, physical, chemical and microbiological analyses of Siirt herby cheese. Bozok Veterinary Sciences 2022; 3, (2): 33-39.
52. Kurt A, Akyüz N. Van otlu peynirinin yapılışı ve mikrobiyolojik fiziksel ve kimyasal nitelikleri. Gıda 1964; 9(3): 141-146 (article in Turkish with an English abstract).
53. Türk Gıda Kodeksi. Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ (Tebliğ No: 2017/20). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2017; Ankara-Türkiye.
54. Tekinşen KK. Hakkâri ve çevresinde üretilen otlu peynirlerin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. Veteriner Bilimler Dergisi 2004; 20(2): 79-85.
55. Emirmustafaoğlu A, Coşkun H. Keçi sütü inek sütü ve bu sütlerin karışımından yapılan otlu peynirlerde olgunlaşma boyunca meydana gelen değişimler. Gıda 2012; 37(4): 211-218.



Mezbaha Ortamından İzole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı

Candan GÜNGÖR¹, Dursun Alp GÜNDOĞ¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 14.04.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 22.05.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Güngör C, Gündoğ DA, Onmaz NE. Mezbaha Ortamından İzole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):12-17

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde mevcut olan birinci sınıf bir sığır mezbahasında kesim hattı boyunca alınan örneklerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecalis* varlığı ve izolatlar da biyofilm ile ilişkili virülans faktör genlerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada, kesimhaneden alınan toplam 300 adet örnekte (180 karkas, 48 bıçak, 42 çengel, 6 testere, 6 deri bandı ve 18 mezbaha atık suyu) etkenin varlığı konvansiyonel yöntem ve PZR ile analiz edildi. İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemede Kongo kırmızısı agar ve mikroplaka testi ve biyofilm ile ilişkili virülans genlerinin (*gelE* ve *esp*) tespitinde PZR kullanıldı. Analiz edilen 300 örneğin 40'ından (%13.3) *E. faecalis* izole edildi ve bu izolatların 35 (%87.5) biyofilm oluşturma yeteneğinde idi. Biyofilm pozitif olan izolatların 33'ünde (%82.5) *gelE* geni belirlendi ve bu izolatların biri (%2.5) *esp* genini de içeriyordu. Sonuç olarak, çalışmanın yapıldığı kesimhane ortamından biyofilm oluşturan *E. faecalis*'lerin izole edilmesi kesimhanede fekal kontaminasyonun yaygın olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla kesimhanede hijyenik koşulların iyileştirilmediği takdirde karkasların *E. faecalis* ile çapraz kontaminasyon riski gıda tedarik zincirinde önemli bir endişe kaynağı olabilir.

Anahtar Kelimeler: *E. faecalis*, Karkas, Mezbaha, Mezbaha atık suyu, Sığır

Biofilm Forming Capacity and Presence of Biofilm-Associated Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* isolates from Slaughterhouse Environments

Abstract: This study aims to investigate the presence of biofilm-producing *Enterococcus* and their biofilm-related virulence factor genes in the slaughter line of a class A cattle slaughterhouse in Kayseri. A total of 300 samples (180 carcasses, 48 knives, 6 saws, 42 hooks, 6 skin bands and surfaces, and 18 samples of slaughterhouse wastewater) were analyzed using conventional methods and PCR. The biofilm-forming abilities of the isolates were determined using Congo red agar and microplate testing, and PCR was used to detect biofilm-associated virulence genes (*gelE* and *esp*). *E. faecalis* was isolated from 40 (13.3%) of analyzed samples, of which 35 (87.5%) produced biofilms. The *gelE* gene was detected in 33 (82.5%) biofilm-positive isolates, from which one (2.5%) contained also *esp* gene. In conclusion, this study determined the presence of biofilm-positive *E. faecalis* among the samples taken from a slaughterhouse in Kayseri province, and the relationship between virulence genes and biofilm formation. In conclusion, the isolation of biofilm-forming *E. faecalis* from the slaughterhouse environment indicates that fecal contamination is common in slaughterhouses. Therefore, if hygienic conditions in the slaughterhouse are not improved, the risk of cross-contamination of carcasses with *E. faecalis* can be a major concern in the food supply chain.

Keywords: *E. faecalis*, Carcass, Cattle, Slaughterhouse, Slaughterhouse wastewater

1.Giriş

İnsan ve hayvanların doğal biotasının yanı sıra bitki, toprak, deniz ve atık su gibi birçok yerde bulunan *Enterococcus* spp., olumsuz çevre koşullarına karşı oldukça dayanıklı Gram pozitif bakterilerdir. *Enterococcus* spp., gıdalarda hijyen indikatörü olarak kullanılmalara ilaveten bazı türleri de bakteriyosin üretim yeteneklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (1,2). Normal biotanın fırsatçı patojenleri olan *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ve *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) klinik örneklerden ve gıdalardan yaygın olarak izole edilen türlerdir (2-4). *Enterococcus* spp.'nin neden olduğu

nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık % 90'ından *E. faecalis*, %10'undan *E. faecium*'un sorumlu olduğu rapor edilmiştir (1,2,5). *Enterococcus* spp.'nin patojenitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri biyofilm oluşturma kabiliyetidir. Biyofilm tabakası içerisinde bulunan mikroorganizmaları konak immünolojik yanıtlarından, fagositozdan ve antibiyotiklerden koruyarak hastalıkları komplike hale getirir (6) ve serbest bakterilerden 10-1000 kat daha fazla antimikrobiyal direnç geliştirebilirler (7). Nozokomiyal enfeksiyonların %65'inden fazlası ve

bakteriyel enfeksiyonların % 80'inin biyofilm oluşturabilen bakterilerden kaynaklandığı bildirilmiştir (8).

Enterococcus spp.'nin patojenitesin de agregasyon maddeleri (*agg*, *asa1*), sitolizin (*sil*), jelatinaz (*gelE*), hücre dışı yüzey proteini (*esp*), endokardit antijenleri (*efaAfs* ve *efaAfm*), kollajene yapışma (*ace*, *acm*) gibi virülans faktörler önemli rol oynamaktadır (1,3,4).

Bu virülans faktörlerden jelatinaz ve hücre dışı yüzey proteinlerinin, etkenin biyotik ve abiyotik yüzeylere kolonize olmasını sağlayarak biyofilm oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (7,9,10).

Fekal *Enterococcus* türleri mezbahalarda hayvansal gıda ürünlerini kontamine edebilir. Bu bakteriler özellikle hayvanların gastrointestinal sisteminde yaşadıkları için kesim sonrası deri yüzme, iç organ çıkarma gibi işlemler sırasında karkası kontamine edebilir (11,12). Kayseri mezbahalarının çoğunda deri yüzme ve iç organ çıkarma işlemlerinin manuel olarak gerçekleştirilmesi fekal kontaminasyon riskini artırmaktadır. Bu çalışmada, Kayseri ilinde bulunan birinci sınıf kesimhanede sığır kesim hattından alınan örneklerde mezbahanın hijyenik kalitesini yansıtan bakterilerden *E. faecalis* varlığı, elde edilen

izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri ve biyofilm oluşumu ile ilişkili virülans faktör genleri araştırıldı.

2. Materyal ve Metot

Kayseri ilinde birinci sınıf kombina olarak faaliyette bulunan büyükbaş hayvan kesimhanesine birer aylık periyotlarla 10 Mart- 10 Ağustos 2022 tarihleri arasında yapılan ziyaretlerde toplam 300 örnek toplandı (Tablo 1). Swap örnekleri soğuk zincir altında en kısa süre içerisinde laboratuvara getirildi ve *Enterococcus faecalis* varlığı yönünden analiz edildi.

Karkastan alınan swap örnekleri, karkasın son yıkamasından sonra ISO standardı 17604'e göre alındı. Kısaca, seçilen her bir yarım karkasın dört bölgesinden (boyun, döş, yan ve sağrı) steril kare plastik bir şablon kullanılarak, yaklaşık 100 cm²'lik bir alandan (toplam: 400 cm²) örnekleme yapıldı (13). Alet ve ekipman (bıçaklar, yarma testeresi, çengel) ve yüzey örnekleri, Stuart Besiyerli Swab (BTR, Ankara) kullanılarak yaklaşık 10 cm²'lik bir alandan alınmıştır (14). Atık su örnekleri ise kesimi takiben aseptik koşullarda steril plastik tüpler içerisinde 50 mL hacminde olacak şekilde toplandı (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma süresince farklı mezbahalarda yapılan örnekleme

Alınan Örnek	Mezbaha Ziyaret Dönemlerinde alınan Örnek Sayısı						Total örnek Sayısı
	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	
Karkas Yüzey	30	30	30	30	30	30	180
Ekipman ve Yüzey	17	17	17	17	17	17	102
Bıçaklar	8	8	8	8	8	8	48
Testere	1	1	1	1	1	1	6
Çengel	7	7	7	7	7	7	42
Deri Bandı	1	1	1	1	1	1	6
Atık Su	3	3	3	3	3	3	18
							300

2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyonu

Analiz edilecek örnekler ilk aşamada Enterococcosel Broth'ta (Becton Dickinson, ABD) 35±1°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürden 0.1 mL Enterococcosel agara (Becton Dickinson, USA) ekim yapılarak 35±1°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Besi yerinde üreyen şüpheli koloniler seçilerek Gram boyama ve biyokimyasal (katalaz ve %6,5 NaCl'de büyüme) testlerle doğrulandıktan sonra izolatlar moleküler analizlere tabii tutuldu (15).

2.2. DNA Ekstraksiyonu

İzolatların DNA ekstraksiyonu Genomik DNA İzolasyon Kiti (InstaGene™ Matrix, BIO-RAD, ABD) kullanılarak kit protokolünün öngördüğü şekilde gerçekleştirildi.

2.3. *Enterococcus* spp. ve *E. faecalis* İdentifikasyonu

Enterococcus spp. izolatlarının doğrulanması ve *E. faecalis* 'in identifikasyonu için sırasıyla Sanderson ve ark. (16), Delibas ve Turkyılmaz (17) tarafından belirtilen klasik PZR tekniği kullanıldı. Reaksiyon karışımı; toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1xPCR buffer, 0.2 mM dNTP miks, 2 mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA polimeraz, her bir primerden 10 pmol ve 5 µL DNA'dan oluştu. Çalışmada kullanılan primer dizilimleri ve PZR koşulları Tablo 2'de belirtildi (16,17).

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primerler ve PZR koşulları

	Hedef Gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Baz Büyüklüğü (bp)	PCR koşulları	Kaynak
<i>Enterococcus</i> spp.	23SRNA	GAGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT	93	95°C'de 10 dk. 95°C'de 15 sn. 60°C'de 1 dk. 72°C'de 1 dk. } 40s	Sanderson ve ark., (2019)
<i>E. faecalis</i>	ddl _{E. faecalis}	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTCACG	475	94°C'de 3 dk. 94°C'de 1 dk. 54°C'de 1 dk. 72°C'de 1 dk. 72°C'de 7 dk. } 30s	Delibas ve Turkyılmaz, (2018)
Jelatinaz	gelE	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419	95°C'de 3 dk. 95°C'de 30 sn. 56°C'de 30 sn. } 35s 72°C'de 1 dk.	Gajewska ve ark., (2023) Li ve ark., (2019)
Yüzey proteini	espfs	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	72°C'de 10 dk	Metev ve ark., (2017)

2.4. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen izolatların biyofilm oluşturabilme kabiliyetleri, Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ve Mikroplak Yöntemi ile analiz edildi (8,18).

2.5. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi

Elde edilen *E. faecalis* CRA'ya yayma plak tekniği ile ekildikten sonra 35±1°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan izolatlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan izolatlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi (8,18,19).

2.6. Mikroplak Yöntemi

Bu yöntemde 96 oyuklu düz tabanlı steril polistiren plakalar üzerinde *E. faecalis* izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri test edildi. Kısaca, izolatlar %2 glikoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya) 35±1°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra kültürler %2 glikoz içeren taze TSB içinde 1:100 seyreltildi. Her bir izolatın seyreltilmiş kültüründen 100 µL düz tabanlı bir polistiren mikrotitre plakasının (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) kuyucuklarına ilave edildi ve 35±1°C'de 24 saat inkübe edildi. Çalışmada sadece TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol, TSB ve biyofilm kabiliyeti olan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 içeren kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuk üç kez 300 µL fosfat tampon salin solüsyonu (PBS; pH 7.2) yıkandı. Daha sonra 100 µL %1'lik kristal viyole ile boyanarak 30 dakika bekletildikten sonra kuyucuklar steril distile su ile üç kere yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi takiben yapışık hücrelerin sabitlenmesi için kuyucuklara 150 µL %99 etanol ilave edildi ve kuyucukların optik dansitesi (OD) 570 nm'de ELISA (Thermo-Scientific, Waltham, ABD) cihazında

ölçüldü (18,19). Elde edilen OD değerleri "cut off" (sınır) değerlerinin dönüşümleri de esas alınarak değerlendirildi. Sınır değerleri negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma fazlası olarak değerlendirildi (20).

2.7. Biyofilm Oluşumu ile İlişkili Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen izolatlar da biyofilmle ilişkili olarak *esp* ve *gelE* virülans genlerinin varlığını daha önceki çalışmalarda (7,18,21) yayınlanmış spesifik primerler ve prosedürler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla PZR karışımı 12.5 µL 2X PCR master miks-DreamTaq Green PCR (Thermo, ABD), her bir primerden 0.5 µL (10 pmol), 9.5 µL steril saf su ve 2 µL template DNA ile 25 µL toplam hacimde olacak şekilde hazırlandı. Amplifiye PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde 120 V'ta 45 dk elektroforez (EC250-90, Thermo, ABD) işleminden sonra, UV jel görüntüleme sistemi (Biorad Gel Doc XR, ABD) ile değerlendirildi.

3. Bulgular

Çalışma kapsamında analiz edilen 300 örneğin 212'si (% 70.6) konvansiyonel yöntemle *Enterococcus* spp. olarak belirlendi. Bu izolatlara uygulanan PZR yönteminde ise 212 örneğin 177'si (% 83.5) *Enterococcus* spp. olarak konfirme edildi (Resim 1). Bu izolatların 72'si (% 40.6) mezbaha atık sularından, 65'i (% 36.7) karkas, 14'ü (% 7.9) bıçak, 10'u (% 5.6) deri bandı, 8'i (% 4.5) çengel ve 8'i (% 4.5) testereden elde edildi.

Çalışmada ziyaret edilen mezbahada çeşitli kaynaklardan izole edilen 177 *Enterococcus* spp. izolatının 40'ı (% 22.5) *E. faecalis* olarak tanımlandı (Resim 2).

Elde edilen *E. faecalis* izolatlarının 18'i (% 100) mezbaha atık sularına, 13'ü (% 7.2) karkas, 9'u (% 8.8) ekipman ve yüzey örneklerine aitti. Analiz edilen 40 *E. faecalis* izolatının 35'i (% 87.5) biyofilm oluşturma yeteneği

sergiledi. Bu izolatlardan 33'ü (% 82.5) jelatinaz kodlayan *gelE* genini taşıyordu ve bu izolatlardan bir tanesinde (%

2.5) *esp* proteini kodlayan *esp* geni de mevcuttu (Tablo 3).

Tablo 3: Analiz edilen örneklerde *E. faecalis* dağılımı ve özellikleri

Analiz Edilen Örnek	İzole Edilen <i>E. faecalis</i> Oranı/ (%)	<i>E. faecalis</i> İzolatlarının Biyofilm Yapma Kabiliyeti (%)			Biyofilm ile İlişkili Genleri Varlığı (%)	
		CRA	MPT		<i>gelE</i>	<i>espfs</i>
			G	O		
Karkas (n=180)	13 (7.2)	13 (100)	4 (30.7)	7 (53.8)	12 (92.3)	-
Mezbaha Atık Suyu (n=18)	18 (100)	14 (77.7)	5 (27.7)	11 (61.1)	14 (77.7)	
Ekipman ve Yüzey (n=102)	9 (8.8)	8 (88.8)	6 (66.6)	2 (22.2)	7 (77.7)	1 (11.1)
Bıçak (n=48)	2 (4.1)	2 (100)	-	2 (100)	2 (100)	-
Çengel (n=42)	2 (4.7)	2 (100)	1 (50)	-	-	-
Testere (n=6)	2 (33.3)	2 (100)	2 (100)		2 (100)	
Deri Bandı (n=6)	3 (50)	2 (66.6)	3 (100)	-	3 (100)	1 (33.3)
Toplam (n=300)	40 (13.3)	35 (87.5)	15 (37.5)	20 (50)	33 (82.5)	1 (2.5)

4. Tartışma ve Sonuç

Enterococcus türleri arasında, *E. faecalis* hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde en çok izole edilen türdür. Hayvansal kaynaklı gıdalardan çiğ etin etken ile kontaminasyonu daha çok mezbahalardaki kesim işlemleri esnasında yetersiz hijyen uygulamaları ile meydana gelmektedir (2,11). Bu nedenle kesim işlemi sırasında yenilebilir karkas dokularının çapraz kontaminasyonu önemli bir gıda güvenliği riskini temsil eder (11,12). Daha önce yapılan çalışmalarda birçok hayvansal gıda örneğinde *E. faecalis* izolasyonu yapılmıştır (1,10,17,19,22,23). Fakat mezbaha ortamında *Enterococcus* spp.'nin varlığı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada mezbahada analiz edilen örneklerin %83.5'ü *Enterococcus* spp. pozitif olarak belirlendi. Bu çalışmada test edilen örneklerde *Enterococcus* spp.'nin pozitiflik oranının yüksek olması çalışmanın gerçekleştirildiği mezbahada hijyen koşullarının yetersiz olduğunu göstermektedir. Çalışılan örneklerin etken ile kontaminasyonu; kesim, deri yüzme, iç organ çıkarma ve etin işlenmesi sırasında kötü hijyen uygulamaları nedeniyle meydana gelebilir (12). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak Aslam ve ark. (24), Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25), Schlegelová ve ark. (26) mezbaha ve et işletmelerinde analiz edilen örneklerin sırasıyla % 87, % 72 ve % 66'sında *Enterococcus* spp. izole etmişlerdir. Buna karşılık Wambui ve ark. (12) ve Mansour ve ark. (27)'un mezbaha örneklerinde rapor etmiş olduğu sırasıyla % 25 ve % 12'lik *Enterococcus* spp. pozitiflik oranı bu çalışma sonucuna göre oldukça düşüktü.

Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) rapor ettikleri orana benzer olarak (% 25), bu çalışmada elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının % 22.5'i (analiz edilen örneklerin % 13.3'ü) *E.*

faecalis olarak belirlendi. Fakat Wambui ve ark. (12), Aslam ve ark. (24)'nın mezbaha izolatlarından elde ettikleri % 41,8, % 83'lük *E. faecalis* pozitiflik oranı bu çalışma sonucundan yüksekti. Buna karşılık, Mansour ve ark. (27) tarafından rapor edilen *E. faecalis* izolasyon oranı (% 6.7) bu çalışma sonuçlarından düşüktü.

Sunulan çalışmada analiz edilen karkas örneklerinde belirlenen % 7.2 *E. faecalis* izolasyon oranı, Klein ve ark. (28), Chingwaru ve ark. (22), Aslam ve ark. (24), Schlegelová ve ark. (26), Wambui ve ark. (12), Golob ve ark. (1), Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) ve Gürkan ve ark. (19) tarafından bildirilen (sırasıyla % 87, % 57.2, % 90, % 45, % 41.8, % 85., % 90 ve % 45) orandan düşük iken Mansour ve ark. (27) tarafından bildirilen orandan (% 2) yüksekti. Ayrıca Telli ve ark. (29) analiz ettikleri karkas örneklerinin hiç birisinde *E. faecalis* tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar, coğrafi konum, numune alma mevsimi, örnek büyüklüğü, izolasyon yöntemindeki farklılıklar ile ilişkili olabilir. Mezbahada kullanılan ekipmanlardaki oran değerlendirildiğinde bu çalışma ekipman ve yüzey örneklerinin % 8.8'inde *E. faecalis* izole edildi. Aslam ve ark. (24) mezbahadaki konveyörlerin % 83 oranında, Wambui ve ark. (12) bıçakların % 16.7, Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) ve Schlegelová ve ark. (26) ise yüzey ve ekipman örneklerinin sırasıyla % 72 ve % 78 oranında *E. faecalis* tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, daha önce yapılan çalışmalarda mezbahada kullanılan alet ve ekipmanların hayvansal gıda üretiminde halk sağlığı açısından önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir (30,31). Çalışmada analiz edilen mezbaha

atık sularının tamamından *E. faecalis* izole edildi. Mezbahalarda kesimden kaynaklanan atık suları yüksek miktarda içerdikleri lipitler ve proteinler gibi organik bileşiklerden dolayı patojenlerin gelişmesi için ideal ortamlardır (31, 32). Yapılan literatür taramalarında mezbaha atık suları ile ilgili çok sınırlı çalışmalardan Mansour ve ark. (27) mezbaha atık sularında % 4, Igbinosa ve Raje (32) % 52,6, Igbinosa ve ark. (33) ise % 25.6 oranında *E. faecalis* izole etmişlerdir. Bu sonuçlar, mezbaha atıksularının *E. faecalis* için önemli bir kontaminasyon kaynağı olacağını göstermektedir. Dolayısıyla, arıtılmamış veya yetersiz arıtılmış atık suların çevreye salınımı veya tarımsal sulamada kullanılması halk sağlığı açısından potansiyel bir risk olabilir (34,35).

Çalışma kapsamında elde edilen *E. faecalis* izolatlarının % 87.5'i biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Benzer şekilde, Igbinosa ve ark. (33) mezbaha ortamından izole ettikleri *E. faecalis* izolatlarının tamamının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) et tesisinden izole ettikleri *E. faecalis* izolatının % 43'ünün biyofilm oluşturma yeteneğinin olduğunu rapor etmişlerdir. Yine Azizi ve ark. (36) klinik izolatlardan, Anderson ve ark. (10), Wozniak-Biel ve ark. (37) ve Gürkan ve ark. (19) gıdalardan izole ettikleri *E. faecalis* izolatlarının sırasıyla, % 76, % 39, % 100 ve % 16.6'sının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Günümüzde, patojenik bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneği önemli virülans faktörleri arasında sayılmaktadır (25,38). Anderson ve ark. (10) ve Azizi ve ark. (36) ve Igbinosa ve ark. (33) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına benzer şekilde, bu çalışmada biyofilm pozitif 35 *E. faecalis* izolatları arasında 33'ü (% 82.5) jelatinaz kodlayan *gelE* genini taşıyordu ve bu izolatlardan bir tanesinde (% 2.5) *esp* proteini kodlayan *esp* geni de mevcuttu. Di Rosa ve ark. (39), Azizi ve ark. (36) ve Ozkok ve ark. (9) *esp* virülans faktör geni ve biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Tsirikonis ve ark. (40), Soares ve ark. (41) ve Azizi ve ark. (36) biyofilm oluşumu için *gelE* geninin önemli bir role sahip olduğunu ve bu genlerin varlığının biyofilm oluşumu ile önemli oranda ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Kayseri ilindeki kesimhaneden alınan tüm örnek türlerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecalis*'i varlığı ve biyofilm oluşumunun virülans faktör genleri ile ilişkili olduğu belirlendi. Kesimhane ortamında fekal kontaminasyon indikatörü olan *E. faecalis*'lerin bulunması, kesim hattında hijyenik koşulların yetersiz olduğunu orta koymaktadır. Ayrıca, izole edilen *E. faecalis* izolatları biyofilm yapma yetenekleri sayesinde, kontamine yüzeyler ve et yoluyla besin zincirinde kolayca yayılarak insanlara bulaşabilir ve dolayısıyla gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturabilir. Bu nedenle, kesimhanelerde *E. faecalis* ile kontaminasyon

riskini önlemek ya da azaltmak için, hijyenik koşulların iyileştirilmesi gereklidir. Bu amaçla kesim hattında GMP ve HACCP sistemleri etkin bir şekilde uygulanmalı, kesimhane personeline hijyen eğitim verilmeli ve atık sular özenle arıtıldıktan sonra kanalizasyona verilerek olası çevre kirlenmesi önlenmelidir.

