

**TÜRKİYE'DEKİ *Paenibacillus larvae*  
GENOTİPLERİNİN TESPİT EDİLMESİ VE FARKLI  
PROPOLİSLERİN BU GENOTİPLER ÜZERİNE  
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ**

**DETERMINATION OF *Paenibacillus larvae*  
GENOTYPES IN TURKEY AND ANTIMICROBIAL  
EFFECT OF DIFFERENT PROPOLIS AGAINST THESE  
GENOTYPES**

**AYGÜN SCHIESSER**

**PROF. DR. NEVİN KESKİN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

**AYGÜN SCHIËSSER'** in hazırladığı "**Türkiye'deki *Paenibacillus larvae* Genotiplerinin Tespit Edilmesi ve Farklı Propolislerin Bu Genotipler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir CANSUNAR

Başkan

.....

Prof. Dr. Nevin KESKİN

Danışman

.....

Prof. Dr. İrfan KANDEMİR

Üye

.....

Prof. Dr. Hatice MERGEN

Üye

.....

Doç. Dr. Aslı ÖZKIRIM

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım aileme ve sevgili eşime...*

## **ETİK**

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/07/2014

AYGÜN SCHIESSER

## ÖZET

# **TÜRKİYE'DEKİ *Paenibacillus larvae* GENOTİPLERİNİN TESPİT EDİLMESİ VE FARKLI PROPOLİSLERİN BU GENOTİPLER ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ**

**Aygün SCHIESSER**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN**

**Temmuz 2014, 106 sayfa**

Dünyada insanlar tarafından en çok yetiştirilen faydalı böcek, Avrupa bal arısı *Apis mellifera* L.'dir. Bal arısı ürünlerinin ve arılar tarafından sağlanan polinasyonun dünya ekonomisindeki payı oldukça büyüktür. FAO istatistiklerine göre 2012 yılındaki bal üretiminin değeri 679,12 milyon dolardır. Ayrıca, birçok bitkinin meyve ve tohum oluşturması, arılarla polinasyona bağlıdır.

Dünya çapındaki koloni sayısının, 2012 yılında 79,9 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Dünya çapında, koloni sayısında meydana gelen düşüş, ciddi ekonomik kayba neden olmaktadır. Yetiştirilen arı popülasyonlarını etkileyen; zararlılar, patojenler, pestisitler, iklim ve yetersiz arıcılık uygulamaları gibi birçok faktör bulunmaktadır.

Bu faktörlerden en öldürücü olanlarından biri Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) Hastalığı etkeni *Paenibacillus larvae*'dir. *Paenibacillus larvae*, bal arılarını etkileyen gram pozitif ve spor oluşturan bir bakteridir. Dirençli AFB

suşlarının artması ve balda kalıntı oluşturması nedeniyle tedavi amacı ile antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır. Bu nedenle, bilim adamları ile ar-ge firmaları AFB tedavisi için doğal bileşikleri bulma çabasıdadır.

Bu doktora çalışmasında, araziden toplanan örneklerden *Paenibacillus larvae* suşları izole edilmiş ve rep-PCR genotiplendirme yöntemi ile genotipleri belirlenmiştir. 14 propolis ekstraktının, 26 *P. larvae* izolatına karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir.

Genotiplendirme çalışmaları sonucuna göre, Türkiye izolatlarında iki farklı genotip (ERIC I and ERIC II) tespit edilmiştir. Sonuçlar, tüm propolis