Kaynaklar

1. Golob M, Pate M, Kušar D, Dermota U, Avberšek J, Papič B, et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 1–12. doi:10.1155/2019/2815279.
2. Cattoir V. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Curr Opin Microbiol* 2022; 65: 73–80. doi:10.1016/j.mib.2021.10.013.
3. Azimi Mahalleh A, Göncüoğlu M. Enterokokların önemli virülens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2014; 25: 47–52.
4. Ben Braïek O, Smaoui S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 5938210. doi:10.1155/2019/5938210.
5. Makarov DA, Ivanova OE, Pomazkova A V., Egoreva MA, Prasolova O V., Lenev S V., et al. Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia. *Vet World* 2022; 15: 611. doi:10.14202/VETWORLD.2022.611-621.
6. Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype–genotype correlations and distribution of key virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from patients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist* 2021; 14: 1713–23. doi:10.2147/IDR.S305167.
7. Li Y, Pan J, Wu D, Tian Y, Zhang J, Fang J. Regulation of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation and Quorum Sensing Related Virulence Factors with Ultra-low Dose Reactive Species Produced by Plasma Activated Water. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2019; 39: 35–49. doi:10.1007/S11090-018-9930-2.
8. Khalil MA, Alorabi JA, Al-Otaibi LM, Ali SS, Elsilik SE. Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Urinary Tract Infections. *Pathogens* 2022; 12: 34. doi:10.3390/PATHOGENS12010034.
9. Ozkok Z, Bilgin K, Cayci YT, Birinci A. Investigation of biofilm formation of *Enterococcus* species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2021; 78: 363–72. doi:10.5505/TurkHijyen.2021.02328.
10. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: Prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol* 2016; 6: 1534. doi:10.3389/FMICB.2015.01534/BIBTEX.
11. Ramos S, Igrejas G, Capelo-Martinez JL, Poeta P. Antibiotic resistance and mechanisms implicated in fecal enterococci recovered from pigs, cattle and sheep in a Portuguese slaughterhouse. *Ann Microbiol* 2012; 62: 1485–94. doi:10.1007/S13213-011-0402-7.
12. Wambui J, Tasara T, Njage PMK, Stephan R. Species Distribution and Antimicrobial Profiles of *Enterococcus* spp. Isolates from Kenyan Small and Medium Enterprise Slaughterhouses. *J Food Prot* 2018; 81: 1445–9.
13. ISO. Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis ISO 17604:2015 - 2015.

14. Güzel N, Ertaş Onmaz N. Toplu Yemek Üretimi Yapan Bir İşletmede Personel ve Gıda Temas Yüzeylerinin Mikrobiyolojik Yönden Değerlendirilmesi. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine Erciyes University* 2022; 19: 189–94. doi:10.32707/ERCIVET.1204281.
15. Yoon S, Kim Y Bin, Seo KW, Ha JS, Noh EB, Lee YJ. Characteristics of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from broiler breeder farms. *Poult Sci* 2020; 99: 6055–61. doi:10.1016/J.PS.2020.06.087.
16. Sanderson H, Ortega-Polo R, McDermott K, Zaheer R, Brown RS, Majury A, et al. Comparison of biochemical and genotypic speciation methods for vancomycin-resistant enterococci isolated from urban wastewater treatment plants. *J Microbiol Methods* 2019; 161: 102–10. doi:10.1016/j.mimet.2019.04.019.
17. Delibas Y, Turkyılmaz S. Mastitisli Sığır Süt Örneklerinden Elde Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında Bazı Bakteriyosin Genlerinin Saptanması. *Van Veterinary Journal* 2018; 29: 27–32. doi:10.1186/S13567-017-0425-6.
18. Gajewska J, Chajęcka-Wierzchowska W, Byczkowska-Rostkowska Z, Saki M. Biofilm Formation Capacity and Presence of Virulence Determinants among *Enterococcus* Species from Milk and Raw Milk Cheeses. *Life* 2023; 13: 495. doi:10.3390/LIFE13020495/S1.
19. Gürkan T, Külahcı MB, Çıtak S. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin çeşitli virülans özellikleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *European Journal of Science and Technology* 2021; 28: 924–32. doi:10.31590/ejosat.1012135.
20. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40: 175–9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).
21. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, Demir M, Akkaya Y, Kiris Satılmış Ö. Enterokok Türlerinin Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51: 101–14. doi:10.5578/mb.53992.
22. Chingwaru W, Mpuchane SF, Gashe BA. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Milk, Beef, and Chicken and Their Antibiotic Resistance. *J Food Prot* 2003; 66: 931–6. doi:10.4315/0362-028X-66.6.931.
23. Kim E, Shin SW, Kwak HS, Cha MH, Yang SM, Gwak YS, et al. Prevalence and characteristics of phenicol-oxazolidinone resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food-producing animals and meat in Korea. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11335. doi:10.3390/IJMS222111335/S1.
24. Aslam M, Diarra MS, Service C, Rempel H. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. recovered from a commercial beef processing plant. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 235–41. doi: 10.1089/fpd.2009.0380.
25. Ławniczek-Walczuk A, Cyprowski M, Górny RL. Distribution of Selected Drug-resistant *Enterococcus* Species in Meat Plants in Poland. *Rocznik Ochrona Środowiska* 2022; 24: 345–59. doi:10.54740/ros.2022.024.
26. Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Konstantinová L, Necidová L, Šišák F, et al. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci* 2010; 28: 450–61. doi:10.17221/65/2009-CJFS.
27. Mansour AM, Nossair MA-S, Soliman FS, Rabah I, Saleh NA. Detection of *Enterococcus faecalis* as an Indicator Organism in Abattoirs' Environment as well as Meat. *Matrouh Journal of Veterinary Medicine* 2023; 3: 12–8.
28. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1825–30. doi:10.1128/AEM.64.5.1825-1830.1998/FORMAT/EPUB.
29. Telli N, Telli AE, Biçer Y, Turkal G, Uçar G. Isolation and antimicrobial resistance of vancomycin resistant *Enterococcus* spp. (VRE) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) on beef and chicken meat, and workers hands from slaughterhouses and retail shops in Turkey. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2022; 72: 3345–54. doi:10.12681/jhvms.29373.
30. Gonulalan Z, Bacak M, Ertas N. Evaluation Of Microbiological Indicators For Haccp Cattle Slaughterhouse Line In A Business Operator. *MANAS Journal of Engineering* 2014; 2: 23–9.
31. Geçer A, Ertaş Onmaz N. Kanatlı Kesimi Aşamalarında *E. Coli* O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2018; 13: 285–92. doi:10.17094/ATAUNIVBD.356910.
32. Igbinsa IH, Raje OC. Characterization of *Enterococcus* species isolated from abattoir environment in Benin city, Nigeria. *Ife Journal of Science* 2020; 21: 81. doi:10.4314/IJS.V21I3.8.
33. Igbinsa EO, Beshiru A, Odjadjare EEO. Diversity, antimicrobial characterization and biofilm formation of *Enterococci* isolated from aquaculture and slaughterhouse sources in Benin City, Nigeria. *Ife Journal of Science* 2021; 22: 51–63. doi:10.4314/ij.s.v22i3.4.
34. Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Zaid CZM, Yardi A, Shukor RA, et al. Characterization and risk factors of vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) among animal-affiliated workers in Malaysia. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 1184–95. doi:10.1111/J.1365-2672.2012.05406.X.
35. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, et al. Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci* 2014; 76: 685–92. doi:10.1292/JVMS.13-0423.
36. Azizi M, Hasanvand B, Kashef M, Alvandi AH., Abiri R. Virulence Factor and Biofilm Formation in Clinical *Enterococcal* Isolates of the West of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2017; 10: 14379. doi:10.5812/jjm.14379.
37. Woźniak-Biel A, Bugla-Płoskońska G, Burdzy J, Korzekwa K, Ploch S, Wieliczko A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Humans and Turkeys in Poland. *Microb Drug Resist* 2019; 25: 277–86. doi:10.1089/MDR.2018.0221.
38. Ch'ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology* 2018 17: 82–94.
39. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola C, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 145–50. doi:10.1111/J.1574-6968.2006.00112.X.
40. Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, et al. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb Pathog* 2012; 52: 336–43. doi:10.1016/J.MICPATH.2012.03.003.
41. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, D'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014; 5: 634. doi:10.4161/VIRU.28998.



Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Dursun Alp GÜNDOĞ¹✉, Güven GÜNGÖR², Candan GÜNGÖR¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹,
 Zafer GÖNÜLALAN¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 26.04.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 29.05.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Gündoğ DA, Güngör G, Güngör C, Onmaz NE ve Gönülalan Z. Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):18-26.

Özet: Bu çalışmada, çeşitli gıda kaynaklı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde Kongo Kırmızısı Agar'ın (KKA) duyarlılığını ve özgülüğünü mikroplak (MP) yöntemi ile kıyaslanarak belirlemek amaçlandı. Çalışma kapsamında, çeşitli gıda ve çevre örneklerinden elde edilen 36 *Staphylococcus aureus*, 30 *Listeria* spp., 35 *Escherichia coli* ve 34 *Salmonella* spp. olmak üzere toplam 135 izolatın biyofilm oluşturma yetenekleri KKA ve MP yöntemleri kullanılarak belirlendi. İki yöntemin sonuçları arasındaki uyum Kappa uyum katsayısı hesaplanarak araştırıldı. İncelenen izolatların %51.1'inin KKA'da, %53'ünün ise MP'de biyofilm ürettiği tespit edildi ($P>0.05$). *Listeria* spp. *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. izolatlarının sırasıyla KKA'da %60, %97,2, %11.4 ve %35.2'ü; MP'de ise %56.6, %100, %22.8 ve %32.3'ü biyofilm pozitif olarak tespit edildi ($P>0.05$). KKA yöntemi sadece *S. aureus*'da yüksek duyarlılığa (%97) sahip bulunurken; diğer suşlarda duyarlılık daha düşük bulundu. Özgülük değerleri *Listeria* spp.'da %39, *Salmonella* spp.'da %59 ve *E. coli*'de %89 olarak tespit edildi. Bu değerler MP yönteminde elde edilen değerlerden daha yüksekti. Sonuç olarak, KKA yönteminin duyarlılığının bakteri türüne göre değişkenlik gösterdiği; bu nedenle bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespit edilmesinde KKA ve MP yöntemlerinin birlikte uygulanmasının yararlı olacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Gıda patojenleri, Kongo kırmızısı agar, Mikroplak

Comparison of the Efficacy of Congo Red Agar in Detection of Biofilm Forming Abilities of Various Foodborne Pathogenic Bacteria

Abstract: In this study, the sensitivity and specificity of Congo Red Agar (CCA) were compared with Microplate (MP) method to assess the biofilm-forming abilities of various foodborne pathogenic bacteria. A total of 135 isolates (36 *Staphylococcus aureus*, 30 *Listeria* spp., 35 *Escherichia coli*, and 34 *Salmonella* spp.) obtained from different food and environmental samples were examined. The agreement between the results obtained from the two methods analyzed using the Kappa coefficient of agreement. The findings showed that 51.1% of the isolates tested positive for biofilm formation using CCA, while 53% tested positive using MP ($P>0.05$). When considering individual bacterial species, the percentages of biofilm-positive isolates were 60% for *Listeria* spp., 97.2% for *S. aureus*, 11.4% for *E. coli*, and 35.2% for *Salmonella* spp. using CCA, and 56.6%, 100%, 22.8%, and 32.3% using MP, respectively ($P>0.05$). The CCA method exhibited high sensitivity (97%) specifically for *S. aureus*, while its sensitivity was lower for other bacterial strains. The specificity values were 39% for *Listeria* spp., 59% for *Salmonella* spp., and 89% for *E. coli*, which were higher against the MP method. Therefore, it was concluded that the sensitivity of the CCA method varied depending on the bacterial species, suggesting that the combined application of CCA and MP methods would be beneficial in determining the biofilm-forming abilities of different bacteria.

Keywords: Biofilm, Congo red agar, Food pathogens, Microplate

1.Giriş

Biyofilmler, bir yüzeye veya birbirine tutunarak kendi ürettikleri bir ekzopolisakkarit (EPS) matriks içine gömülmüş mikroorganizma topluluklarıdır. EPS'nin yapısını polisakkaritler, proteinler, glikolipidler ve hücre dışı DNA (eDNA) oluşturmaktadır (1). Biyofilm matriksinin yapısında %97 su, %2-5 oranında mikrobiyal hücre, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve RNA bulunmaktadır (2, 3). Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında, mikroorganizmanın fimbriya veya flagella gibi uzantılarıyla bir yüzeye

tutunurlar. Ortamda yeteri kadar besin maddesi var ise bakteri hücresi, tutunduğu yüzeyde koloni oluşturmaya başlar. Bu aşamada ortamda bulunan diğer mikroorganizmalarda eş zamanlı olarak koloni oluşturur. İlerleyen aşamalarda, mikrokoloniler salgıladıkları EPS yapısı içerisinde topluluk oluşturarak karakteristik üç boyutlu biyofilm yapısı ile olgun biyofilme dönüşürler. Biyofilm yapısı içerisinde, popülasyonunun artması, besin kaynağı eksikliği ve oksijen yetersizliği gibi rekabet

faktörlerine bağlı olarak kopmalar gerçekleşir. Kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odakları oluşturabilir (2, 3). EPS'nin yapısında bulunan polisakkaritler; mikroorganizmaların yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumundan, proteinler; biyofilm oluşturan bakteriler arasındaki iletişimin sağlanmasından, glikolipidler; mikroorganizmaların virülans özellikler edinmesinden, eDNA; bakteri hücreleri arasında yatay gen transferi ve biyofilm topluluğunun üç boyutlu bir yapı geliştirmesinden sorumludur (4, 5). Mikroorganizmaların hayatta kalmaları için geliştirdikleri en önemli stratejilerden biri olan biyofilmin gramında yaklaşık 108-1011 hücre bulunmaktadır (6). Biyofilm matriksi içerisinde yer alan EPS'ler bir bariyer görevi görerek mikroorganizmaları dezenfektan, antibiyotik, UV ışını, konak immün yanıtı ve diğer dış etkenlere karşı korumaktadır (7).

Biyofilmdeki mikroorganizmalar, planktonik durumdaki mikroorganizmalara göre antibiyotiklere yaklaşık 1000 kat daha dirençli olabilir (8, 9). Biyofilm içindeki mikroorganizmalar arasında plazmidler aracılığı ile gerçekleşen horizontal gen transferi, virülans veya antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır (10). Bakteriye enfeksiyonların %60'ından fazlası biyofilm oluşumu fenomeni ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (11). Gıda üretim ve depolama alanları, özellikle et ve süt işletmeleri, yağlar, proteinler ve karbonhidratlar açısından zengin atık içermelerinden ötürü mikrobiyal tutunma ve biyofilm oluşturma açısından uygun ortamlardır. Patojen mikroorganizmalar, gıda işletmelerine ait yüzeylere (tahta, cam, paslanmaz metal, plastik) tutunup kalıcı hale gelerek önemli bir kontaminasyon kaynağı olmaktadır (12). Gıda işletmelerinde, gıda ile temas eden metal yüzeylerde biyofilm oluşumu, korozyon ve tıkanmalara sebep vererek işleme prosedürünün aksamasına ve gıda güvenliği ile kalitesinde ciddi sorunlara neden olur (13,14). Birçok Gram-pozitif patojen bakteri (*Listeria* spp, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) ve Gram-negatif patojen bakteri (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella* spp.) biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (15-20).

Biyofilm oluşumunu tespit etmek için doku kültürü plakası (Tissue culture plate, TCP), tüp yöntemi (Tube method, TM), Kongo kırmızı agar (KKA), mikroplak (MP) yöntemi, floresan mikroskopik inceleme, taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM), konfokal lazer taramalı mikroskop (confocal laser scanning microscope, CSLM) ile inceleme gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. SEM ve CSLM teknikleri biyofilm yapısının varlığını ve üç boyutlu yapısını görüntülemeye

kullanılmaktadır ancak pahalı ve kantitatif değerlendirmede zayıf kalmaktadır. Biyofilm yapısını kristal viyole boyama yolu ile gerçekleştirilen yöntemlerde (TCP, TM, MP) ise tekrarlı yıkama aşamaları sonucu hücre kaybı ve biyofilm yapısını olumsuz etkilemesi gibi dezavantajlarına karşın ucuz ve kantitatif olarak iyi sonuç vermektedir. KKA yöntemi ise kolay ve ucuz bir yöntem olmasına karşın kantitatif ölçüm sağlayamamaktadır (21-23).

Biyofilm yeteneğine sahip patojen bakteriler ile ilgili risklerin önlenmesine yönelik en önemli aşamalardan birisi etkenin erken ve hızlı tespitidir. Bu çalışmada, gıda endüstrisinde halk sağlığı açısından risk oluşturan önemli patojenlerden Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Listeria* spp.) ve Gram negatif (*Escherichia coli* ve *Salmonella* spp) bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde ucuz ve kolay bir yöntem olan KKA'nın duyarlılık ve özgüllüğünün araştırılması ve sonuçların MP yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

2.1 Bakteriler

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 135 adet izolat (36'sı *S. aureus*, 35'i *E. coli*, 30'u *Listeria* spp., ve 34'ü *Salmonella* spp.) kullanıldı (Tablo 1). Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara, PZR analizi ile *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. izolatları sırasıyla *nuc*, *trpA*, *invA* ve *iap* genlerinin varlıkları sırasıyla Ertaş ve ark. (24), Clermont ve ark (25), Rahn ve ark. (26) ve Al ve ark. (27) tarafından belirtilen primer çiftleri kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla, %10 gliserollü Brusella broth içerisinde -20°C'de muhafaza edilen izolatlara, kanlı agar ekilerek 37 °C'de 24 h inkübe edilerek, saf kültürleri elde edildi. Inkübasyon süresi sonunda izolatların DNA'ları Genomik DNA İzolasyon Kiti (InstaGene™ Matrix-7326030, Bio-Rad, ABD) kullanılarak kit protokolüne göre ekstrakte edildi. Reaksiyon karışımı; toplam hacim 25 µL olacak şekilde 12,5 µL 2x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo scientific™-K1081, ABD), 6 µL nükleaz içermeyen su, her primerden 1 µL ve 2 µL DNA olacak şekilde hazırlandı. PCR Reaksiyonu, 94°C'de 3 dk ilk denatürasyon aşamasını takiben 35 siklus 94°C'de 30 s denatürasyon, 52.9-59 °C'de (*nuc*: 55°C, *trpA*: 59°C, *invA*: 53°C ve *iap*: 52.9°C) 30 s bağlanma, 72°C'de 1 dk uzatma aşamaları tamamlandıktan sonra, 72°C'de 2 dk son uzatma olarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. İzolatların elde edildiği ortam ve kaynaklar

Bakteri Türü	Örnekleme Yapıldığı Yer	İzole Edilen Kaynak	Örnek Sayısı
<i>Listeria spp.</i>	Mezbaha	Karkas	13
		Bıçak	5
		Konveyör	4
		Sucuk	4
		Atık su	1
	Mandıra	Süt	3
<i>E. coli</i>	Mezbaha	Salam	13
		Karkas	15
		Bıçak	5
		Çengel	2
<i>Salmonella spp.</i>	Mezbaha	Bıçak	3
		Konveyör	3
		Sığır Derisi	4
	Mandıra	Karkas	6
		Taze Peynir	18
<i>S. aureus</i>	Mezbaha	Çengel	3
		Bıçak	1
		Karkas	2
	Mandıra	Taze Peynir	4
		Kaşar Peyniri	6
		Süt	2
		Yoğurt	8
		Süt Tankı	8
		Zemin	2
Toplam			135

2.2. Çalışmada kullanılan Referans Suşlar

İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde, pozitif kontrol olarak güçlü biyofilm oluşturan *S. epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak ise biyofilm oluşturmeyen *S. epidermidis* ATCC 12228 suşu kullanıldı.

2.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Kabiliyetlerinin Belirlenmesi

Bu amaçla, bakterileri kolonilerinin morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumunun tespit edildiği kalitatif bir yöntem olan Kongo kırmızısı agar (KKA) ve kantitatif bir yöntem olan mikropalak (MP) yöntemleri kullanıldı.

2.3.1. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi

İzolatların biyofilm yapabilme özelliklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesi amacıyla Freeman ve ark. (28) tarafından bildirilen yöntemle göre KKA besiyeri kullanıldı. Bu amaçla, litresinde 50 g sakkaroz, 37 g Brain Heart Infusion (BHI, Merck 70138, Almanya) agar ve 0,8 g kongo kırmızısı (Merck 101340, Almanya) olacak şekilde besiyeri hazırlandı. Çalışma kapsamında kullanılan izolatlar, pozitif ve negatif kontrol suşları KKA besiyerine yayma plak tekniği ile ekildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda koloni morfolojisine göre değerlendirilen petripler oda ısısına alınarak 24 saat sonra tekrar değerlendirildi. Kuru opak siyah ve koyu kırmızı-siyah renkli koloniler biyofilm pozitif, pembe-kırmızı koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi. *Salmonella spp.* izolatlarında ise kuru-pürüzlü kırmızı, kahverengi ve pembe renkli koloniler biyofilm pozitif, düz ve beyaz koloniler ise negatif olarak kabul edildi. Kongo kırmızısı agar yöntemi her izolat için üç tekrarlı olarak uygulandı.

2.3.2. Mikroplak Yöntemi

İzolatların biyofilm üretiminin kantitatif ölçümü, Stepanović ve ark. (29) tarafından bildirilen mikroplak yöntemi ile yapıldı. İzolatlar, %2 glikoz (Merck 108342, Almanya) ilave edilen Triptik Soy Broth (TSB, Merck 105459, Almanya) içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürden 0,5 McFarland standardında ($\sim 1 \times 10^8$ kob/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Daha sonra düz tabanlı steril mikroplakların kuyucuklarına her bir bakteri süspansiyonundan 100 µL ve 100 µL TSB ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında plakaların içerikleri boşaltıldı ve 200 µL fizyolojik tuzlu su ile üç kez yıkanarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra her kuyucuğa 200µL %99'luk etanol ilave edilerek 15 dakika süre ile biyofilm yapan bakteriler fikse edildi. Fiksasyon işlemi takiben kuyucuklar boşaltılıp plakalar ters çevrilerek kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında kuyucuklar hazırlanan %2'lik kristal viyole (Merck 101408, Almanya) çözeltisi ile 5 dakika süre ile boyandıktan sonra distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Tutunan boyaların çözünmesi amacıyla kuyucuklara %33'lük glasiyal asetik asitten 160µL eklendi. Kuyucukların optik dansitesi (OD) ELISA okuyucu (MultiskanFC-51119000, Thermo, ABD) kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Çalışmada sadece steril TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol, güçlü biyofilm kabiliyetine sahip *S. epidermidis* ATCC 35984 inokule edilen TSB içeren kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her izolat için analiz üç kez tekrarlandı ve sonuçlar üç analizin ortalaması alınarak hesaplandı. ELISA cihazında, her bir izolat için elde edilen OD'ler, negatif kontrol kuyucukları için aşağıda belirtildiği gibi hesaplanan cut off" (sınır) değerleri ile karşılaştırılarak biyofilm varlığı ve derecesi belirlendi:

$OD_c = \text{negatif kontrolün ortalama OD'si} + (3 \times \text{SD negatif kontrol})$

$OD \leq OD_c$: Biyofilm negatif

$OD_c < OD \leq 2OD_c$: Zayıf biyofilm

$2OD_c < OD \leq 4OD_c$: Orta düzey biyofilm

$4OD_c < OD$: Güçlü biyofilm

2.4. İstatistiksel Analiz

KKA besiyerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde, MP yöntemi referans yöntem olarak kullanıldı (30). Test edilen izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri ile ilgili olarak MP ile KKA'dan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılık Pearson Ki kare testi ile değerlendirildi (31). İki yöntem arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı hesaplanarak belirlendi (30). Veri analizlerinde elde edilen $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizlerde Jamovi 2.3 paket programı kullanıldı. KKA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü ise aşağıda belirtilen formüller kullanılarak hesaplandı (32):

$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{Doğru Pozitiflik}}{\text{Doğru Pozitiflik} + \text{Yanlış Negatiflik}}$

$\text{Özgüllük} = \frac{\text{Doğru negatiflik}}{\text{Doğru negatiflik} + \text{Yanlış pozitiflik}}$

Doğru pozitiflik: Her iki yöntemde de biyofilm pozitif olan örnek sayısı

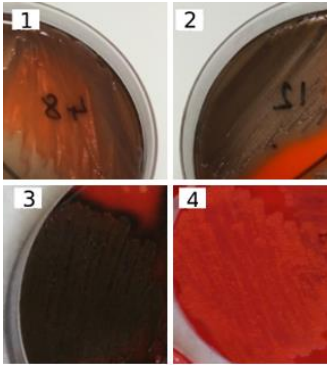
Doğru negatiflik: Her iki yöntemde de biyofilm negatif olan örnek sayısı

Yanlış pozitiflik: MP yönteminde negatif, KKA yönteminde pozitif çıkan örnek sayısı

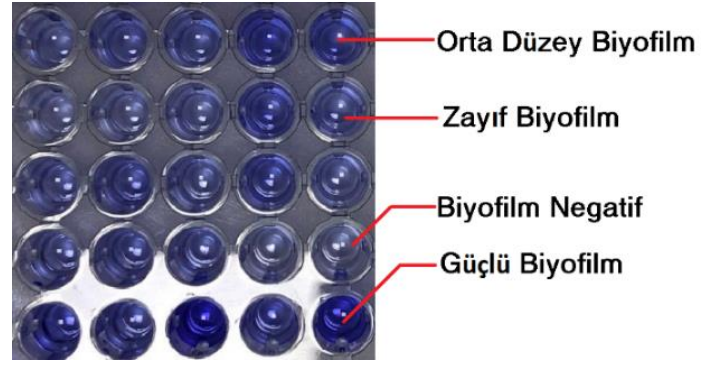
Yanlış negatiflik: MP yönteminde pozitif, KKA yönteminde negatif çıkan örnek sayısı

3. Bulgular

KKA yöntemine göre incelenen 135 adet izolatın 69 (%51)'u siyah koloni oluşturdu ve biyofilm pozitif, 66 (%49)'sı ise şeffaf/pembe renkli koloniye sahipti ve negatif olarak değerlendirildi (Şekil 1). MP yöntemine göre ise test edilen izolatların 72 (%53)'si biyofilm pozitif, 63 (%47)'ü biyofilm negatif olarak tespit edildi. Biyofilm pozitif izolatların 22 (%30.6)'si güçlü, 22 (%30.6)'si orta ve 28 (%38.8)'i zayıf biyofilm üretme yeteneği gösterdi (Şekil 2). Ayrıca, analiz edilen 135 izolatın 47 (%34.8)'si her iki yöntemde de biyofilm oluşturma yeteneği sergiledi. Bu verilere göre, izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespitine yönelik uygulanan yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($P > 0.05$).



Şekil 1. Biyofilm pozitif izolatların kongo kırmızısı agar ve Mikroplak görüntüleri. A; Biyofilm pozitif izolatların kongo kırmızısı agarda görünümü: **1;** *Listeria* spp., **2;** *E. coli*, **3;** *S. aureus*, **4;** *Salmonella* spp.



Şekil 2. Kristal viyole ile boyanmış mikroplaklarda farklı yoğunlukta biyofilm oluşumu

Gram pozitif bakterilerden *Listeria* spp. ve *S. aureus* izolatlarının sırasıyla 18 (%60)'i ve 35 (%97.2)'i KKA besiyerinde; 17(%56.6)'sı ve 36 (%100)'sı MP'de biyofilm pozitif idi. *Listeria* spp izolatlarının 10 (%33.3)'unda ve *S. aureus* izolatlarının 34 (%94.4)'ünde her iki yöntemin sonuçları uyumlu bulundu. Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *Salmonella* spp. izolatlarının sırasıyla 4 (%11.4)'ü ve 12 (%35.2)'si KKA'da; 8 (%22.8)'i ve 11 (%32.3)'i ise

MP'de biyofilm üreticisi olarak tespit edildi (Tablo 2). Uygulanan her iki testte de *E. coli* izolatlarının sadece biri (%2.9) ve *Salmonella* spp. izolatlarının ise 9'u (%26,5) biyofilm pozitif olarak uyumlu sonuç verdi. Çalışma kapsamında biyofilm üreticisi olarak belirlenen izolatların çoğunluğu karkas eti (KKA'da %41.7, MP'de %33.3) orjinli idi.

Tablo 2. Analiz edilen izolatların biyofilm oluşturma özellikleri

Analiz Edilen Türler		İzolatların Biyofilm Yapma Kabiliyetleri (%)				
		KKA	MP			
			Total	Zayıf	Orta	Güçlü
Gram (+) n=66	<i>Listeria</i> spp. (n=30)	18 (%60)	17 (%56.6)	16 (%94.1)	1 (%5.9)	-
	<i>S. aureus</i> (n=36)	35 (%97.2)	36 (%100)	1 (%2.8)	14 (%38.9)	21 (%58.3)
Gram (-) n=69	<i>E. coli</i> (n=35)	4 (%11.4)	8 (%22.8)	5 (%62.5)	2 (%25)	1 (%12.5)
	<i>Salmonella</i> spp. (n=34)	12 (%35.2)	11 (%32.3)	6 (%54.5)	5 (%45.5)	-
Toplam (n=135)		69 (%51.1)	72 (%53.3)	28 (%38.8)	22 (%30.6)	22 (%30.6)

n: Numune sayısı, **KKA**: Kongo Kırmızısı Agar, **MP**: Mikroplak

KKA yönteminin duyarlılık oranları *Listeria* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., ve *S. aureus* için sırasıyla %59, %13, %17 ve %97 olarak bulundu. Yöntemin gerçek pozitifleri ayırma düzeyi olarak ifade edilen özgüllük oranları ise *Listeria* spp., *E. coli* ve *Salmonella* spp. için sırasıyla %39, %89 ve %59 olarak tespit edildi. *S. aureus* izolatlarının tamamı (%100) MP yönteminde pozitif olarak belirlendiği için istatistiksel olarak özgüllüğü belirlenemedi. Cohen'in kappa katsayısına (κ) göre her iki yöntemin sonuçlarının uyumluluğu, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. için kötü ($\kappa < 0$), *E. coli* ve *S. aureus* için ise önemsiz olarak ($0.01 < \kappa < 0.2$) belirlendi (Tablo3).

4. Tartışma ve Sonuç

Patojenik mikroorganizmaların gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturmaları, gıda tesislerinde mikrobiyal kontaminasyon riskini artırarak insan sağlığını etkileyen çeşitli gıda güvenliği sorunlarına neden olmaktadır (1,26–28). Daha önce yapılan birçok çalışmada, çeşitli hayvansal gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. türlerinin biyofilm oluşturma özellikleri rapor edilmiştir (15–20). Bu çalışmada, gıda kaynaklı bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma

yetenekleri ve biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan KKA ve MP tekniklerinin etkinliği ve uyumu karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Analiz edilen *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria* spp., ve *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm pozitiflik oranı %11.4 ve %97.2 arasında değişkenlik gösterdi. Çalışmada duyarlılık açısından test edilen mikroorganizmaların biyofilm üretimini saptamada kullanılan her iki yöntemden elde edilen sonuçların benzer olduğu görüldü. Analiz edilen izolatların %51'inin KKA'da, %53'ü MP testinde biyofilm pozitif olarak belirlendi. Analiz edilen izolatların %34.8'i her iki testte biyofilm pozitif özellik gösterdi.

Test edilen *S. aureus* izolatlarının %35'i KKA'da, %36'sı MP'de ve %94.4'ü her iki yöntemde de biyofilm pozitif olarak tespit edildi. Benzer şekilde, Shakya ve ark. (36), sığır mastitisine sebep olan 20 MRSA izolatının, KKA'da %25 ve MP'de %45'inin biyofilm pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Jain ve Agarwal (37), biyofilm tespit yöntemlerini kıyasladıkları çalışmalarında analiz ettikleri 84 adet *S. aureus* izolatının %79'unun MP ile ve %75'inin KKA ile biyofilm pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Yine, Kırmusaoglu (22) analiz ettiği *S. aureus* izolatlarının %40'ının KKA'da pozitiflik gösterirken, %51'inin MP testinde pozitif sonuç gösterdiği bildirdi. Bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, daha önce yapılan birçok çalışma hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen *S. aureus* izolatlarının çeşitli derecelerde biyofilm yapma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (15,34,36-38). Kowalska ve ark. (39)'nın çalışma sonuçlarına benzer olarak, analiz edilen izolatların %58.3'ünün güçlü biyofilm yapma yeteneğine sahipti Buna karşın Uyanık ve ark. (34), Chen ve ark. (40) ve Güngör ve ark. (41) *S. aureus* izolatlarının genellikle zayıf biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *Listeria* spp. izolatlarının %94.1'ü zayıf biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti ve KKA, MP ve her iki testte izolatların biyofilm pozitiflik oranları sırasıyla %60, %56 ve %33.3 olarak tespit edildi. Daha önce yapılan birçok çalışmada da mezba ve gıda kaynaklı *Listeria* spp. izolatlarının biyofilm özelliklerinin belirlenmesinde MP yöntemi kullanılmış olup, orta ve zayıf düzeyde biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir (34,39,47,48). Davarpanah ve Bialvaei (49) analiz ettikleri 23 *L. monocytogenes* izolatının %86.95 ve %91.3'ünün sırasıyla KKA ve MP yöntemlerinde biyofilm pozitif olduğunu göstermişlerdir.

E. coli izolatlarının çoğunluğu (%62.5) daha önceki çalışma sonuçları (17, 34, 39, 50, 51) ile uyumlu olarak zayıf biyofilm üreticisi olarak tespit edildi. Analiz teknikleri kıyaslandığında, *E. coli* izolatlarının 4 (%11.4)'ü, 8 (%22.8)'i ve biri (%2.9) sırasıyla KKA, MP ve her iki yöntemde biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Benzer şekilde Onmaz ve ark., (52) balıktan elde ettikleri *E. coli*

izolatlarının %24'ünün KKA'da ve %36'sının MP testinde biyofilm pozitif olduğunu bildirmiştir. Kanatlı etinden izole edilen *E. coli* izolatlarının değerlendirildiği bir çalışmada ise pozitiflik oranının KKA'da %72, MP'de ise %94 olduğu tespit edilmiştir (53). Jain ve Agarwal., (37) bu çalışmadan farklı olarak, analiz ettikleri 30 *E. coli* izolatının biyofilm oluşturma yeteneğini belirlemede KKA yönteminde %90 ve MP yönteminde %70 biyofilm pozitiflik rapor etmişlerdir. *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, Amrutha ve ark. (56), Aksoy (57) ve Cufaoglu ve ark. (58) analiz ettikleri *Salmonella* izolatlarının güçlü biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada da izolatların %54.5'i güçlü ve %45.5'i orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edildi. Açıklan (59) ile Uyanık ve ark. (34) ise bu çalışma sonuçlarının aksine, analiz ettikleri kanatlı etlerinden izole ettikleri *Salmonella* izolatlarının biyofilm negatif olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, analiz edilen *Salmonella* spp. izolatların %35.2 ve %32'sinin sırasıyla KKA ve MP testinde biyofilm pozitif olduğu ve 9 (%26.5) izolatın her iki testte de uyumlu sonuç verdiği belirlendi. Aksoy (57) analiz ettiği 20 *Salmonella* izolatının %94 ve %100'ünün sırasıyla KKA'da ve MP de biyofilm pozitif olarak tespit etmiştir. Amrutha ve ark. (56) ise gıda kaynaklı *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm pozitiflik oranının KKA için %50'sinin MP testi için ise %75 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışma sonuçları MP yöntemine kıyasla KKA yönteminin *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin saptanmasında yüksek duyarlılıkta (%97) olmasına karşın, *Listeria* spp. izolatlarında iyi duyarlılık (%59) ve düşük özgüllüğe (%39) sahip olduğunu gösterdi (Tablo 3). Bu veriler *S. aureus*' un biyofilm yeteneğinin belirlenmesinde KKA'nın güvenilir bir yöntem olduğunu fakat, *Listeria* spp.'ler için bu yöntemin tek başına kullanılmasının yanlış pozitiflik veya yanlış negatifliğe neden olabileceğini göstermektedir (42). Bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde, daha önce yapılan bazı çalışmalarda, *S. aureus*'ların biyofilm yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerden KKA'nın duyarlılığının yüksek olduğu rapor edilirken (37,38); bazılarında ise bu yöntemin duyarlılığının düşük olduğu ve güvenilir olmadığı öne sürülmüştür (42-45). Melo ve ark. (38) test ettikleri *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesinde KKA yönteminin duyarlılığını %86 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar KKA'nın *S. aureus*'un biyofilm özelliğinin tespit etmesinde istatistiksel olarak önem arz ettiğini; ancak, MP yönteminin duyarlılık açısından daha hassas olduğunu bildirmişlerdir (36). Dhanawade ve ark. (46)'da moleküler analizlerle MP ve KKA yöntemlerinin arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Tablo 3. Kongo kırmızısı agar yönteminin duyarlılık ve özgüllük oranları

Kriter	<i>Listeria spp.</i> (%95 GA)	<i>E. coli</i> (%95 GA)	<i>Salmonella spp.</i> (%95 GA)	<i>S. aureus</i> (%95 GA)
Duyarlılık*	0.59 (0.33-0.82)	0.13 (0.01-0.53)	0.17 (0.02-0.48)	0.97 (0.85-0.99)
Özgüllük**	0.39 (0.14-0.68)	0.89 (0.71-0.98)	0.59 (0.36-0.79)	-
Cohen'in Kappa katsayısı (κ)***	-0.03 (-0.38-0.33)	0.02 (-0.30-0.33)	-0.25 (-0.54-0.05)	0.00
Pearson Ki-Kare	X ² =0.02 p=0.880	X ² =0.01 p=0.914	X ² =1.12 p=0.289	-

GA: Güven aralığı, *Gerçek negatif olanları ayırma düzeyi, ** Gerçek pozitif olanları ayırma düzeyi, ***İki yöntem arasındaki uyumun belirlenmesinde κ değeri; <0'dan kötü, 0.01 ile 0.20 arası önemsiz, 0.21 ile 0.40 arası zayıf, 0.41 ile 0.60 arası orta, 0.61 ile 0.80 arası iyi, 0.81 ile 1.00 arası çok iyi düzeyde

Gram negatif bakteriler için bu iki yöntem karşılaştırıldığında; KKA yönteminde duyarlılıklar düşük olmasına rağmen özgüllüklerinin iyi olduğu belirlendi. Duyarlılık oranları *E. coli* ve *Salmonella spp.* izolatları için sırasıyla %13 ve %17, özgüllükleri ise %89 ve %59 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara benzer bir şekilde Hassan ve ark. (21) yaptıkları çalışmada KKA'nın *E. coli* izolatlarının biyofilm özelliklerini değerlendirmesinde duyarlılığını %11 ve özgüllüğünü ise %92 olarak bildirdi. Benzer bir şekilde Fazel ve ark (54) *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında KKA sonuçlarının duyarlılıklarını %50 ve özgüllüğünü ise %71 olarak belirledi. Bu çalışma ve daha önce yapılan çalışma sonuçları, KKA'nın *E. coli* ve *Salmonella spp.* izolatlarının biyofilm özelliğini tespit etmesinde gerçek negatifleri ayırma düzeyinde zayıf, gerçek pozitifleri ayırmada ise iyi olduğunu gösterdi (21,55). Bu bulgular, KKA yönteminin duyarlılığının düşük olması nedeni ile *E. coli* ve *Salmonella spp.* türlerinde tek başına kullanılması durumunda sonuçların yanlış değerlendirilmesine neden olabileceği sonucuna varıldı. Fakat özgüllüklerinin iyi olması, bu yöntemin MP yöntemini tamamlayıcı bir test olarak kullanılmasının uygun olacağını göstermektedir (36).

Sanchez Jr ve ark. (55)'in bildirdiği gibi, bu çalışmada belirlenen biyofilm oluşumunun hem bakteri türlerine hem de izolatlar (suş ve/veya serotip) bağlı olduğunu gösterdi. Analiz edilen izolatlardan her iki yöntemde de biyofilm üretme kabiliyeti en fazla *S. aureus*'larda en az ise *E. coli*'lerde tespit edildi. Bu durum analiz edilen *E. coli* izolatlarının büyük çoğunluğunda flagella antijen ve flagella ile ilişkili genin (fliCH7) bulunmadığını düşündürdü. Verstraeten ve ark. (60) ve Vazquez-Sanchez ve ark. (61), biyofilm oluşumu ve patogenezinin zorunlu olarak bakterilerin hareketliliklerini sergilemelerini gerektirdiğini göstermiştir. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneği çevresel faktör (bakterilerin yüzeye tutunmasında sıcaklık ve pH'nın etkisi vb.) ve bakterinin kendisine bağlı (yüzey yükü, hidrofilité, yüzey enerjisi ve organeller vb.) olduğu bildirilmiştir (58, 62, 63).

Çalışmada, izolatların çoğunluğunun biyofilm oluşturma yeteneklerinin pozitiflik dağılımının MP yöntemine kıyasla KKA testlerinde farklılık göstermesi, KKA besiyerinde koloni morfolojisinin kromojenik değerlendirmeye dayanması; dolayısı ile kalitatif ve subjektif olması ile ilişkilendirilebilir (64).

Sonuç olarak, bu çalışmada mezbaha ve mandıra orjinli gıda kaynaklı patojen bakterilerden *E. coli*, *Listeria spp.* *S. aureus* ve *Salmonella spp.* izolatlarının farklı derecelerde biyofilm yapma kabiliyetine sahip olduğu belirlendi. Biyofilm üretme yeteneği, bakterilerin işletme ortamda uzun süreli kalıcılığını etkileyen önemli bir faktördür ve ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasının yansısı teknolojik süreçlerde aksamalara neden olarak ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu nedenle gıda endüstrisinde bulunabilecek patojenlerin insan sağlığına yönelik riskleri azaltmak için biyofilm üretme potansiyelinin araştırılması önemlidir. Bu çalışmada KKA yönteminin MP'ye kıyasla *S. aureus* haricindeki diğer bakterilerde düşük duyarlılık fakat daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu; bu nedenle, MP yönteminin de tamamlayıcı bir test olarak KKA yöntemi ile kullanılmasının bulguların güvenilirliğini artıracığı sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 2010; 8:623–33. doi: 10.1038/nrmicro2415.
2. Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. International Journal of Environmental Research and Public Health 2021; 18: 1–31. doi:10.3390/IJERPH18042014.
3. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. Frontiers in Microbiology 2021; 12, 1106. doi: 10.3389/FMICB.2021.676458/BIBTEX.
4. Kartal MO, Ekinci MB, Poyraz B. Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi. Akademik Gıda 2021; 19, 353-63. doi: 10.24323/akademik-gida.1011231.
5. Gupta P, Gupta H, Poluri KM. Geraniol eradicates Candida glabrata biofilm by targeting multiple cellular pathways. Applied Microbial and Cell Physiology 2021; 105, 5589-605. doi: 10.1007/s00253-021-11397-6.

6. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 2019;5: e02192. doi: 10.1016/J.HELIYON.2019.E02192.
7. Abebe GM. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *Int J Microbiol* 2020;2020. doi: 10.1155/2020/1705814.
8. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, et al. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance* 2019; 25:72–9. doi: 10.1089/MDR.2018.0027.
9. Myszka K, Czaczyk K. Bacterial biofilms on food contact surfaces - a review. *Pol J Food Nutr Sci* 2011; 61. doi: 10.2478/v10222-011-0018-4.
10. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in Implant Infections: Its Production and Regulation 2018;28:1062–8. doi: 10.1177/039139880502801103.
11. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
12. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol* 2017;83. doi: 10.1128/AEM.02508-16
13. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endop Topics* 2010; 22:2–16. doi: 10.1111/J.1601-1546.2012.00277.X.
14. Olanbiwoninu AA, Popoola BM. Biofilms and their impact on the food industry. *Saudi J Biol Sci* 2023;30. doi: 10.1016/J.SJBS.2022.103523.
15. Achek R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Didouh N, et al. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. *Pathogens* 2020; 9:153. doi: 10.3390/PATHOGENS9020153.
16. Agostinho Davanzo EF, Dos Santos RL, Castro VH de L, Palma JM, Pribul BR, Dallago BSL, et al. Molecular characterization of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the federal District and State of Goiás, Brazil. *PLoS One* 2021;16:e0259687. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0259687.
17. Bhardwaj DK, Taneja NK, DP S, Chakotiya A, Patel P, Taneja P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming, antimicrobial resistant, pathogenic *Escherichia coli* isolated from Indian dairy and meat products. *Int J Food Microbiol* 2021; 336:108899. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108899.
18. Ćwiek K, Korzekwa K, Tabiś A, Bania J, Bugla-Płoskońska G, Wieliczko A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. *Pathogens* 2020; 9:643. doi: 10.3390/PATHOGENS9080643.
19. Kaptchouang Tchatchouang CD, Fri J, Montso PK, Amagliani G, Schiavano GF, Manganyi MC, et al. Evidence of Virulent Multi-Drug Resistant and Biofilm-Forming *Listeria* Species Isolated from Various Sources in South Africa. *Pathogens* 2022; 11:843. doi: 10.3390/PATHOGENS11080843/S1.
20. Ma Y, Xu X, Gao Y, Zhan Z, Xu C, Qu X, et al. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* isolated from human patients and animal source foods in China. *Int J Food Microbiol* 2020; 335:108859. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108859.
21. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15:305–11. doi: 10.1590/S1413-86702011000400002.
22. Kırmusaoğlu S. The comparison of methods used for the detection of biofilm formation that cause antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2017; 9:28–33. doi: 10.21601/ORTADOGUTIPDERGISI.299940.
23. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 2018; 9:522–54. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
24. Ertaş N, Gönülalan Z. Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg* 2010; 24: 11–15.
25. Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenaillon O, Denamur E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology* 2008; 10: 1000–1006. doi: 10.1111/J.1462-2920.2007.01520.X.
26. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 1992; 6(4): 271–279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-F.
27. Al S, Disli HB, Hizlisoy H, Ertas Onmaz N, Yildirim Y, Gonulalan Z. Prevalence, and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from wastewater of cattle slaughterhouses in Turkey. *Journal of Applied Microbiology* 2022; 132(2): 1518–1525. doi: 10.1111/JAM.15261.
28. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872. doi: 10.1136/JCP.42.8.872.
29. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40:175–9. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.
30. Öcal D, Tekeli A, Dolapçı İ. Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Biyofilm Oluşumunun Çeşitli Kongo Kırmızısı Besiyerlerinde Değerlendirmesi. *Temel Tıp Bilimleri* 2022; 75(1): 8-15. doi: 10.4274/atfm.galenos.2021.54366.
31. Agresti A. An Introduction to Categorical Data Analysis. Second Edition. Wiley-Interscience, 2007.
32. Kraemer HC. Evaluating medical tests: Objective and quantitative guidelines. Newbury Park, California: Sage publications Inc, 1992.
33. Alvarez-Ordóñez A, Coughlan LM, Briand R, Cotter PD. Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities 2019;10:173–95. doi: 10.1146/ANNUREV-FOOD-032818-121805.
34. Uyanık T, Bölükbaş A, Gücükoğlu A, Çadırcı Ö. Çeşitli gıda örnekleri ve kesimhanelerden izole edilen bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques* 2022; 7:338–45. doi: 10.31797/VETBIO.1194207.
35. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol* 2009; 20:407–13. doi: 10.1016/J.TIFS.2009.01.054.
36. Shakya P, Nayak A, Jogi J, Rai A, Bordoloi S, Scholar HK, et al. Phenotypic detection and comparison of biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *The Pharma Innovation Journal* 2022:1352–7.
37. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 2009; 76:88–92. doi: 10.1016/J.MMET.2008.09.017.

38. Melo P de C, Menezes Ferreira L, Nader Filho A, Francisco Zafalon L, Godoy Vicente HI, de Souza V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013; 44:119. doi: 10.1590/S1517-83822013005000031.
39. Kowalska J, Maćkiw E, Stasiak M, Kucharek K, Postupolski J. Biofilm-Forming Ability of Pathogenic Bacteria Isolated from Retail Food in Poland. *J Food Prot* 2020; 83:2032–40. doi: 10.4315/JFP-20-135.
40. Chen GQ, Wu YH, Wang YH, Chen Z, Tong X, Bai Y, et al. Effects of microbial inactivation approaches on quantity and properties of extracellular polymeric substances in the process of wastewater treatment and reclamation: A review. *J Hazard Mater* 2021; 413:125283. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125283.
41. Gungor C, Barel M, Dishan A, Burak Disli H, Koskeroglu K, Onmaz NE. From cattle to pastirma: Contamination source of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the pastirma production chain. *LWT* 2021; 151:112130. doi: 10.1016/J.LWT.2021.112130.
42. Knobloch JKM, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191:101–6. doi: 10.1007/S00430-002-0124-3/METRICS.
43. Sharlee R. Detection of biofilm production among *Staphylococcus aureus* by Congo red method and tube method. *Indian Journal of Microbiology Research* 2020; 7:222–5. doi: 10.18231/J.IJMR.2020.040.
44. Tahaei SAS, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D, Gajdács M. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: A laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infect Drug Resist* 2021; 14:1155–68. doi: 10.2147/IDR.S303992.
45. Ebineshan K, Pallapati MS, Srikantam A. Occurrence of bacterial biofilm in leprosy plantar ulcers. *Lepr Rev* 2020; 91:130–8. doi: 10.47276/LR.91.2.130.
46. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure N V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 2010; 34:81–9. doi: 10.1007/S11259-009-9326-0.
47. Moretro T, Langsrud S, Heir E. Bacteria on Meat Abattoir Process Surfaces after Sanitation: Characterisation of Survival Properties of *Listeria monocytogenes* and the Commensal Bacterial Flora. *Adv Microbiol* 2013; 2013:255–64. doi: 10.4236/AM.2013.33037.
48. Doijad SP, Barbuddhe SB, Garg S, Poharkar K V., Kalorey DR, Kurkure N V., et al. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS One* 2015;10: e0137046. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0137046.
49. Davarpanah M, Bialvaei AZ. Prevalence, antimicrobial resistance, and biofilm-formation of *Listeria monocytogenes* in bulk raw milk in East Azerbaijan province, Iran. *Reviews and Research in Medical Microbiology* 2023; 2023:73–8. doi: 10.1097/MRM.0000000000000313.
50. Flament-Simon SC, Duprilot M, Mayer N, García V, Alonso MP, Blanco J, et al. Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2019; 10:1183. doi: 10.3389/FMICB.2019.01183/BIBTEX.
51. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5:1–8. doi: 10.1186/S13756-016-0109-4/TABLES/5.
52. Onmaz NE, Yildirim Y, Karadal F, Hizlisoy H, Al S, Gungor C, et al. *Escherichia coli* O157 in fish: Prevalence, antimicrobial resistance, biofilm formation capacity, and molecular characterization. *LWT* 2020; 133:109940. doi: 10.1016/J.LWT.2020.109940.
53. Dishan A, Hizlisoy H, Barel M, Disli HB, Gungor C, Ertas Onmaz N, et al. Biofilm formation, antibiotic resistance and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail chicken meats. *British Poultry Science* 2022. doi: 10.1080/00071668.2022.2116697.
54. Fazel A, Bavari S, Borji S. Detecting of biofilm formation in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*: an evaluation of different screening methods. *Journal of Current Biomedical Reports* 2021;2. doi: 10.52547/JCBioR.2.2.56.
55. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; 13:47. doi: 10.1186/1471-2334-13-47.
56. Amrutha B, Sundar K, Shetty PH. Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables. *J Food Sci Technol* 2017; 54:1091–7. doi: 10.1007/S13197-017-2555-2/FIGURES/4.
57. Aksoy D. Determination of in vitro Biofilm Formation Abilities of Food Borne *Salmonella Enterica* Isolates. *Trak Univ J Nat Sci* 2019; 20:57–62. doi: 10.23902/TRKJNAT.471236.
58. Çufoğlu G, Onaran Acar B, Cengiz G, Ayaz ND, Göncüoğlu M. Mono-and Mixed-Species Biofilm Formation by *Salmonella* *Infantis*, *Salmonella* *Kentucky*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. *Mol Psychiatry* 2021; 47:149–53. doi: 10.5152/actavet.2021.21006.
59. Açıkalin D. *Salmonella* *Infantis* Suşlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Çevresel ve Genetik Faktörlerin Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.
60. Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* 2008; 16:496–506. doi: 10.1016/J.TIM.2008.07.004.
61. Vázquez-Sánchez D, Antunes Galvão J, Oetterer M. Contamination sources, biofilm-forming ability and biocide resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 isolated from tilapia-processing facilities. *J Food Saf* 2018;38: e12446. doi: 10.1111/JFS.12446.
62. Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Estève M, Ghigo JM, et al. Preventing Biofilm Formation and Associated Occlusion by Biomimetic Glycocalyxlike Polymer in Central Venous Catheters. *J Infect Dis* 2014; 210:1347–56. doi: 10.1093/INFDIS/JIU249.
63. Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 2017; 7:36670–83. doi: 10.1039/C7RA02497E.
64. Öcal DN, Dolapçı I, Karahan ZC, Tekeli A. Investigation of biofilm formation properties of *Staphylococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51:10–9. doi: 10.5578/MB.46552.



Bioaccumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish Species Retailed in Kayseri Region: Potential Public Health Hazard of Toxic Metals

Şerife TOKALIOĞLU¹, Zafer GÖNÜLALAN², Emrah ŞİMŞEK³, Nurhan ERTAŞ ONMAZ², Erdal YILMAZ⁴

¹Erciyes University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kayseri/TÜRKİYE

²Erciyes University, Veterinary Faculty, Department of Food Hygiene and Technology, Kayseri/TÜRKİYE

³Muğla Sıtkı Koçman University, Milas Veterinary Faculty, Department of Aquatic Animal Diseases, Muğla/TÜRKİYE

⁴Erciyes University, Veterinary Faculty, Department of Aquatic Animal Diseases, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 02.05.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 14.06.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Tokaloğlu Ş, Gönülalan Z, Şimşek E, Onmaz NE ve Yılmaz E. Bioaccumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish Species Retailed in Kayseri Region: Potential Public Health Hazard of Toxic Metals. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):27-36.

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the heavy metal (Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, V, Zn) accumulations in the muscles of freshwater fish retailed in the Kayseri region by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For this purpose, a total of 91 edible freshwater fish, including 37 *Cyprinus carpio*, 27 *Sander lucioperca*, 6 *Tinca tinca*, 5 *Esox lucius*, 4 *Squalius cephalus*, 5 *Copeata tinca*, 3 *Silurus glanis*, and 4 *Oncorhynchus mykiss* species, were used. Statistical analyses such as principal component, cluster, and correlation analysis were done to evaluate the obtained data. The order of mean concentrations (mg kg⁻¹ wet wt.) of metals in all fish meat samples were Al (204) > Zn (10.2) > Fe (6.43) > Cu (0.666) > Hg (0.589) > Ni (0.556) > Pb (0.497) > Cr (0.396) > Ag (0.291) > Se (0.144) > As (0.074) > Co (0.043) > Cd (0.037) > V (0.027). Hg, Cd, and Pb concentrations in some samples exceeded the permissible legal limits, whereas As concentrations was lower than maximum allowable limits. Ninety-one fish samples were categorized into five categories by principal component analysis (PCA) with Eigenvalues higher than 1.00. Cluster analysis results showed that the pollution with metal pairs analyzed might be from similar sources. In conclusion, in this study in some fish samples, the levels of some toxic elements (Hg, Cd, and Pb) were higher than permitted legal limits. Therefore, it could be suggested that the consumption of these fish might pose a hazard for public health.

Keywords: Freshwater fish, Heavy metals, HCA, ICP-MS, PCA

Kayseri Bölgesinde Perakende Satışı Yapılan Tatlı Su Balık Türlerinde Ağır Metallerin Birikimi: Toksik Metallerin Potansiyel Halk Sağlığı Tehlikesi

Özet: Bu çalışmada, Kayseri bölgesinde perakende satışı yapılan tatlı su balıklarının kaslarında ağır metal (Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, V, Zn) birikimlerinin indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 37 adet *Cyprinus carpio*, 27 adet *Sander lucioperca*, 6 adet *Tinca tinca*, 5 adet *Esox lucius*, 4 adet *Squalius cephalus*, 5 adet *Copeata tinca*, 3 adet *Silurus glanis* ve 4 adet *Oncorhynchus mykiss* türü olmak üzere toplam 91 yenilebilir tatlı su balığı kullanıldı. Elde edilen verileri değerlendirmek için temel bileşen, küme ve korelasyon analizi gibi istatistiksel analizler yapıldı. Tüm metallerin numunelerdeki derişimleri (mg kg⁻¹ yaş ağırlık) sırasıyla; Al (204) > Zn (10.2) > Fe (6.43) > Cu (0.666) > Hg (0.589) > Ni (0.556) > Pb (0.497) > Cr (0.396) > Ag (0.291) > Se (0.144) > As (0.074) > Co (0.043) > Cd (0.037) > V (0.027) idi. Bazı numunelerdeki Hg, Cd ve Pb derişimleri yasal limitleri aşarken, As derişimleri izin verilen maksimum limitlerin altındaydı. Temel bileşen analizine göre (PCA), 91 balık örneği özdeğerleri 1.00'den yüksek olan beş kategoriye ayrıldı. Küme analizi sonuçları, analiz edilen metal çiftleri ile kirliliğin benzer kaynaklardan olabileceğini gösterdi. Sonuç olarak, bu çalışmada bazı balık örneklerinde bazı toksik elementlerin (Hg, Cd ve Pb) seviyeleri yasal izin verilen limitlerin üzerinde bulundu. Bu nedenle, bu balıkların tüketilmesinin halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Tatlı su balığı, Ağır metaller, HCA, ICP-MS, PCA

1.Introduction

Many kinds of industrial wastes, traffic, and agricultural activities lead to freshwater pollution, of which the most important and common are heavy metals. However, fish are known to be bio-indicators for heavy metals in aquatic ecosystems. In other words, fish tissue tends to amass heavy metals (1,2). Contamination of water resources by heavy metals constitutes significant threats for ecosystem safety

and aquatic organisms and human health. When heavy metals are accumulated in water, they can be transferred to the food chain, and it might pose a public health risk due to their ability to bioaccumulate, toxicity, and the fact that they cannot be eliminated from the body (3-6).

The toxic metal level in fish depends on fish age, size (length and weight), sex, dietary habit, location, amount of time exposed to the elements, and environmental conditions

(water chemistry, salinity, hardness, temperature, and contaminants) (3, 5, 7). Metals can be classified as necessary for different physiological and biochemical functions (copper, zinc, selenium, iron, cobalt, magnesium, manganese, molybdenum, nickel, chromium, vanadium) and potentially toxic (arsenic, cadmium, lead, mercury, and silver) (8-10). Fish are important foodstuff for their ability to collect different elements in their muscles (4). However, because they tend to lose salts and gain water, freshwater fish are exposed to heavy metal accumulation more than marine fish (11). Several studies about metal contamination in fish muscles have been reported using different analytical techniques, such as atomic absorption spectrometry (AAS) (4,5,10), chemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometry (CVG-AFS) (12), inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) (13, 14) and recently there is limited data about heavy metal pollution in fish muscles by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (10, 15, 16). ICP-MS, known as a reliable method for multi-element analysis in food samples and used to identify the sample groups of the measured variables, are hierarchical clustering analysis (HCA) and PCA (17).

This study was designed i) to detect the Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, V, and Zn levels of eight edible freshwater fish species in Kayseri city of Türkiye by ICP-MS, ii) to realize PCA, HCA, and correlation analyses by datum obtained from fish meat samples, and iii) to investigate the relationships among heavy metal concentrations in fish meats.

2. Materials and Methods

2.1. Instrumentation

An ICP-MS instrument (ICP-MS Agilent 7500a, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an autosampler was used in this study. The instrumental conditions were radio frequency power 1300 W, sample depth 7.6 mm; torch-H-0.5 mm, torch-V 0.7 mm, carrier gas 1.13 L min⁻¹, auxiliary gas flow rate 0.9 L min⁻¹, plasma gas flow rate 15 L min⁻¹, nebulizer pump 0.12 rps, spray chamber temperature 2°C, and interface cones of nickel. Before each experiment, the instrument was tuned for daily performance using the Agilent ICP-MS tuning solution of 10 µg L⁻¹ (Ce, Co, Li, Tl, and Y). ICP-MS was applied for ²⁷Al, ⁵¹V, ⁵³Cr, ⁵⁶Fe, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁷⁵As, ⁸²Se, ¹⁰⁷Ag, ¹¹¹Cd, ²⁰²Hg, ²⁰⁸Pb determinations in standards and the digests of the analyzed samples. A Berghofmws-4 microwave system (Berghof Speedwave MWS four digestion system, Germany) with closed Teflon vessels was used for microwave digestion of the samples.

2.2. Reagents

The reagents used in the experiment were analytical grade. Ultra-high purity (UHP) water (18.2 MΩ cm) was used to prepare all solutions. A multi-element calibration standard solution of 10 µg mL⁻¹ (Agilent Technologies, USA) was applied to prepare multi-element standard solutions. A mixed standard solution of Rh, Sc, and Bi of 200 µg L⁻¹ was applied as an internal standard to ensure the instrument's stability and check instrumental drift and non-spectral interferences. Concentrated HNO₃ (70%) and H₂O₂ (30–32%) were supplied by Merck (Germany). Dogfish Liver as reference material (DOLT-4) was acquired from the National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada.

2.3. Sample collection

In this study, a total of 91 edible freshwater fish samples of 8 species (37 *Cyprinus carpio*, 27 *Sander lucioperca*, 6 *Tinca tinca*, 5 *Esox lucius*, 4 *Squalius cephalus*, 5 *Copeata tinca*, 3 *Silurus glanis*, and 4 *Oncorhynchus mykiss*) were purchased from a local fisherman in Kayseri, Turkey, between February and May 2018. Their length and weight ranged from 19 to 64 cm and 72 to 1836 g, respectively (Table 1). Upon collection, the fish were immediately transferred into the icebox and conveyed into the laboratory, and then protocol numbers were given. Before dissection, they were allowed to thaw, and anthropometric measurements were taken. The edible muscles from these organisms were cut and stored at -20 °C. Before heavy metal analysis, the frozen fish samples were thawed in the refrigerator at +4 °C for 12 hours. After the epaxial muscle tissues of the fish were separated and washed with UHP water to prevent cross-contamination and placed in different petri dishes. Petri dishes were kept in an oven at 55°C for 12 ± 1 hour until the samples reached a constant weighing weight. The samples were ground into a homogenized powder with a porcelain mortar and pestle then transferred into falcon tubes, covered with paraffin, and stored in a desiccator.

2.4. Microwave digestion procedure

Briefly, 0.20 g of homogenized and powdered fish meat was digested with 2 mL of H₂O₂ (30%) and 8 mL of HNO₃ (65%) in a microwave digestion system (Berghof microwave system, Germany). The digestion program consisted of one step with potency: T(°C): 200, P(bar): 40, power (%): 90, Ta (min):15 and time (min): 40. After cooling for about 20 min, the digest was diluted to 25 mL by adding UHP water. The levels of Al, V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg, and Pb in the clear solutions were assessed using an Agilent 7500a ICP-MS with interior standards. The CRM (Dogfish Liver, DOLT-4) was dissolved with the same digestion method.

Table 1. Fish species and their length and weight range

Fish species	Number of samples (n)	Length range (cm)	Weight range (g)
<i>Tinca tinca</i>	6	22-34	251-513
<i>Cyprinus carpio</i>	37	21.5-50	178-1836
<i>Sander lucioperca</i>	27	25-37	134-492
<i>Esox lucius</i>	5	37-47	378-725
<i>Squalius cephalus</i>	4	32-36	456-691
<i>Copeata tinca</i>	5	19-39	72-708
<i>Silurus glanis</i>	3	48-64	692-1640
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	4	23.5-26.5	174-282

2.5. Quality control and assurance

The microwave digestion/ICP-MS method precision was validated by examination of the Dogfish Liver (DOLT-4). The levels of elements agreed with the DOLT-4, and the recoveries of elements ranged from 90% to 112% (Table 2). The limits of detection (LOD) were calculated as the ratio of the three standard deviations (SD) of the blank signals to the slope (b) of the calibration curve ($3SD/b$, $n=10$). The LODs were 4.46, 0.04, 1.50, 2.08, 0.96, 1.50, 0.12, 0.71, 0.15, 0.03, 0.07, 0.31, 0.64, and $0.72 \mu\text{g L}^{-1}$ for Fe, Al, Zn, Cu, Ni, Cr, V, Pb, As, Cd, Co, Se, Hg and Ag in fish samples, respectively. The determination coefficients for calibration curves of the metals were found to be ≥ 0.99 .

Table 2. Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material (DOLT-4)

	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
Al ^c	200	215 ±10	108
V ^c	0.6	0.56 ± 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 ± 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 ± 0.02	112
As	9.66 ± 0.62	9.55 ± 0.16	99
Cd	24.3 ± 0.8	24.2 ±0.3	100
Cu	31.2 ± 1.1	31.7±0.4	102
Fe	1833 ± 75	1914±65	104
Pb	0.16 ± 0.04	0.16±0.02	100
Hg	2.58 ± 0.22	2.31±0.02	90
Ni	0.97 ± 0.11	0.94±0.03	97
Se	8.3 ± 1.3	8.3±0.2	100
Ag	0.93 ± 0.07	0.86±0.01	92
Zn	116 ± 6	113±1	97

a: At 95 % confidence level, b: $n=3$, c: Information value

2.6. Statistical analysis

The SPSS 22 package for windows was used for all analyses. The mean and standard deviation of metal concentrations in meats of fish species were calculated. The Pearson correlation analysis reflected the degree of the linear relationship between metals (18). Multivariate analyses, including PCA and CA, were used to assess the relationships among the fish samples and metal accumulations. The varimax method was used with PCA. Eigenvalue criterion over 1.00 was used to decide the number of principal components. HCA was conducted with Ward's method, and a squared Euclidean distance was used as a distance measure. A Z score transformation was performed before cluster analysis.

3. Results and Discussion

3.1. Heavy metal levels in fish meats

This study observed the decreasing trend between Hg and Pb concentration and increased fish length and weight (Figs. 1a and 1b). In addition, the relationships between concentrations of Hg in *C. carpio* and *S. lucioperca* muscles are given in Fig. 1c and Fig.1d, respectively. It was revealed that the order of mean concentrations (mg/kg wet wt.) of metals in all fish meat samples were Al (204) > Zn (10.2) >

Fe (6.43) > Cu (0.666) > Hg (0.589) > Ni (0.556) > Pb (0.497) > Cr (0.396) > Ag (0.291) > Se (0.144) > As (0.074) > Co (0.043) > Cd (0.037) > V (0.027). Al showed the highest concentrations for all studied samples with a high standard deviation. The elevated Al levels may be because of the natural conditions of the soil (1). The accumulation of elements in fish meat samples is affected by many factors such as season, biological diversity, nutrition resource, water chemistry, salinity, temperature, contaminants, and food processing methods (19).

As shown in Table 3, the highest metal concentrations (mg kg^{-1}) in all fish muscles were as follows: V: 0.102, Se: 0.265 and Co: 0.083 in *Tinca tinca*; Al: 555, Cu: 1.746 and As: 0.114 in *S. lucioperca*; Zn: 34.4 and Hg: 1.383 in *E. lucius*; Cr: 0.847, Ni: 1.229, Ag: 2.557 and Cd: 0.101 in *S. cephalus*; and Fe: 7.68 and Pb: 1.483 in *S. glanis*. The European Food Safety Authority (EFSA) reports a tolerable daily intake of 0.9 mg/day for Cu in adults. The average intake level for Zn in Europe is reported to be 13 mg/day and 9 mg/day for men and women, respectively (20). The mean concentrations of Cu and Zn were lower than their permissible limit levels in fish samples. The Zn concentration was higher than its permissible limit level in one *E. lucius* and the four *S. lucioperca*.

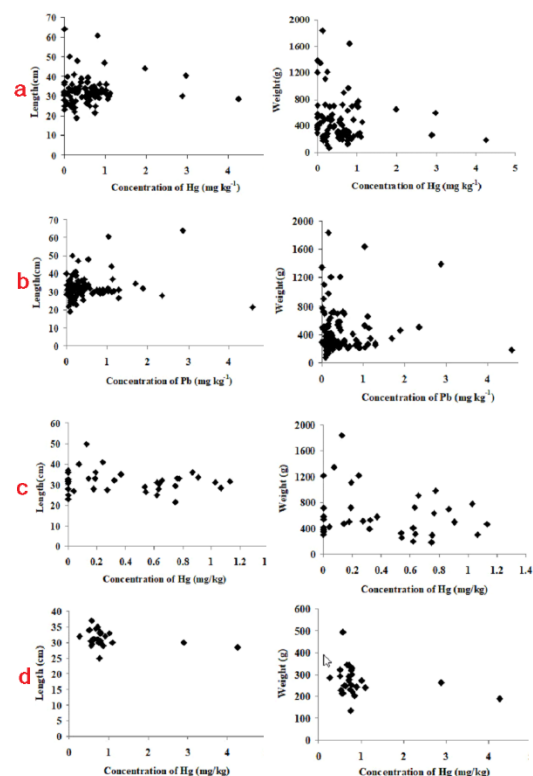


Figure. 1 Accumulation of (a) Hg and (b) Pb elements in fish muscles according to the fish sizes (n=91) and accumulation of Hg in (c) *C. carpio* (n=37) and (d) *S. lucioperca* (n=27) muscles according to the fish sizes.

3.2. Toxic elements

3.2.1. Mercury

In the present study, the concentration of Hg in all the fish species was in the range of 0.183 to 1.383 mg kg^{-1} , with an average of 0.589 mg kg^{-1} . The highest Hg concentration was determined as 4.26 mg kg^{-1} in *S. lucioperca*, followed by 2.97 mg kg^{-1} in *E. lucius*, 2.89 mg kg^{-1} in *S. lucioperca*, and 1.98 mg kg^{-1} in *E. Lucius* samples. The mean Hg concentrations for fish species were decreased in the following order: *E. lucius* > *S. lucioperca* > *S. cephalus* > *C. carpio* > *S. glanis* > *C. tinca* > *Tinca tinca* > *O. mykiss* (Table 3). Finally, Hg concentrations determined in fish muscle samples were found to be higher than 1.0 mg kg^{-1} for ten samples and higher than 0.5 mg kg^{-1} for forty samples set by the TFC (0.5-1 mg kg^{-1}) (21), and the EFSA (4 $\mu\text{g/kg}$ per week) (20) and the European Union's Regulation (EU) (0.5 and 1.0 mg kg^{-1}) (22) in this study. Also, the maximum Hg level in food authorized for human consumption is 0.5 $\mu\text{g/kg}$ according to the World Health Organization (WHO) guideline (23). The Hg concentration found in our study was relatively higher than those of Bilandıcı et al. (24) and Velusamy et al. (7); however, they were lower than those of Keshavarzi et al. (2) and Carvalho et al. (19). Mercury is a very toxic element that causes severe contamination. Fish get Hg through feeding, which can be determined by the diet quality, fish size, environmental factors, and water quality parameters (7).

Table 3. Heavy metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in eight freshwater fish species collected from Kayseri, Turkey

Species	n		Al	V	Cr	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
<i>Tinca tinca</i>	6	Mean	4.48	0.102	0.203	0.854	0.083	0.285	0.095	4.33	0.106	0.265	0.140	0.092	0.262	0.096
		SD	2.11	0.016	0.040	0.961	0.029	0.390	0.232	8.69	0.033	0.072	0.113	0.046	0.121	0.043
<i>C. carpio</i>	37	Mean	55.9	0.024	0.289	7.54	0.022	0.50	0.190	1.949	0.059	0.125	0.097	0.044	0.398	0.492
		SD	189	0.030	0.330	2.80	0.030	0.486	0.370	4.049	0.050	0.086	0.164	0.108	0.361	0.833
<i>S. lucioperca</i>	27	Mean	555	0.016	0.611	7.49	0.080	0.665	1.746	22.7	0.114	0.206	0.380	0.021	0.916	0.602
		SD	2443	0.035	0.431	6.00	0.162	0.756	7.414	30.0	0.062	0.081	0.840	0.064	0.808	0.407
<i>E. lucius</i>	5	Mean	70.0	0.032	0.222	3.132	0.033	0.636	0.430	34.4	0.068	0.070	0.275	0.031	1.383	0.363
		SD	91.1	0.047	0.159	2.492	0.038	0.533	0.462	54.4	0.052	0.086	0.558	0.048	1.080	0.424
<i>S. cephalus</i>	4	Mean	250	0.053	0.847	7.253	0.053	1.229	0.736	9.84	0.068	0.118	2.557	0.101	0.514	0.609
		SD	457	0.038	0.338	5.108	0.086	0.586	0.970	17.9	0.060	0.067	5.001	0.120	0.387	0.866
<i>C. tinca</i>	5	Mean	6.34	0.019	0.117	3.60	ND	0.194	0.143	1.018	0.006	0.018	0.029	0.016	0.350	0.139
		SD	2.40	0.041	0.032	1.34	ND	0.210	0.276	0.526	0.007	0.041	0.056	0.035	0.204	0.059
<i>S. glanis</i>	3	Mean	27.2	0.007	0.657	7.68	0.013	0.628	ND	0.976	0.011	0.125	0.021	0.002	0.373	1.483
		SD	18.8	0.007	0.264	2.32	0.012	0.331	ND	0.748	0.011	0.109	0.022	0.002	0.407	1.228
<i>O. mykiss</i>	4	Mean	8.05	ND	0.146	3.29	0.012	0.410	ND	0.394	0.055	0.010	0.004	ND	0.183	0.195
		SD	4.27	ND	0.014	0.68	0.017	0.516	ND	0.382	0.043	0.015	0.009	ND	0.046	0.147

n: sample number ND: not detected

3.2.2. Arsenic

Arsenic is assigned as a Group 1 human carcinogen by the WHO (25). The contaminated water and seafood could result in arsenic exposure to humans and adverse health effects such as skin rash, toxic cardiomyopathy, abdominal pain, vomiting, and diarrhea (26). The mean concentration of As in this study was found to be 0.074 mg kg^{-1} . The highest values of As were observed in *S. lucioperca* (0.114 mg kg^{-1}) while the lowest values were in *C. tinca* (0.006 mg kg^{-1}). It was found that the mean concentration of As in ten fish samples was below the detection limit (Table 3). The concentrations of As in fish muscles in this study were much lower than the limit values set by WHO (5 mg kg^{-1}) and the TFC (0.020 mg kg^{-1}). In this study, the mean of As concentrations in fish samples was significantly lower than previously reported by Shakeri et al. (27) and Okati et al. (28).

3.2.3. Cadmium

In the present study, the mean Cd concentration (0.037 mg kg^{-1}) was not over the permissible level of 0.050 mg kg^{-1} , $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.05\text{-}0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ set by the TFC (21), WHO (23), and EU (22), respectively. The Cd concentrations in 2 *S. lucioperca*, 2 *S. cephalus*, 5 *C. carpio*, 4 *Tinca*, and 1 *E. Lucius* muscles were found to be higher than the limits set by the TFC (21). In this study, the highest mean concentration of Cd was in *S. cephalus* muscle tissue (0.101 mg kg^{-1}), while the lowest mean concentration of Cd was detected in the *S. glanis* muscle tissue (0.002 mg kg^{-1}). In addition, the Cd concentrations in *O. mykiss* muscle tissue were below the detection limit (Table 2). The maximum Cd accumulation was detected in two *C. carpio* samples to be 0.488 mg g^{-1} and 0.408 mg g^{-1} .

3.2.4. Lead

Our results show that Pb concentrations are highest in *S. glanis* muscle (1.483 mg kg^{-1}), whereas it is lowest in *Tinca*

muscle (0.096 mg kg⁻¹). The Pb content in the muscles of the fish analyzed in the study can be given in the following order with an average of 0.589 mg kg⁻¹: *S. glanis* > *S. cephalus* > *S. lucioperca* > *C. carpio* > *E. lucius* > *O. mykiss* > *C. tinca* > *Tinca* (Table 3). In 14 fish muscles, Pb levels higher than 1.0 mg kg⁻¹ were found. However, the permissible limit for Pb concentration in the TFC (21), WHO (23), and EFSA (29) for fish meat is 0.3 mg kg⁻¹. The accumulation range of Pb in our study was like earlier studies conducted by Keshavarzi et al. (2) and Li et al. (10). Whereas significantly higher results were reported by Rahman et al. (4) who detected Pb in fish samples with concentrations ranging from 1.76 to 10.27 mg kg⁻¹.

3.3. Correlation analysis

The Pearson correlation analysis was performed to identify the origin of the element's contents in the eight different species of 91 fish meat. A correlation matrix was calculated for the metals analyzed in fish species to identify the common origin of metals. As shown in Table 4, a high

Table 4. Correlation analysis of heavy metals among meats of the eight fish species (n=91)

	Al	V	Cr	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb	Length	Weight		
Al	1																	
V	0.131	1																
Cr	0.443**	0.211*	1															
Fe	-0.180	0.392**	0.076	1														
Co	0.293**	0.502**	0.557**	-	1													
Ni	0.185	0.217*	0.411**	0.027	0.365**	1												
Cu	0.055	0.203	0.381**	-0.0165	0.687**	0.299**	1											
Zn	0.027	-0.123	0.098	0.058	0.015	-0.093	0.050	1										
As	0.438**	0.264*	0.564**	-0.003	0.390**	0.205	0.282**	0.349**	1									
Se	0.232*	0.115	0.289**	0.047	0.314**	0.233*	0.299**	0.103	0.479**	1								
Ag	0.426**	0.212*	0.327**	-0.179	0.291**	0.076	0.150	0.195	0.347**	0.095	1							
Cd	0.060	0.422**	0.211*	-0.0121	0.209*	0.101	-0.026	-0.094	0.119	0.027	-	0.032	1					
Hg	0.060	-0.185	0.004	-0.058	0.050	0.197	0.095	0.313**	0.088	0.156	0.121	-	0.048	1				
Pb	0.028	-0.148	0.166	0.217*	0.036	-0.004	-0.063	0.236*	-0.007	-0.116	-	0.008	0.204	0.052	1			
Length	-0.054	-0.069	0.122	0.098	-0.089	0.022	-0.035	0.109	-0.105	-0.086	0.028	-	0.144	0.049	0.121	1		
Weight	-0.086	0.034	0.044	0.044	-0.148	-0.044	-0.076	-0.098	-0.153	-	0.235*	-	0.001	0.039	0.148	0.004	0.760**	1

Bold numbers show significant correlations, Correlation is significant at the 0.01 level, * Correlation is significant at the 0.05 level.

positive correlation ($r=0.760$) was determined between the length and weight of the fish samples. The contents of Se in fish muscle samples were negatively correlated with a total weight ($r= -0.235$, $p<0.05$). There were no significant correlations ($p<0.05$) between the content of Cu, Cr, Ag, Co, and Hg and fish sizes (length and weight). Similarly, no significant relationships between fish size and Cu were found by Yi and Zhang (30). Zuliani et al. (16) recorded a negative correlation between Cr and fish size, while Arulkumar et al. (5) reported a remarkable negative correlation ($r= -0.328$ for Cd, $r= -0.192$ for Pb, and $r= -0.064$ for Cu) between the fish size and heavy metal (Cd, Pb, and Cu) concentrations.

In this study, most of the metal pairs significantly positively correlated with each other, from which Co-Cu (0.687), Cr-As (0.564), Cr-Co (0.557), As-Se (0.479), and Al-Cr (0.443) pairs demonstrated remarkable positive correlation, whereas Fe-V (-0.392) and Fe-Co (-0.359) pairs indicated considerable negative correlations at the 99% confidence level (Table 4).

3.4. Multivariate analysis

The Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) measure was implemented to investigate the suitability of the data for principal component analysis. KMO test shows the proportion of variance and should be above 0.5 for sampling adequacy (17,30). In this study, KMO was found to be 0.651. The data considered for this statistical treatment was obtained by measuring the concentration of fourteen elements, in triplicate, in 91 samples of fish muscles from different places.

Five PCs with eigenvalues greater than 1.0 (Kaiser Criterion) with a total contribution of 66.8% were taken out to identify the probable resources of metals in the fish muscles (Table 4). The metals in the same PC reflect a similar behavior for their origin and/or sources. As listed in Table 5, the first principal component (PC1 17.6 %) had strong positive loadings for Cr (0.56), Co (0.69), Ni (0.69), Cu (0.76), and Se (0.56). The second principal component (PC2 33.4%) expressed high positive loadings for Al (0.79), Cr (0.56), As (0.71) and Ag (0.69). High positive loading on PC3 (46.1 %) was found for V (0.65) and Co (0.47), whereas Zn (0.76) and Hg (0.75) had high positive loading on PC4 (56.8%). Moreover, PC5 (66.8%) was associated with Cd (0.73) and Pb (0.75). The relations among the heavy

metals based on the first three PCs are presented in Fig. 2a. These results might suggest pollution arises from common origins or similar geochemical behavior of these metals (31).

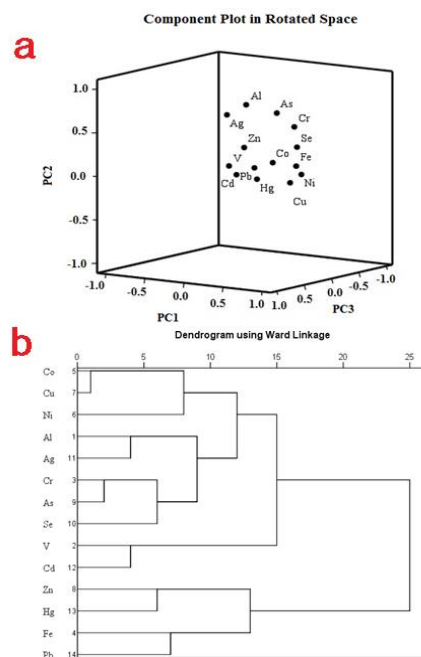


Figure 2. (a) A loading plot of three PCs of heavy metals and (b) dendrogram obtained from hierarchical cluster analysis of the 14 heavy metals in eight fish species.

Table 5. Varimax rotated loadings and communalities for the fish meats (n=91)

Component						Communalities
	1	2	3	4	5	(h ²)
Al	0.071	0.793	0.077	-0.064	-0.001	0.644
V	0.256	0.192	0.654	-0.321	0.255	0.698
Cr	0.566	0.564	-0.098	-0.057	0.310	0.747
Fe	0.044	-0.053	-0.877	-0.072	0.112	0.792
Co	0.693	0.249	0.479	0.040	0.170	0.802
Ni	0.694	0.037	-0.044	-0.053	0.093	0.496
Cu	0.762	-0.007	0.260	0.169	-0.091	0.685
Zn	-0.073	0.263	-0.093	0.763	0.130	0.682
As	0.386	0.713	-0.033	0.131	0.063	0.680
Se	0.567	0.323	-0.145	0.053	-0.210	0.494
Ag	-0.032	0.696	0.280	0.204	-0.058	0.609
Cd	0.090	0.021	0.281	-0.218	0.734	0.674
Hg	0.181	-0.057	0.036	0.755	-0.083	0.614
Pb	-0.069	0.003	-0.274	0.299	0.752	0.735
Eigenvalue	3.68	1.84	1.37	1.31	1.15	
% of variance	17.6	15.9	12.7	10.7	10.0	
Cumulative %	17.6	33.4	46.1	56.8	66.8	

Bold numbers represent significant loading values (≥ 0.479)

In general, anthropogenic inputs from agricultural and industrial practices, such as pesticides and chemical fertilizers, wastewater irrigation, and residues from metalliferous mining, increase the contamination levels of toxic metals such as Hg Zn, Cd, and Pb in surface waters. Fish meats collect Hg due to feeding and could be affected by the size and diet of fish, ecological factors, and water quality parameters (5, 7, 15, 16, 32, 33).

3.5. Cluster analysis

In this study, heavy metals detected in fish muscle tissue samples were categorized into two main clusters and four subclusters, as shown in a dendrogram (Fig. 2b). Cluster 1 revealed the high association of Co-Cu, Al-Ag, Cr-As, and V-Cd pairs, while Cluster 2 demonstrated the relation of Zn-

Hg and Fe-Pb. These results indicated that the pollution with metal pairs analyzed might be from similar sources. These clusters show similarity with PCA results on the origins of metals for fish muscles.

4. Conclusions

The current study's results demonstrate that the order of mean concentrations (mg kg⁻¹ wet wt.) of the metals in fish muscle samples were Al>Zn>Fe>Cu>Hg> Ni>Pb>Cr>Ag> Se>As>Co>Cd>V. Based on the results, in some fish samples, the levels of some toxic elements (Hg, Cd, and Pb) were higher than permitted legal limits. It can be stated that element content in the examined fish species varies from each other. This might be related to environmental and agronomic circumstances and versatility exposure to

pollution. The correlation, PCA, and cluster analysis results indicated that the metal bioaccumulation varied between fish sizes and species, and heavy metal pollution in fish might be caused by the same environment or similar geochemical behavior of metals. These fish might be a significant concern to human consumption due to their toxicological effects. Therefore, establishing standardized monitoring systems for determining heavy metal content in fish and fishery products are needed to protect consumer health.

Funding: This study was funded by the Scientific Research Project Unit of Erciyes University, Türkiye (Grant No. TSA-2018-7757).

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of Interest.

Consent to Participate: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Consent for Publication: The participants have consented to the submission of the interview results to the journal.

References

- de Santana CO, de JesusTB, de AguiarWM, Franca WDJS, Soares CAC. Trace elements in muscle of three fish species from Todos os Santos Bay, Bahia State, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 2017; 189: 123. doi: 10.1007/s10661-017-5801-1.
- Keshavarzi B, Hassanaghaei M, Moore F, Mehr MR, Soltanian S et al. Heavy metal contamination and health risk assessment in three commercial fish species in the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 2018; 129: 245-252. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.032.
- Sankar TV, Zynudheen AA, Anandan R, Nair PV. Distribution of organochlorine pesticides and heavy metal residues in fish and shellfish from Calicut region, Kerala, India. *Chemosphere* 2006; 65: 583-590. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.02.038.
- Rahman MS, Molla AH, Saha N, Rahman A. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chemistry* 2012; 134: 1847-1854. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.099.
- Arulkumar A, Paramasivam S, Rajaram R. Toxic heavy metals in commercially important food fishes collected from Palk Bay, Southeastern India. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 119: 454-459. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.03.045.
- Gu YG, Lin Q, Huang HH, Wang LG, Ning JJ, Du FY. Heavy metals in fish tissues/stomach contents in four marine wild commercially valuable fish species from the western continental shelf of South China Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 114: 1125-29. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.040.
- Velusamy A, Kumar PS, Ram A, Chinnadurai S. Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India. *Marine Pollution Bulletin* 2014; 81: 218-224. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.049.
- Ikem A, Egiebor NO. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis* 2005; 18: 771-787. doi: 10.1016/j.jfca.2004.11.002.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* 2012; 133-164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Li J, Sun C, ZhengL, Jiang F, Wang S, Zhuang Z, Wang X. Determination of trace metals and analysis of arsenic species in tropical marine fishes from Spratly islands. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 122: 464-469. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.017.
- Mensoor M, Said A. Determination of heavy metals in freshwater fishes of the Tigris River in Baghdad. *Fishes* 2018; 3(2): 23. doi:10.3390/fishes3020023.
- da Silva DLF, da Costa MAP, Silva LOB, dos Santos WNL. Simultaneous determination of mercury and selenium in fish by CVG AFS. *Food Chemistry* 2019; 273: 24-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.020.
- Uysal K, Emre Y, Köse E. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin, and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchemical Journal* 2008; 90(1): 67-70. doi: 10.1016/j.microc.2008.03.005.
- Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Nematollahi A, Jafari T. Comparative study of heavy metal and trace element accumulation in edible tissues of farmed and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using ICP-OES technique. *Microchemical Journal* 2011; 98(2): 275-279. doi: 10.1016/j.microc.2011.02.007.
- Zhong W, Zhang Y, Wu Z, Yang R, Chen X et al. Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2018; 157: 343-349. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.048.
- Zuliani T, Vidmar J, Drinčić A, Ščančar J, Horvat M, Nečemer M et al. Potentially toxic elements in muscle tissue of different fish species from the Sava River and risk assessment for consumers. *Science of the Total Environment* 2019; 650: 958-969. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.083.
- Coelho I, Matos AS, Teixeira R, Nascimento A, Bordado J et al. Combining multielement analysis and chemometrics to trace the geographical origin of Rocha pear. *Journal of Food Composition and Analysis* 2019; 77: 1-8. doi: 10.1016/j.jfca.2018.12.005.
- Yıldırım G, Tokaloğlu S. Heavy metal speciation in various grain sizes of industrially contaminated street dust using multivariate statistical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016; 124: 369-376. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.006.
- Carvalho ML, Santiago S, Nunes ML. Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 382: 426-432. doi:10.1007/s00216-004-3005-3.
- EFSA (European Food Safety Authority) Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Scientific Committee on Food Scientific Panel On Dietetic Products, Nutrition And Allergies, 2006.
- Turkish Food Codex (TFC). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 2022.

22. European Union (EU). Commission Regulation (EC) No. 629/2008. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L 173/6 2008.
23. World Health Organization (WHO). Joint FAO/WHO food standards programme Codex committee on contaminants in foods. Fifth session. The Hague, the Netherlands 2011.
24. Bilandžić N, Sedak M, Čalopek B, Đokić M, Varenina I et al. Element contents in commercial fish species from the Croatian market. *Journal of Food Composition and Analysis* 2018; 71: 77-86. doi: 10.1016/j.jfca.2018.02.014.
25. World Health Organization (WHO). Agents classified by the Iarc Monographs, vols 1-122. Resource document. International Agency for Research on Cancer (IARC) 2015.
26. Klaassen, CD. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. Seventh Edition. New York: McGraw-Hill: Medical Publishing Division, 2013.
27. Shakeri A, Fard MS, Mehrabi B, Mehr MR (2020). Occurrence, origin and health risk of arsenic and potentially toxic elements (PTEs) in sediments and fish tissues from the geothermal area of the Khiav River, Ardebil Province (NW Iran). *Journal of Geochemical Exploration* 2020; 208: 106347. doi: 10.1016/j.gexplo.2019.106347.
28. Okati N, Moghadam MS, Einollahipeer F. Mercury, arsenic and selenium concentrations in marine fish species from the Oman Sea, Iran, and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2021; 13(1): 25-36. doi:10.1007/s13530-020-00062-6.
29. EFSA. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methyl mercury in food. *EFSA J* 2012; 10 (12) :2985. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2985.
30. Yi YJ, Zhang SH. The relationships between fish heavy metal concentrations and fish size in the upper and middle reach of Yangtze River. *Procedia Environmental Sciences* 2012; 13: 1699-1707. doi: 10.1016/j.proenv.2012.01.163.
31. Zhang D, Zhang X, Tian L, Ye F, Huang X et al. Seasonal and spatial dynamics of trace elements in water and sediment from Pearl River Estuary, South China. *Environmental Earth Sciences* 2013; 68(4): 1053-1063. doi:10.1007/s12665-012-1807-8.
32. Soltani N, Moore F, Keshavarzi B, Sharifi R. Geochemistry of trace metals and rare earth elements in stream water, stream sediments and acid mine drainage from Darrehzar Copper Mine, Kerman, Iran. *Water Quality, Exposure and Health* 2014; 6(3): 97-114. doi:10.1007/s12403-014-0114-x.
33. Filipiak-Szok A, Kurzawa M, Szłyk E. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2015; 54-58. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.10.008.



Ülkelere Göre Kuduz Karantina Tedbirleri ve Uygulanan Protokollerin Karşılaştırılması

Öykü SARGIN¹✉, Utku BAKIREL¹, Mehmet Erman OR¹

¹Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul/TÜRKİYE

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 25.04.2023

◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 16.06.2023

◆ **Yayın Tarihi/Published:** 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Sargin Ö, Bakirel U, Or ME. Ülkelere Göre Kuduz Karantina Tedbirleri ve Uygulanan Protokollerin Karşılaştırılması. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):37-41.

Özet: Kuduz; *Rhabdoviridae* familyasından lyssavirusun yol açtığı merkezi sinir sistemini etkileyen ve ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır. Hastalığın kontrolü amacıyla, hastalık kaynağının saptanması ve yayılmasının önlenmesi, kuduz şüpheli hayvanlarda karantina önlemlerinin alınması gereklidir. Çeşitli ülkelerde kuduz eradike edilmiştir, ancak bazı ülkelerde kuduz endemik olarak görülmektedir. Dünyada, kedi köpek gibi evcil hayvanlardan bulaş oranının ülkelerde farklı olmasından dolayı, hayvan sahipleriyle birlikte kedi ve köpeklerin seyahatlerinde uygulanan protokoller ve alınan karantina tedbirleri, kuduzun yayılmasını önlemede yüksek öneme sahiptir. Kuduz eradike ülkelerde katı bir biçimde uygulanan bu protokoller, hastalığın sık görüldüğü ülkelerde ne yazık ki yeterli derecede uygulanmamaktadır. Bu derlemede, ülkelerarası evcil hayvan transferinde uygulanan protokollerinin ve karantina önlemlerinin, ülkelerin kuduz açısından risk düzeylerine ve yapılan farklı uygulamalara göre incelenmesi ve ülkemiz ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kuduz, Kuduz karantina tedbirleri, Kuduz protokolleri, Kuduz titrasyon testi

Comparison of Rabies Quarantine Measures and Protocols Applied by Countries

Özet: Rabies is a disease caused by lyssavirus from the *Rhabdoviridae* family that affects the central nervous system and results in death. In order to control the disease, it is necessary to identify the source of the disease and prevent its spread, and to take quarantine measures in animals suspected of rabies. Rabies has been eradicated in various countries, but rabies is endemic in some countries. Since the rate of transmission from domestic animals such as cats and dogs is different around the world, the protocols and quarantine measures taken during the travel of cats and dogs with animal owners are of high importance in preventing the spread of rabies. These protocols, which are strictly implemented in rabies eradicated countries, are unfortunately not adequately implemented in countries where the disease is common. In this review, it was aimed to examine the protocols and quarantine measures applied in inter-country animal transfer according to the risk levels of the countries in terms of rabies and different practices and to compare them with our country.

Keywords: Rabies, Rabies quarantine measures, Rabies protocols, Rabies titration test

1.Giriş

Kuduz; *Rhabdoviridae* familyasından *Lyssavirus* 'un yol açtığı, beyni ve omuriliği (merkezi sinir sistemi) etkilediği için ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır (1). İnsan, kedi, köpek, yabani hayvanlar ve çiftlik hayvanları dahil bütün memelileri etkileyebilen zoonotik bir hastalıktır. En önemli bulaş yolu özellikle evcil hayvanlardan köpek gibi enfekte hayvanların ısırmasıdır (2).

Bulaşma, hasta hayvan tarafından ısırılma, çizilme ya da bütünlüğü bozulan mukoz membranlardan salıyla olur (3).

Kuduz hastalığı, çok çeşitli türlerden bulaşmasına ve asla tüm türlerden eradike edilememesine rağmen, dünya çapında insan vakalarının büyük çoğunluğundan sorumlu olan ve en büyük halk sağlığı endişesi olan köpek kuduzunu ortadan kaldırmak mümkündür (4, 5).

Zoonoz hastalıklarda olduğu gibi, hastalığın kontrolünün sağlanması için, etkili denetim sistemleri, vakaların erken tespitine ve raporlanmasına olanak tanıyarak zamanında

müdahale başlatılması ve kontrol çabalarının ne zaman ve nerede yoğunlaştırılacağına dair bilinçli kararlar alınması açısından hayati önem taşımaktadır (6). Sanayileşmiş ülkelerin çoğu evcil köpek popülasyonlarından kuduzu elimine etmiştir. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkelerin çoğunda, kuduz evcil köpek popülasyonlarında endemik olmaya devam etmekte ve kötü bir şekilde kontrol edilmektedir (7).

İngiltere, İrlanda, İsveç, Norveç, İzlanda, Japonya, Avustralya, Yeni Zelanda, Singapur, Malezya'nın çoğu bölgesinde uzun yıllardır kuduz vakası görülmemiştir. Ancak örneğin Hindistan'da, 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada sokak hayvanları tarafından ısırılma vakaları sonucu yıllık olarak 20.000 insan ölümü görüldüğü saptanmıştır (8). Dünya genelinde, ülkeler arası hem insan hem de kedi köpek popülasyonunda kuduz görülme sıklığının bu kadar farklı olmasından dolayı, hayvan sahipleriyle birlikte kedi ve köpeklerin seyahatlerinde uygulanan protokoller ve karantina önlemleri, kuduzun yayılmasını önlemede büyük önem taşır. Bu derlemede,

ülkelerarası hayvan transferinde uygulanan protokollerinin ve karantina önlemlerinin, ülkelerin kuduz açısından risk düzeylerine ve yapılan farklı uygulamalara göre incelenmesi ve ülkemiz ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.Kuduz eradike veya kuduz kontrolü sağlanmış ülkelerin protokolleri

Kuduz vakalarının kontrolünü sağlayan ülkelerden İngiltere’de “Pet Travel Scheme” (PETS) yönetmeliği uygulanmaktadır. PETS adı verilen düzenlemeyle birlikte başta kuduz olmak üzere ülkeye girebilecek çeşitli hastalıklara karşı, pet hayvanının geldiği ülkeye göre standartlar belirlenmiştir. Karantina önlemleri azaltılmış, giriş için talep edilen belgeler arttırılmıştır.

PETS yönetmeliği öncesi zorunlu tutulan 6 aylık karantina önlemi, 2000 yılında kaldırılmıştır (9). Yönetmelikte bulunan uygulama gereği, Avrupa birliği pet pasaportu veya Avrupa birliği üyesi olmayan ülkeler için veteriner hekim onaylı pasaport zorunludur. Pasaportun yanı sıra, pet hayvanına kuduz aşısının uygulanmış olması ve kuduz titre testinin bulunması gerekmektedir, bu koşulları sağlaması durumunda karantina uygulamasına tabii tutulmadan ülkeye giriş yapılabilir (10).

Vaka sayısını azaltmak ve kuduz-enzootik ülkelerden Avrupa’ya kuduz hayvan girişini engellemek için 576/2013 sayılı yönetmelik (AB), sahibinin yanında bulunan ve doğrudan sorumluluğu altındaki bir evcil hayvanın ticari olmayan hareketini düzenlemektedir (11).

Kuduz hastalığına karşı aşılama, evcil hayvan (köpek, kedi ya da yaban gelinciği), 576/2013 sayılı Tüzüğün (AB) Ek III’üne göre yetkili bir veteriner hekim tarafından kuduz karşı aşılanmalıdır. Hayvan, aşı uygulandığı tarihte en az 12 haftalık olmalıdır. Aşılanmanın geçerlilik süresi, birincil aşılama için aşılama protokolünün tamamlanmasından en az 21 gün sonra başlar ve sonraki aşılama, aşılanmanın geçerlilik süresi içinde gerçekleştirilir (12).

İngiltere’de uygulanan karantina tedbirleri, iki kısım olarak ayrılır. İlk kısımda, İngiltere sınırlarından giriş yapan her pet hayvanı için uygulanan 6 aylık karantina önlemi vardır, PETS uygulamasıyla birlikte, karantina önlemi tüm kriterleri karşılaması koşuluyla zorunlu tutulmamaktadır (13).

Bu kriterler ise, ülkeye giriş yapacak söz konusu pet hayvanlarının aşılanmış, mikroçipli ve serolojik testlerin uygulanmış olması şartlarını kapsar.

Evcil hayvan (köpek, kedi ya da yaban gelinciği), 576/2013 sayılı Yönetmeliğin Ek IV’üne göre bir kuduz antikor titrasyon testine tabi tutulmalıdır. Test, yetkili bir veteriner hekim tarafından, aşı tarihinden en az 30 gün sonra ve

hareket tarihinden en az üç ay önce toplanan bir örnek üzerinde yapılmalıdır. Test, kuduz virüsüne karşı 0,5 IU / ml’ye eşit veya daha büyük serumda nötralize edici bir antikor düzeyini ölçmelidir. Test onaylanmış bir laboratuvarında yapılmalıdır. Sağlık Sertifikası ve Beyanamesi; resmi bir veteriner hekim tarafından tamamlanmış ve yayınlanmış ve daha sonra yetkili makam tarafından onaylanmıştır. Transponder (mikroçip) veya dövmede bulunan alfa-sayısal kodunu, kuduz karşı aşılama ayrıntılarını, kan örneklerinin ayrıntılarını belgelemelidir (14).

Eradike ülkeler arasında bulunan İsveç ve Norveç’te uzun süredir kuduz vakası görülmemiştir; İsveç, doğal coğrafik sınırları ve katı protokolleri sayesinde 1886 yılından beri kuduz eradikedir (15). Belirtilen ülkelere girişte kuduz aşılması, kuduz aşılama belgesi, kuduz antikor titresi zorunlu tutulmaktadır.

Kuduz eradike olarak kabul edilen bir diğer ülke Japonya’da, 1950 yıllarından itibaren kuduz vakası görülmemiştir. En sıkı kuduz protokollerini uygulayan ve zorunlu tutan ülkelerden biridir. Ülkede uygulanan toplu aşılama, köpek hareketlerini kısıtlamanın yanı sıra, ülkeye giriş protokollerinin büyük etkisi olmuştur. Ülkeye girişte 30 gün arayla en az 2 doz kuduz aşısı uygulaması, kuduz antikor titresi, aşılama dair belgeler zorunlu tutulmaktadır (16).

Amerika’da, kuduz vakaları nadiren görülmektedir ve önemli ölçüde yaban hayvan kaynaklıdır. Köpek kaynaklı kuduz vakaları ise eradike edilmiştir. Ülkeye girişte, yüksek risk görülen ülkelerden 3 aylıktan büyük köpeklerin kuduz aşısının yapıldığına dair belge istenmektedir. 3 aylıktan küçük hayvanlar ve bazı özel koşullar için ise, ülkeye girdikten sonra, koşullar sağlandıktan sonra aşı yapılması beklenmektedir. Kuduz aşısı yapılmayan bazı hayvanların ülkeye girişi özel izinler ve belgelerle sağlanabildiğinden, dönem dönem ülkeye kuduz vakası girişine neden olabilmektedir. Risk grubunda görülmeyen ülkeler için kuduz aşısı belgesi koşulu aranmamaktadır (17). 2019 yılından itibaren “Amerikan hastalık kontrolü ve önlenmesi merkezleri” (CDC) kararı ile Amerika’ya Mısır’dan köpek girişi, belirtilen kurumun onayı olmadığı sürece yasaklanmıştır (18).

Meksika, Dünya Sağlık Örgütü tarafından kuduzla yönelik uyguladığı protokoller ve önlemler sonucu takdir toplamıştır ve artık bu ülkede kuduz, halk sağlığı sorunu olarak görülmemektedir. Ülkeye girişte, 3 aylıktan büyük hayvanların kuduzla karşı aşılanmış olduğunu gösteren belgeler gerekmektedir (19).

3.Kuduz kontrolü sağlanamamış, yüksek riskli ülkelerin protokolleri

CDC tarafından kuduz riskli görülen ülkeler; Afrika ülkeleri, Ortadoğu ve Asya bölgesi, Karayipler, Doğu Avrupa ülkelerinin birçoğunu kapsamaktadır (20).

Bu kategoride yer alan ülkelerin bir kısmında kuduzla yönelik protokol bulunmazken, bazılarında ise hastalığın kontrolü için belirlenen protokoller CDC tarafından yetersiz görülmektedir. Kuduz vakalarının farklı oranlarda görülmesi nedeniyle, kuduz kontrolünün sağlandığı ülkelere giriş koşulları, ülkelere göre farklılık içermektedir (21).

Kuduz enzootik bölgeler içine dahil olan İsrail, Avrupa ve Amerika gibi ülkelere seyahatte, kuduz aşısı, kuduz titresi, sağlık sertifikası zorunluluklarını yerine getirmekle yükümlüdür.

Seyahat eden köpeklerin kuduz titresi $\geq 0,5$ IU / ml olmalıdır. İsrail Veterinerlik Hizmetleri ve Hayvan Sağlığı'nın (IVSAH) bir parçası olan Kimron Veteriner Enstitüsündeki Ulusal Kuduz Laboratuvarı, 2004 yılından beri serolojik testleri gerçekleştirmektedir. İsrail'de mikroçip uygulaması zorunludur ve mikroçiple kimlik tespiti, merkezi bir veri tabanına kayıt yaptırılması ve geçen yıl boyunca kuduzla karşı aşılanmasını gerektirir (22).

Çin'de, ulusal çapta köpeklere kuduz aşılması 2008 yılında başlatılmıştır. Ülkede kuduzun 2020 yılına kadar öncelikli risk grubuna alınması dolayısıyla, önlemler ve protokoller üzerine çalışılmaktadır (23).

Kuzey ve Güney Afrika, köpeklerde sık görülmesinin yanı sıra, insanlarda da kuduz vakalarının çok sık görüldüğü ülkeler kategorisindedir. Bu ülkelerde düzenli kuduz aşılması evcil hayvanlarda da yabancı hayvanlarda da sağlanamamıştır. Dünya sağlık örgütü (WHO), bu bölgelerde düzenli kuduz aşısı uygulamasına ve sokak hayvanlarının kontrolüne yönelik çalışmalar yapmaktadır. Kuduz eradike ülkeler için risk oranı yüksek olmasından dolayı, hayvanlarda protokollere uyulsa bile, insan girişinde uygulanan protokollerin (Şüpheli ısırılma vakaları sonrası profilaktik aşılanma, bu bölgelere seyahat öncesi aşılanma) yetersiz olmasından dolayı kuduz kontrolü sağlanan ülkelere Afrika ülkelerinden kaynaklanan vakalara rastlanmaktadır (24).

Ülkemizde kuduz hastalığı, bildirim Zorunlu Grup A Hastalıkları içinde yer almaktadır (18). Türkiye Köpek aracılı kuduz vakalarının devam ettiği Avrupa ülkelerinden biridir. Yapılan bir çalışmada, Ocak 2007-Şubat 2009 tarihleri arasında Şanlıurfa merkezde bulunan üç ayrı hastanenin acil servisine hayvan ısırıkları ve temasları nedeniyle 742 olgunun başvurduğu saptanmıştır (25). 2002

ve 2003 yıllarında birer, 2004 yılında iki ve 2005 yılında sıfır olgu bildirilmiştir (24). Sağlık bakanlığının belirlediği ve kamuoyuna açıkladığı 2008-2017 yıllarını kapsayan vaka sayıları baz alındığında, 2017 yılında insanda yalnızca bir vaka saptanmıştır, ancak temas sayısı 246 bin olarak bildirilmiştir. Ülkemiz halen kuduz yönünden endemik bir bölgedir. Yılda yaklaşık 250.000 kuduz riskli temas bildirimi yapılmaktadır ve yılda ortalama 1-2 kuduz vakası görülmektedir. Sağlık bakanlığının belirlediği ve kamuoyuna açıkladığı 2008-2017 yıllarını kapsayan vaka sayıları baz alındığında 2017 yılında yalnızca bir vaka saptanmıştır ancak temas sayısı 246 bin olarak bildirilmiştir (26). Artan kuduz teması sayısı ve vakaları sonucu 2019 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından kuduz profilaksi rehberi yayınlanmıştır. Ülkemize girişte kuduz hastalığına yönelik koruyucu önlemler yeterli gelmemektedir. Türkiye'den Avrupa, Japonya gibi kuduz protokollerinin uygulandığı ülkelere geçişte; ülkeler arası değişiklik göstermekle birlikte, mikroçip uygulamaları, kuduz aşısı uygulaması, kuduz titrasyon testi ve sağlık sertifikası uygulamaları zorunlu tutulmaktadır. Amerikan hastalık kontrolü ve önlenmesi merkezleri (CDC) artan vakalar nedeniyle Türkiye'yi yüksek riskli ülkeler kapsamına almıştır ve belirsiz süreyle hayvan girişini yasaklamıştır.

4.Sonuç

Kuduz hastalığı, protokollerin yetersiz olması nedeniyle birçok ülkede eradike edilememiştir. Dünya genelinde, özellikle 3. dünya ülkelerinde kuduz kaynaklı insan ve pet hayvanı ölümleri sıklıkla görülmektedir. Kuduzun önlenmesinde, ülkede uygulanan önlemlerin yanı sıra ülkeler arası pet hayvanlarının, sahipleriyle birlikte ülkeler arası seyahatinde uygulanması gereken protokoller önem arz etmektedir.

Ülkemizde kuduzla karşı aşılanma, aşı bilgilerini barındıran pet pasaportu, mikroçip, kuduz antikor titrasyon testi gibi tedbirleri barındıran çeşitli protokoller uygulanmaktadır. Türkiye'den yurtdışına sahipleriyle birlikte seyahat eden kedi ve köpeklerde yapılan titrasyon test sonuçları, %92,6 yüksek titrasyon oranı ile, başvuran hayvan sahiplerinin evcil hayvanlarında kuduzla karşı koruyucu titrasyonun sağlandığını göstermektedir (27). Kedi ve köpeklerin ülkemize giriş ve çıkış süreçlerinde, kuduz kontrol ve önlemlerinin etkili olmasına rağmen kuduz vakalarının ülkemizde eradike edilememesi, özellikle sokak köpeklerinden bulaşım çok olması olarak yorumlanmıştır (28).

Kaynaklar

1. Tordo N, Tumpey A, Wandeler A, Briggs DJ. Renewed Global Partnerships and Redesigned Roadmaps for Rabies Prevention and Control 2011. doi: 10.4061/2011/923149.
2. Warrell MJ, Warrell DA. Rabies and other lyssavirus diseases 2004; 363(9413): 959-969. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15792-9.
3. Manning SE, Rupprecht CE, Fishbein D, Hanlon CA, Lumlertdacha B, et al. Human rabies prevention—United States, 2008: recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Recomm Rep* 2008; 57(RR-3): 1-28.
4. Rupprecht CE, Barrett J, Briggs D, Cliquet F, Fooks AR, et al. Can rabies be eradicated? *Developments In Biologicals* 2008; 131: 95-121. doi: 10.1093/heapol/7.3.279.
5. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fèvre EM, Meltzer MI, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; 83: 360-368. doi: 10.1186/14752875-83-360.
6. Cutts FT, Waldman RJ, Zoffman HM. Surveillance for the Expanded Programme on Immunization. *Bulletin of the World Health Organization* 1993; 71(5): 633.
7. Coleman PG, Fèvre EM, Cleaveland S. Estimating the public health impact of rabies. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10: 1400-1406. doi: 10.3201/eid1001.020744.
8. Madhusudana SN. Rabies: An ancient disease that still prevails. *Indian Journal of Medical Research* 2005; 4.
9. Fooks AR. Keeping rabies out by surveillance strategies, vaccination and serology. Southern And Eastern African Rabies Group/World Health Organization 2001.
10. Ramnial V, Kosmider R, Aylan O, Freuling C, Müller T, et al. Quantitative risk assessment to compare the risk of rabies entering the UK from Turkey via quarantine, the Pet Travel Scheme and the EU Pet Movement Policy. *Epidemiology & Infection* 2010; 138(8): 1114-1125. doi: 10.1017/S0950268809991221.
11. Wasniewski M, Laurentie M, Rizzo F, Servat A, Aubert M, et al. Proficiency test for rabies serology: A design complying with international standards for a reliable assessment of participating laboratories. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2019; 13(12): e0007824. doi: 10.1371/journal.pntd.0007824.
12. Pavlíková B. Obligations Related to the Transportation of pet Animals (Eu Legislation)/Povinnosti Súvisiace Prepravou Spoločenských Zvierat (Európska Legislatíva). *EU Agrarian Law* 2015; 4 (1): 28-32. doi: 10.1515/eual-2015-0004.
13. Banyard C, Hartley M, Fooks A. "Reassessing the risk from rabies: a continuing threat to the UK? *Virus Research* 2010; 79-84. doi: 10.1016/j.virusres.2010.06.007.
14. Fooks AR, McElhinney LM, Brookes SM, Johnson N, Keene V, et al. Rabies antibody testing and the UK Pet Travel Scheme. *Veterinary Record* 2002; 150(14): 428-430.
15. Grandien M, Engvall A. Quarantine to be abolished for dogs and cats. New regulations for import of pets from EU/EFTA countries. *Lakartidningen* 1994; 91 (5): 373-374.
16. Kurosawa A, Tojinbara K, Kadowaki H, Hampson K, Yamada A, et al. The rise and fall of rabies in Japan: A quantitative history of rabies epidemics in Osaka Prefecture, 1914–1933. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017; e0005435. doi: 10.1371/journal.pntd.0005435.
17. McQuiston JH, Wilson T, Harris S, Bacon RM, Shapiro S, et al. Importation of dogs into the United States: risks from rabies and other zoonotic diseases. *Zoonoses and Public Health* 2008; 55(8-10): 421-426. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01117.x.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Notice of temporary suspension of dogs entering the United States from Egypt. *Fed Regist* 2019; 84: 20628-20632. doi: 10.15585/mmwr.mm6938a5.
19. Lucas CH, Pino FV, Baer G, Morales PK, Cedillo VG, et al. Rabies control in Mexico. *Developments In Biologicals* 2008; 131: 167-175.
20. Lankau EW, Cohen NJ, Jentes ES, Adams LE, Bell TR., et al. Prevention and Control of Rabies in an Age of Global Travel: A Review of Travel-and Trade-Associated Rabies Events—United States, 1986–2012. *Zoonoses and Public Health* 2014; 61(5): 305-316. doi: 10.1111/zph.12071.
21. Yakobson B, Taylor N, Dveres N, Rotblat S, Spero Ž, et al. Impact of rabies vaccination history on attainment of an adequate antibody titre among dogs tested for international travel certification, Israel–2010–2014. *Zoonoses and Public Health* 2017; 64(4):281-289. doi: 10.1111/zph.12309.
22. Yin W, Dong J, Tu C, Edwards J, Guo F, et al. Challenges and needs for China to eliminate rabies. *Infectious Diseases Of Poverty* 2013; 2(1): 1-10. doi: 10.1186/2049-9957-2-23.
23. Dodet B, Bureau ARE, Adjogoua EV, Agumon AR, Amadou, et al. Fighting rabies in Africa: the Africa rabies expert bureau (AfroREB) 2008; 26(50): 6295-6298. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.087.
24. Nesanır, N. Türkiye'de henüz çözülemeyen bir sorun: Kuduz riskli temas olguları. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 2006; 15 (12): 202-206.
25. Söğüt Ö, Sayhan MB, Gökdemir MT, Kara HP. Türkiye'nin Güneydoğusunda önlenbilir bir halk sağlığı sorunu: kuduz riskli temas olguları. *Akademik Acil Tıp Dergisi* 2011; 10 (1): 14-17. doi: 10.5152/jaem.2011.004.
26. Aylan, O. TC Sağlık Bakanlığı Kuduz Profilaksi Rehberi 2019.
27. Nil Ü, Aylan O, Ün H., Freuling C, Müller T. Köpek ve Kedilerde Kuduz Antikor Titre Tayininin Retrospektif Değerlendirilmesi. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2012; 23 (1): 15-22.
28. Johnson N, Un H, Fooks AR, Freuling C, Müller T, Aylan O, et al. Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. *Epidemiology & Infection* 2010;138(3):305-312. doi:10.1017/S0950268809990963.



Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesinin Kolostrum Üzerindeki Etkileri Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesi

 Soner UYSAL¹✉

¹ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received:04.05.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 23.05.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Uysal S. Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesinin Kolostrum Üzerindeki Etkileri Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesi.Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):41-44.

Özet: Kolostrum, doğuma yakın dönemde meme bezleri tarafından üretilerek doğumdan sonra meme bezlerinden salgılanan ilk sıvıdır. Ruminant hayvanlarda plasantanın yapısı gereği büyük molekül yapısına sahip immunoglobulinlerin plasantadan geçişine izin verilmemektedir. Bu sebeple diğer ruminantların yavruları gibi kuzular da agammaglobulinemik olarak doğmaktadır. Kuzular, steril uterus ortamından doğumla birlikte mikrobiyal yüklü ortama geçişlerinde bu enfeksiyon etkenlerinden korunmak için kolostrum tüketmiş olmaları gerekmektedir. Bu sebeple yaşamın ilk 15 dk ile 24 saat kuzuların yeterli miktar ve kalitede kolostrum almaları hayati önem taşımaktadır. Kuzuların yaşamlarında bu kadar önemli olan kolostrumun içeriği ve miktarı gebelik döneminde annenin beslenmesinden etkilenmektedir. Bu derlemenin amacı koyunlarda gebelik döneminde yapılan besleme uygulamalarının kolostrum üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır.

Anahtar Kelimeler: Beslenme, Gebe koyun, Kolostrum, Kuzu sağlığı

Effects of Pregnancy Feeding on Colostrum in Ewes Pregnancy Feeding in Ewes

Abstract: Colostrum is the first fluid produced by the mammary glands near birth and secreted from the mammary glands after birth. Due to the structure of the placenta in ruminant animals, substances with a large molecular structure such as immunoglobulin are not allowed to pass through the placenta. For this reason, lambs, like the offspring of other ruminants, are born with agammaglobulinemia. Lambs must have consumed colostrum in order to be protected from these infectious agents during their transition from sterile uterine environment to microbial loaded environment at birth. For this reason, it is vital that lambs receive colostrum in sufficient quantity and quality in the first 15 minutes to 24 hours of life. The content and amount of colostrum, which is so important in the lives of lambs, is affected by the mother's nutrition during pregnancy. The aim of this review is to reveal the effects of feeding practices during pregnancy on colostrum in ewes.

Keywords: Nutrition, Pregnant ewes, Colostrum, Lamb health

1.Giriş

Kolostrum, doğumdan hemen sonra meme bezinden salgılanan ilk maddedir ve organoleptik yapısı, yoğunluğu, rengi ve kimyasal bileşimi bakımından süttten farklıdır. Kolostrum, immünoglobülinin (Ig) doğum sonrası dönemde sınırlı bir süre için annenin kan dolaşımından meme salgılarına aktarıldığı kolostrogenез ile üretilir (1). Ruminant hayvanlarda gebeliğin son döneminde yapılan besleme sentezlenecek olan kolostrumun miktar ve kalitesi üzerine etki göstermektedir (2).

Koyunlarda meme bezlerinin gelişiminin büyük bir kısmı gebeliğin son ayında gerçekleşmektedir. Özellikle doğumdan önceki haftada meme bezlerinin boyutu belirgin şekilde artar ve bu büyüme laktogenezin başlangıcında yoğun kolostrum sentezine eşlik eder. Hem meme bezlerinin büyümesi hem de meme hücrelerinin farklılaşması gebeliğin sonlarında annenin beslenmesinden oldukça fazla bir şekilde etkilenmektedir (3). Bu sebeple koyunlarda yeterli meme

gelişimi ve yeterli düzeyde kolostrum sentezi için özellikle gebeliğin sonlarında yapılan besleme uygulamaları büyük önem taşımaktadır. Gebelik döneminde yapılan yetersiz besleme sentezlenen kolostrum miktarını azaltabilmekte, doğum öncesi ve sonrası sentezlenen kolostrumun viskozitesini değiştirebilmekte ve süt üretiminin başlangıcını geciktirebilmektedir (4).

Bu makalenin amacı, kuzu sağlığında önemli bir yeri olan kolostrum kalitesine koyunlarda gebelik döneminde yapılan besleme uygulamalarının etkisini ve kolostrum kalitesini iyileştirebilmek için yapılabilecek uygulamaları değerlendirmektir.

Gebelik dönemi beslemenin kolostrum sentezine etkisi

Koyunlarda doğuma yakın süreçte memede biriken kolostrum miktarı, gebeliğin sonunda yapılan besleme, yavru büyüklüğü ve annenin vücut kondiyon skoruna (VKS) bağlıdır. Bu faktörler gebeliğin devamını sağlayan

progesteron hormonu ile yakından ilişkilidir. Progesteron düzeyi gebelik döneminde yüksek olup, gebeliğin ikinci yarısında büyük çoğunlukla plasenta tarafından üretilmektedir. Progesteron hormonu hem laktasyonun başlamasını hem de doğumu engeller. Gebeliğin son haftasında ise progesteron seviyesi düşer östrojen seviyesi yükselir. Progesteron/östrojen oranında meydana gelen bu değişiklik, doğumun başlangıcını belirleyen etmenlerin başında gelir. Çünkü progesteron ve östrojen uterusun prostoglandin, katekolamin ve oksitosine duyarlılığı üzerine zıt etki göstermektedir. Yetersiz beslenme durumunda progesteronun metabolizmadan uzaklaştırılması gecikebilmektedir. Bu gecikme hayvanın besin madde ihtiyaçlarının karşılanması ile giderilebilmektedir (3,5,6). Progesteron seviyesinin düşüş hızı birkaç faktöre bağlı olmakla birlikte progesteronun vücuttan uzaklaştırılmasında rasyon enerji düzeyinin çok önemli rol üstlendiği belirtilmektedir. Plazma glikoz düzeyi, laktoz üretimi ile yakından ilişkili olduğundan kolostrum üretimini de etkilemektedir. Diğer ruminant hayvanlarda olduğu gibi koyunlarda da glikoz prekürsörü olan propiyonik asit üretiminin teşvik edilmesi glikoz düzeyini olumlu yönde etkilemektedir. Doğuma yakın süreçte hayvanların besin madde ihtiyaçlarının karşılanması ile progesteron metabolizması için yeterli besinler sağlandığından kolostrum üretimi desteklenebilmektedir (7).

Gebelik dönemi beslemenin kolostrum miktarına etkisi

Kolostrumun büyük çoğunluğu, gebeliğin son 2 veya 3. gününde ve doğumdan sonraki ilk gün sentezlenmektedir. Gebelik döneminde koyunların beslenmesi kolostrum üretimi ve laktogenezin başlangıcı ile bu süreçlerin hormonal kontrolünü veya özellikle gebeliğin sonunda ihtiyaç duyulan besinlerin karşılanmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. Özellikle ikiz gebeliklerde rumenin hacmi uterusun büyüklüğünden dolayı sınırlandırılmaktadır. Bu olay da yeterli kuru madde (KM) alımını engelleyebilmektedir. Yetersiz KM alımı rumenden alt gastrointestinal sisteme sindirim içeriğinin daha hızlı geçmesine sebep olur. Rumenden geçiş hızının artması ile birlikte mikrobiyal sindirim için ayrılan sürenin yetersizliğine yol açar. Bütün bu nedenlerle hayvanların besin madde ihtiyaçlarının karşılanması için gebelik döneminin sonunda tahıl taneleri gibi konsantre yemlerin rasyona eklenmesi gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır (7-9). Konsantre yemler kaba yemlere göre daha küçük hacimde olmakla birlikte daha yüksek enerji ve protein sağlamaktadırlar.

Kuru madde tüketiminin kolostrum üzerindeki etkisi

Gebelik dönemindeki KM tüketim düzeyi koyun ve kuzularda kan serumundaki immünoglobülin G (IgG) konsantrasyonu üzerinde farklı etkiler gösterebilmektedir. İhtiyaçlarının %60'ı düzeyinde KM tüketen koyunların

kolostrum IgG içeriği 127.7 g/L olurken, ihtiyaçlarının %140'ı ile beslenen koyunlarda kolostrum IgG miktarının 99.9 g/L olduğu bildirilmiştir. İhtiyaçlarının %100'ü ile beslenen koyunlarda ise kolostrum IgG miktarı 82.1 g/L seviyelerinde olduğu bildirilmiştir. Bunların yanı sıra gebeliğin ikinci yarısından itibaren yetersiz veya aşırı besleme yapılması durumunda, kolostrum içeriği ve miktarında düşüşler gözlemlenebilmektedir (10,11). Gebelik döneminin sonlarında yavrunun büyümesi ile birlikte uterusun rumen üzerinde baskı oluşturması KM alımını sınırlandırmaktadır. Bu neden hayvanların yem tüketimlerini artırmak için lezzetli yemlerin kullanılması KM tüketimini artırma yönünde atılacak önemli adımlardan birisidir.

Enerji kaynaklarının kolostrum üzerindeki etkisi

Gebeliğin son iki ayında ve laktasyonun başlarındaki beslenme düzeyi, koyunun laktasyon dönemindeki süt verimi ile kuzuların büyüme performansını etkilemektedir (12). Koyunların doğum öncesi dönemde beslenmesi, sadece gelişmekte olan fetüsün büyümesini değil, aynı zamanda koyunun doğum sonrası kuzuya yeterli miktarda kolostrum ve süt üretme yeteneğini de etkilemektedir (13).

Pratik olarak koyun yetiştiricileri kolostrum üretimi ile kuzu sağ kalımını artırabilmek için gebeliğin son haftaları ile doğumdan sonraki ilk birkaç gün kısa süreli enerji takviyeleri uygulamaktadır. Enerji takviyeleri genellikle mısır, yulaf, arpa, buğday gibi tahıl taneleri ile yağlardan oluşmaktadır (14-18). Bu enerji takviyeleri düşük viskoziteli kolostrum sentezi, kuzuların hayatta kalma şansının artırılması ve meme bezlerinde laktoz sentezi için glikoz prekürsörü olarak görev almaktadır (7). Tahıl tanelerinin rumende parçalanmasıyla nişasta açığa çıkmakta ve ruminal sindirime uğramaktadır. Sindirilmeyen kısmı ise ince bağırsaklara geçerek burada var olan enzimlerle glikoza kadar ayrılmaktadır. Sindirilen nişasta sütün bileşiminde bulunan laktoz sentezine katılmak suretiyle süt gibi kolostrum miktarını da artırmaktadır. Mısırdaki nişastanın ruminal fermantasyona dirençli olması bu tahılı gebeliğin son haftasında koyunların beslenmesi için yararlı bir enerji kaynağı haline getirmektedir. Tahılların işlem görmesi de (yarma, öğütme vs.) enzimlerin nişastaya ulaşma hızını artırarak sindirilme derecesini yükseltmektedir (19,20).

Gebeliğin son haftasında koyunlara verilen yüksek enerjili katkıların, mevcut kolostrum miktarını artırarak kuzuların hayatta kalma oranını artırabileceği gösterilmiştir. Ayrıca enerji takviyesi, yenidoğan kuzu-koyun bağına yaşamın ilk saatlerinde daha çok güçlendirmekte ve doğumda kuzunun dinçliğini artırmaktadır (15).

Protein kaynaklarının kolostrum üzerindeki etkisi

Protein içeriği yüksek yem maddelerinin gebe koyunlarda kullanımından sonra meydana gelen kolostrum üretimindeki artış, esasen yüksek protein içerikleri, özellikle de ince

bağırsaklara by-pass protein sağlamalarından kaynaklanmaktadır. Koyunların protein ihtiyaçlarının karşılanamaması durumunda ise üretilen kolostrum miktarı azalmaktadır. Yüksek oranda rumende sindirilebilir protein içeren (acı bakla gibi) yem maddelerinin yanında aşırı düzeyde sindirilebilir karbonhidrat tüketimi dolaşımdaki amonyak düzeyinin toksik seviyelere ulaşmasına sebep olabilir. Ayrıca nişasta içeriği yüksek tahıl tanelerinin rasyondaki oranının artırılması hayvanların protein ihtiyacını da artırmaktadır. Çünkü ince bağırsaklara gelen nişastanın sindirilebilmesi için gerekli olan pankreatik enzimlerin üretimi için de protein gerekmektedir (7,21).

Koyunlara doğum öncesi ve sonrası dönemde orta ila yüksek seviyelerde ham protein takviyesi, sütteki yağ, protein ve toplam kuru madde içeriğini ve ayrıca kuzunun doğum ağırlığı ile günlük canlı ağırlık kazancını artırmaktadır (13). İyi kaliteli meralarda otlayan gebe koyunların protein ihtiyaçları genel olarak karşılanabilmektedir. Ancak ikiz gebeliği olan koyunlara doğum öncesi kısa süreli takviyeler yapmak kolostrum üzerine olumlu etki gösterebilmektedir. Gebelik döneminde ihtiyaçların altında yapılan beslemeden sonra yapılan takviyelerle kolostrum miktar ve kalitesi çok hızlı bir şekilde etkilenmektedir (7).

Yapılan bir çalışmada gebe koyunlarda gebeliğin son döneminde ihtiyacın 1.4 katı düzeyinde protein verilmesinin kolostrum veriminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (21). Ayrıca koyunlara yüksek düzeyde rumende sindirilmeyen protein kaynaklarının verilmesi de kolostrum miktarını azalttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (22). Bütün bu sonuçlardan hareketle koyunlarda gebeliğin son döneminde yapılan yüksek düzeyde protein takviyelerinin kolostrum üzerine olumsuz etki edebileceği söylenebilmektedir.

Vitamin ve mineral kaynaklarının kolostrum üzerindeki etkisi

Geç gebelik ve erken laktasyon, koyunların yaşamındaki en kritik aşamalarıdır. Vitamin ve mineralce eksik olan yemler gebe koyunların gebeliğin son döneminde sağlığını ve laktasyonda ise performanslarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle, koyunların yaşamlarındaki bu en stresli dönemlerinde herhangi bir sağlık ve performans problemlerinden korunması için özel dikkat gösterilmesi gerekmektedir.

Rasyondaki vitamin ve minerallerin düzeyi direkt olarak kolostrum ve sütteki mineral maddelerin içeriğini etkilemektedir. Hayvanların tüketmiş olduğu yemlerde selenyum (Se) veya E vitamini eksikliği bulunması, meme hastalıkları ve metritis gibi problemlerle sonuçlanabilmektedir. Bu rahatsızlıklar da kolostrum ve süt kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (23). Meme bezinden salgılanan kolostrum veya sütün mineral madde içeriği sütte bulunan kazein/total protein oranına bağlı olup bu da

hayvanların beslenme şekliyle doğrudan ilişkilidir. Kazeinin kimyasal yapısı suda çözünür kalsiyum fosfat, magnezyum ve potasyum tuzlarından oluşurken, kazeinler yeni doğan kuzu ve buzağılar için ana mineral madde kaynağıdır. Vitamin ve maya ile birleştirilmiş şelatlı minerallerle desteklenmiş yem rasyonları, inek sütündeki demir ve çinko seviyesini iyileştirdiği bildirilmiştir (24).

Gebeliğin son dönemlerinde mineral bolusları ile beslenen koyunların kolostrumlarında KM ve protein içeriklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (25). Ancak gebe koyunların yüksek vitamin ve mineral tüketmesi kuzuların kolostral IgG absorpsiyon yeteneklerini düşürdüğü belirtilmektedir (26).

Sonuç

Koyunlarda ve diğer ruminantlarda yapılan araştırmalar incelendiğinde gebelik döneminde yapılan besleme uygulamaları, farklı besin maddelerinin rasyona eklenmesi veya rasyondaki düzeylerinin değiştirilmesi ile kolostrum miktar ve kalitesinin değiştirilebileceği gözlenmiştir. Kuzu sağlığı açısından önemli olan kolostrum üzerine etkili farklı besleme stratejilerinin geliştirilmesi ile kuzu sağlığı dolaylı olarak desteklenebilmektedir. Ayrıca gebelik döneminin sonlarında yapılan besleme uygulamaları ile gebe hayvanların sağlığı ve laktasyon performansları da olumlu bir şekilde etkilenmektedir. Bu sebeple konu ile ilgili daha fazla sayıda çalışma yapılarak kuzu kayıpları engellenebilecek hem de koyunların gebelik dönemi ile laktasyon döneminde yaşaması muhtemel rahatsızlıkların önüne geçilebilecektir.

Kaynaklar

1. Canto F, González E, Abecia JA. Effects of Implanting Exogenous Melatonin 40 Days before Lambing on Milk and Colostrum Quality. *Animals* 2022; 12(10): 1257. doi: 10.3390/ani12101257.
2. Çam M, İnal Ş. Siyah Alacalarda Kuru Dönem Süresinin Kısaltılması. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi* 2021, 10(1): 64-75.
3. Mellor DJ, Flint DJ, Vernon RG, Forsyth IA. Relationships between plasma hormone concentrations, udder development and the production of early mammary secretions in twin-bearing ewes on different planes of nutrition. *Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration* 1987, 72(3): 345-356. doi:10.1113/expphysiol.1987.sp003080.
4. Meyer AM, Reed JJ, Neville TL, Thorson JF, Maddock-Carlin KR, Taylor JB, Caton JS. Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes. *Journal of animal science* 2011, 89(5): 1627-1639. doi:10.2527/jas.2010-3394
5. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science* 1993, 55(3): 306-310. doi:10.1016/0034-5288(93)90099-2.
6. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science* 1993, 55(3): 311-316. doi:10.1016/0034-5288(93)90100-T.

7. Banchero GE, Milton JTB, Lindsay DR, Martin GB, Quintans G. Colostrum production in ewes: a review of regulation mechanisms and of energy supply. *Animal* 2015, 9(5): 831-837. doi:10.1017/S1751731114003243.
8. Bermúdez R, Ayala W. Forage production in a native pasture of the Lomadas del Este, Uruguay. *Technical Bulletin INIA* 2005, 151: 33-39.
9. Hawken PAR, Williman M, Milton J, Kelly R, Nowak R, Blache D. Nutritional supplementation during the last week of gestation increased the volume and reduced the viscosity of colostrum produced by twin bearing ewes selected for nervous temperament. *Small Ruminant Research* 2012, 105(1-3): 308-314. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.01.011.
10. Aydoğdu U, Başbuğ O, Ağaoğlu ZT. Kuzularda pasif immünite. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Internal Medicine-Special Topics* 2015, 1(3): 36-41.
11. Nowak R, Poindron P. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development* 2006, 46(4): 431-446.
12. Wang X, Wang Y, Wang Q, Dai C, Li J, Huang P, Yang H. The impact of early and mid-pregnant Hu ewes' dietary protein and energy levels on growth performance and serum biochemical indices. *Journal of Applied Animal Research* 2023, 51(1): 174-181. doi:10.1080/09712119.2023.2170385.
13. Ahmed MH, Salem AZM, Olafadehan OA, Kholif AE, Rivero N, Mariezcurrena MA, Almaz, AHA. Effect of pre-and post-partum dietary crude protein level on the performance of ewes and their lambs. *Small Ruminant Research* 2016, 136: 221-226. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.02.002.
14. Fallah R, Kiani A, Khaldari M. Supplementing lycopene combined with corn improves circulating IgG concentration in pregnant ewes and their lambs. *Tropical Animal Health and Production* 2021, 53(3): 360. doi:10.1007/s11250-021-02802-3.
15. Villar ML, Giraud CG, Cueto MI. Short-term energy supplementation before lambing improves maternal behaviour, udder volume, colostrum viscosity and lamb birthweight in ewes under extensive grazing. *Small Ruminant Research* 2023, 219: 106893. doi:10.1016/j.smallrumres.2022.106893.
16. Banchero GE, Quintans G, Vazquez A, Gigena F, La Manna A, Lindsay DR, Milton JTB. Effect of supplementation of ewes with barley or maize during the last week of pregnancy on colostrum production. *Animal* 2007, 1(4): 625-630. doi:10.1017/S1751731107691885.
17. Hashemi M, Zamiri MJ, Safdarian M. Effects of nutritional level during late pregnancy on colostrum production and blood immunoglobulin levels of Karakul ewes and their lambs. *Small Ruminant Research* 2008, 75(2-3): 204-209. doi:10.1016/j.smallrumres.2007.11.002.
18. Macías-Cruz U, Mejía-Vázquez A, Vicente-Pérez R, Correa-Calderón A, Robinson PH, Mellado M, Avendaño-Reyes L. Effects of soybean oil inclusion in the pre-lambing diet on udder size, colostrum secretion, and offspring thermoregulation and growth in hair-breed ewes. *Livestock Science* 2017, 204: 7-15. doi:10.1016/j.livsci.2017.08.006.
19. Huntington GB. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal of animal science* 1997, 75(3): 852-867. doi:10.2527/1997.753852x.
20. Nocek JE, Tamminga S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of dairy science* 1991, 74(10): 3598-3629. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78552-4.
21. Ocak N, Cam MA, Kuran M. The effect of high dietary protein levels during late gestation on colostrum yield and lamb survival rate in singleton-bearing ewes. *Small Ruminant Research* 2005, 56(1-3): 89-94. doi:10.1016/j.smallrumres.2004.02.014.
22. Annett RW, Carson AF, Dawson LER. Effects of digestible undegradable protein (DUP) supply and fish oil supplementation of ewes during late pregnancy on colostrum production and lamb output. *Animal Feed Science and Technology* 2008, 146(3-4): 270-288. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.01.013.
23. Weiss WP, Todhunter DA, Hogan JS, Smith KL. Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1990, 73(11): 3187-3194. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)79009-1.
24. Pecka-Kielb E, Zachwieja A, Wojtas E, Zawadzki W. Influence of nutrition on the quality of colostrum and milk of ruminants. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* 2018, 68(3): 169-181. doi:10.15567/mljekarstvo.2018.0302.
25. Abdelrahman MM, Aljumaah RS, Khan RU. Effects of prepartum sustained-release trace elements ruminal bolus on performance, colostrum composition and blood metabolites in Najdi ewes. *Environmental Science and Pollution Research* 2017, 24: 9675-9680. doi: 10.1007/s11356-017-8625-1.
26. Boland TM, Keane N, Nowakowski P, Brophy PO, Crosby TF. High mineral and vitamin E intake by pregnant ewes lowers colostrum immunoglobulin G absorption by the lamb. *Journal of Animal Science* 2005, 83(4): 871-878. doi:10.2527/2005.834871x.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ (BOZOK VET BİL) YAZIM KURALLARI

AMAÇ

Bozok Veteriner Bilimleri'nde, Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış güncel ve özgün değeri olan orijinal araştırma makaleleri, olgu sunumları, derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanarak ulusal ve evrensel bilime katkı sağlamak amaçlanmıştır.

KAPSAM

Bozok Veteriner Bilimleri Yozgat Bozok Üniversitesinin bilimsel yayın organı olup Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi 'Bozok Vet Sci'dir. Yayın hayatına 2020 yılından itibaren başlayacak olan Bozok Veteriner Bilimleri hakemli ve bilimsel süreli dergi olarak yayımlanacaktır.

Dergimizde, Türkçe ve İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış olan ve daha önce başka bir dergiye eş zamanlı olarak sunulmamış Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, davetli ve editör onayı alınmış derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanır.

YAZIM KURALLARI (MAKALENİN-YAZININ HAZIRLANMASI)

1. Yazıların sorumlulukları yazarlarına aittir. Gönderilen yazının yayımlanabilmesi için, yayın kurulunca tayin edilen danışmanlar tarafından uygun bulunması şarttır. Dergide yayımlanan yazılar için ücret ya da karşılık ödenmez. Kabul edilmeyen yazılar ve ekleri, aksi belirtilmediği takdirde iade edilmez.
2. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce. Yayının başında, Türkçe "Özet", İngilizce "Abstract" kısımları yer almalıdır. Özet (Abstract) bölümü 200 kelimeyi geçmemelidir.
3. Metinde sade ve anlaşılır bir yazım dili kullanılmalı, bilimsel yazım tarzı benimsenmeli, gereksiz tekrarlardan kaçınılmalı ve kısaltmalar ilk kullanıldığı yerde tanımlanmalıdır.
4. Bozok Veterinary Sciences'nde yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan "Copyright Form - Yayın Hakkı Devir Sözleşmesinin" sorumlu yazar tarafından imzalanarak pdf formatında gönderilmesi gerekmektedir.
5. Dergiye sunulan çalışmaların "etik kurul onayı" sorumluluğu yazarlara aittir. Bununla beraber Editör, gerektiğinde yazarlardan etik kurul belgesi isteme hakkını saklı tutar.
6. Makalede yer alan tüm yazarların bir bilimsel araştırmacı tanımlama sistemi olan ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) kayıt numarası bilgisini makale gönderilme aşamasında sisteme yüklemesi gerekmektedir. ORCID ID kaydı, <http://orcid.org> adresinden ücretsiz yapılabilir
7. Yazışma adresinde belirtilen yazar; tüm yazışmalardan, makale üzerindeki değişikliklerden (yazar sayı ve sırası dahil) ve yayına kabul edilen yazıların matbaa provasının düzeltilmesinden sorumludur.
8. Elektronik sunum: Yayın inceleme sürecini hızlandırmak amacıyla yazılar tam olarak elektronik olarak sunulmalıdır.
9. Yayınlanması istenen çalışmalar; Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, *Times Roman* yazı karakterinde 12 punto, çift aralıklı, sayfanın tüm kenarlarında 3 cm boşluk olacak şekilde ve ilk sayfadan başlayacak şekilde satır numaraları ile birlikte yazılmalıdır. Çalışmada yer alan yazarlar ile ilgili bilgiler "Başlık Sayfası-Title Page" ile "Esas Doküman-main document" den ayrı sunulmalıdır. Orijinal araştırma ve derleme makalelerinde 16 sayfa, literatür listesi mümkünse ise 30 adet sınırını, şekil ve tablo sayısı ise 8 adet sınırını aşmaması tercih edilmelidir. Kısa bildiri ve olgu sunumlarında 10 sayfayı aşmamalıdır.
10. Bozok Veteriner Bilimleri'ne gönderilen yazılar, aşağıdaki sıraya göre (Başlık, Özet, Metin, Kaynaklar, Tablolar ve Şekiller) düzenlenmeli, Tablo ve Şekiller ayrı sayfalarda belirtilmelidir.
11. Dergiye gönderilen çalışmalar Abstract, Özet, Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar başlıklarından oluşmalıdır. Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümleri numara verilerek belirtilmelidir (1.Giriş, 2.Materyal ve Metot, 3.Bulgular, 4.Tartışma ve Sonuç). Alt başlıklar 1.1., 1.2., şeklinde ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Referanslar bölümü numaralandırılmamalıdır.

a. Başlık: Başlık kısa, açık, tüm harfleri büyük ve yazı için uygun olmalıdır. Özellikle elektronik sunumda makalenin sadece başlığı, (yazar ve kurum adresi vermeksizin) yazılmalıdır. Bu yöntem, yazıların uzmanlarca tarafsız bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak amacıyla uygulanmaktadır.

b. Özet: Türkçe yazılarda Türkçe ve İngilizce özet olmalıdır. İngilizce yazılarda Türkçe özet de gereklidir. Özet, 250 kelimedenden daha uzun olmamalı; amaç, materyal ve metot, bulgular ile sonucunu içermelidir. Özetlerin

altına 4-6 adet anahtar kelime verilmelidir. Türkçe anahtar kelimeler "Türkiye Bilim Terimleri (TBT)"ne uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.bilimterimleri.com>). İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)" e uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

c. Metin: Araştırma makalelerinde; Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ile Tartışma ve Sonuç bölümleri, olgu sunumlarında ise; Giriş, Olgu Sunumu, Tartışma ve Sonuç bölümleri olmalıdır. Bölüm başlıkları ilk harfi büyük olacak şekilde küçük harfler ile yazılmalıdır. Yazılarda "Systeme International (SI)" birimleri kullanılmalıdır. Derleme makaleler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Derleme makalesi "Giriş" ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, "Sonuç" ve "Kaynaklar" ile tamamlanmalıdır.

d. Sembol, birim ve kısaltmalar: Dergimiz, *Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.) tarafından belirtilen sistemi kabul etmektedir. \times , μ , η , veya v gibi semboller MS Word sembol listesinden seçilerek kullanılmalıdır. Derece ($^{\circ}$) sembolü gösterimi için; "O" harfinin veya "0" rakamının üst simge şeklinde gösterilmesi ile yapılmamalı sembol menüsünden kullanım tercih edilmelidir. Çarpım "x" harfi değil sembol menüsü (\times) kullanılmalıdır. Sayı, birim ve matematiksel semboller (+, -, \times , =, <, >), kullanıldıktan sonra bir boşluk bırakılmalı (örneğin., 3 kg), yüzde işaretinden sonra boşluk bırakılmamalıdır (örneğin, %45). Latince et al., in vitro veya in situ terimleri italic olarak gösterilememelidir.

e. Kaynaklar: Kaynaklar metin içinde parantez içinde numara ile belirtilmelidir. Birden fazla kaynağa atıf yapılacaksa aynı parantez içerisinde belirtilmelidir örn, (3,5,7-11). Literatür listesinde yer alan kaynakların her biri için metinde atıf yapılmalıdır.

Beşten fazla yazarı olan kaynaklarda, beşinciden sonrası için "et al." eki kullanılmalı, aşağıda verilen sistematik ile noktalama işaretleri ve yazım kurallarına dikkat edilerek yazılmalıdır.

- Kaynak süreli yayın ise;** Örnek: Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi* 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR. S173867.
- Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;** Örnek: Gay CC, Besser TE. *Escherichia coli septicaemia in calves*. Gyles CL. eds. In: *Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans*. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
- Kaynak kitap ise;** Örnek: Varley H, Gowenlock AH, Bell M. *Practical Clinical Biochemistry*. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
- Kaynak editörlü kitap ise;** Örnek: Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. *Veterinary Medicine*. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
- Kaynak kongre bildirisi ise;** Örnek: Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye.
- Kaynak tez ise;** Örnek: Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web tabanlı erişimler kaynak olarak gösterilmemelidir.

f. 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. (Table 1.)** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.

Örnek:**Table 1.** Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
A I ^c	200	215 \pm 10	108
V c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

g. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1. (Figure 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.

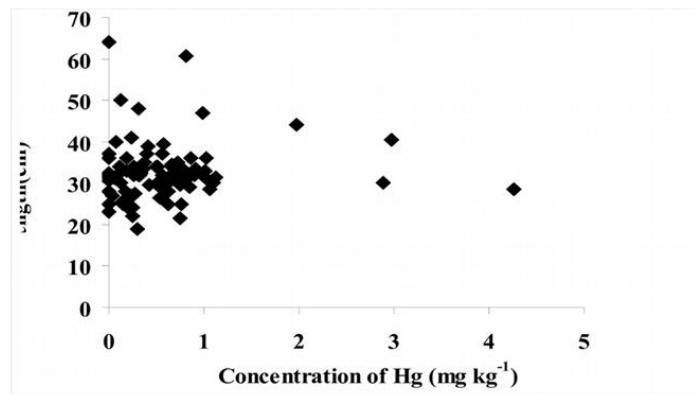
Örnek:

Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

Yayının baskı öncesi matbaa provasý yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir ve üç gün içerisinde kontrol edilerek dergiye geri gönderilmesi istenir.

Her yayın için Bozok Veteriner Bilimleri'nin ilgili sayısı yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir. Makalelerin PDF türü tam metin dosyalarına derginin web sayfasından erişilebilir.

BOZOK VETERINARY SCIENCES (BOZOK VET SCI)

WRITING RULES

Purpose

In Bozok Veterinary Sciences, by publishing original research articles, case reports, reviews, short papers and letters to the editor with current and original value prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition. It is aimed to contribute to national and universal science.

Scope

Bozok Veterinary Sciences is the scientific publication of Yozgat Bozok University and is published twice a year, in June and December. The abbreviated name of the journal is Bozok Vet Sci. Bozok Veterinary Sciences, which will start its publication life in 2020, will be published as a peer-reviewed and scientific periodical.

In our journal, an original research article, case report, prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition, which was prepared in one of the Turkish and English languages and was not presented simultaneously to another journal, invited and editor-approved reviews, short papers and letters to the editor are published.

WRITING RULES (PREPARATION OF THE ARTICLE-ARTICLE)

1. Responsibilities of the articles belong to their authors. In order for the submitted manuscript to be published, it must be approved by the advisors appointed by the editorial board. No fee or compensation is paid for the articles published in the journal. Unaccepted manuscripts and their appendices will not be returned unless otherwise stated.
2. The publication languages of the journal are Turkish and English. At the beginning of the publication, the Turkish "Abstract" and the English "Abstract" sections should be included. The abstract section should not exceed 200 words.
3. A plain and understandable writing language should be used in the text, scientific writing style should be adopted, unnecessary repetitions should be avoided and abbreviations should be defined where they are first used.
4. If accepted for publication in Bozok Veterinary Sciences, the "Copyright Form - Copyright Transfer Agreement", which includes the declarations regarding the transfer of all kinds of publication rights, must be signed by the responsible author and sent in pdf format.
5. Responsibility for the "ethics committee approval" of the studies submitted to the journal belongs to the authors. However, the Editor reserves the right to request an ethics committee document from the authors when necessary.
6. All authors in the article are required to upload the ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) registration number information, which is a scientific researcher identification system, to the system at the time of submitting the article. ORCID ID registration can be done free of charge at <http://orcid.org>.
7. The author specified in the correspondence address; He is responsible for all correspondence, changes on the article (including the number and order of the author) and correction of the printing proof of the articles accepted for publication.
8. Electronic submission: Manuscripts should be submitted fully electronically in order to speed up the publication review process.
9. Studies to be published; It should be written in Microsoft Word 6.0 or higher, in Times Roman font, 12 points, double-spaced, with 3 cm margins on all sides of the page, and with line numbers starting from the first page. Information about the authors in the study should be presented separately from the

- "Title Page" and "Main Document". It should be preferred that the original research and review articles should not exceed 16 pages, the literature list should not exceed 30 if possible, and the number of figures and tables should not exceed 8. Short papers and case reports should not exceed 10 pages.
10. Manuscripts sent to Bozok Veterinary Sciences should be arranged in the following order (Title, Abstract, Text, References, Tables and Figures), Tables and Figures should be indicated on separate pages.
 11. Studies submitted to the journal should consist of Abstract, Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, References. Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion sections should be numbered (1. Introduction, 2. Material and Method, 3. Findings, 4. Discussion and Conclusion). Sub-headings should be numbered sequentially as 1.1., 1.2.,... The references section should not be numbered.
 - a) **Title:** The title should be short, clear, all capital letters and appropriate for the text. Especially in the electronic submission, only the title of the article (without giving the author and institution address) should be written. This method is applied to ensure that the articles are evaluated impartially by experts
 - b) **Abstract:** In Turkish articles, there should be an abstract in Turkish and English. Turkish abstracts are also required for English articles. The abstract should not be longer than 250 words; should include the purpose, material and method, findings and conclusion. 4-6 keywords should be given under the abstracts. Turkish keywords should be given in accordance with "Turkish Science Terms (TBT)" (See <http://www.bilimterimleri.com>). English keywords should be given in accordance with "Medical Subject Headings (MESH)" (See <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).
 - c) **Text:** In research articles; Introduction, Material and Method, Results and Discussion and Conclusion sections, in case reports; There should be Introduction, Case Report, Discussion and Conclusion sections. Chapter titles should be written in lowercase letters with the first letter capitalized. "Systeme International (SI)" units should be used in manuscripts. The summary prepared for the review articles should consist of information about the subject of the review and the purpose of the review. The review article should start with "Introduction", continue with subheadings to be determined by the author/s, and should be completed with "Conclusion" and "References".
 - d) **Symbols, units and abbreviations:** Our journal accepts the system specified by Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.). Symbols such as \times , μ , η , or v should be selected from the MS Word symbol list and used. For degree ($^{\circ}$) symbol display; It should not be done by showing the letter "O" or the number "0" as superscript, it should be preferred to use from the symbol menu. Symbol menu (\times) should be used, not the product letter "x". Numbers, units, and mathematical symbols (+, -, \times , =, <, >) should be followed by a space (e.g. 3 kg), not a percent sign (e.g. 45%). Latin et al., in vitro or in situ terms should not be shown in italics.
 - e) **References:** References should be indicated in the text with numbers in parentheses. If more than one source is to be cited, it should be stated in the same parenthesis, eg (3,5,7-11). Reference should be made in the text for each of the sources in the literature list.
 12. In references with more than five authors, "et al." suffix should be used, and it should be written in the following systematic, paying attention to the punctuation marks and spelling rules.
 - a) **If the source is a periodical;** Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
 - b) Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
 - c) **If the source is a chapter from the edited book;** Gay CC, Besser TE. Escherichia coli septicaemia in calves. Gyles CL. eds. In: Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
 - d) **If the source book;** Varley H, Gowenlock AH, Bell M. Practical Clinical Biochemistry. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
 - e) **If the source is an edited book;** Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
 - f) **If the source is the congress notice;** Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves

with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye

- g) **If the source is thesis**; : Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web-based access should not be cited as a source.

- f) **Tables**; After the references part, each table should be given on a separate page. Only the first letters of table titles should be capitalized. Table headings should be above the table and numbered as Table 1. (Table 1.). Inside and side guide lines should not be used in tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.

Sample :

Table 1. Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
Al ^c	200	215 \pm 10	108
V ^c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

Every picture, graphic and drawing; should be accepted as figures and written like Figure 1. (Figure 1.), each one should be given on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed under the figure along with the figure name. Pictures must be at 300dpi resolution.

Sample:

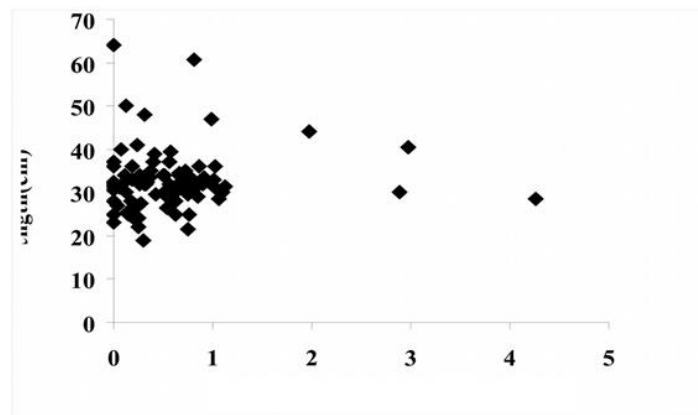


Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

The prepress proof of the publication is sent to the corresponding author and it is requested to be checked and returned to the journal within three days.

For each publication, the relevant issue of Bozok Veterinary Sciences is sent to the corresponding author. PDF-type full-text files of the articles can be accessed from the journal's web page.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ
Yayın Hakları Devri Sözleşmesi

Makale Türü: () Araştırma () Olgu Sunumu () Derleme () Kısa bildiri () Editöre mektup

Makale Başlığı:.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Bozok Veteriner Bilimleri'nin yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Bozok Veteriner Bilimleri Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Bozok Veteriner Bilimleri'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Bozok Veteriner Bilimleri'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Tel/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra pdf formatında, başlangıç sayfası ve esas doküman ile birlikte e-posta adresimize gönderiniz.

Elektronik posta:

bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adres:

Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sorgun Meslek Yüksekokulu Binası, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları
Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

**BOZOK VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT RELEASE FORM**

Article Type: Research Case Report Review Short Paper Letter to Editor

Manuscript Title:

.....

As the authors of the article whose type and title are mentioned above; We wish to prepare and publish Bozok Veterinary Sciences with the knowledge and acceptance of the editorial and publication terms, and the article that we sent to Bozok Veterinary Sciences Editor is original, partially or completely not published before or not sent to another publication institution simultaneously, any scientific and ethical issues that may arise after the article is published. We undertake that we are responsible and that Bozok Veterinary Sciences will not bear any responsibility, and that we have transferred all rights of publication to Bozok Veterinary Sciences as of the date of publication, together with the corrections required by the consultant and journal editor.

However, patents, other than the copyright of the authors, etc. registered rights, authors' right to use all or part of the article free of charge in their works such as books and lessons, and the right to reproduce the article for non-commercial use.

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:..... Signature:.....

Notes: Please fill the form and send it to our e-mail address in pdf format with the start page and the main document.

E-mail: bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adress: Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun Vocational School Building, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

**BOZOK VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT RELEASE FORM**

Article Type: Research Case Report Review Short Paper Letter to Editor

Manuscript Title:

.....

As the authors of the article whose type and title are mentioned above; We wish to prepare and publish Bozok Veterinary Sciences with the knowledge and acceptance of the editorial and publication terms, and the article that we sent to Bozok Veterinary Sciences Editor is original, partially or completely not published before or not sent to another publication institution simultaneously, any scientific and ethical issues that may arise after the article is published. We undertake that we are responsible and that Bozok Veterinary Sciences will not bear any responsibility, and that we have transferred all rights of publication to Bozok Veterinary Sciences as of the date of publication, together with the corrections required by the consultant and journal editor.

However, patents, other than the copyright of the authors, etc. registered rights, authors' right to use all or part of the article free of charge in their works such as books and lessons, and the right to reproduce the article for non-commercial use.

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:..... Signature:.....

Notes: Please fill the form and send it to our e-mail address in pdf format with the start page and the main document.

E-mail: bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adress: Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun Vocational School Building, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT



İçindekiler / Contents

2023, 4 (1)

Araştırma Makaleleri / Research Articles

- Gülmez M, Bayhan KY, Üner S. *Effect of Pasteurized Sheep's Milk Use on Production and Maturation of Süirt Herby Cheese*.....1-11
- Güngör C, Gündoğ DA, Onmaz NE. *Mezbaha Ortamından İzole Elde Edilen Enterococcus faecalis İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı*.....12-17
- Güngör C, Gündoğ DA, Onmaz NE, Gönülalan Z. *Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi*.....18-26
- Tokahoğlu Ş, Gönülalan Z, Şimşek E, Onmaz NE, Yılmaz E. *Bioaccumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish Species Retailed in Kayseri Region: Potential Public Health Hazard of Toxic Metals*.....27-36

Derlemeler / Review Articles

- Sargin Ö, Bakirel U, Or ME. *Ülkelere Göre Kuduz Karantina Tedbirleri ve Uygulanan Protokollerin Karşılaştırılması*.....37-40
- Uysal S. *Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslenmesinin Kolostrum Üzerindeki Etkileri: Koyunlarda Gebelik Dönemi Beslemesi*.....41-44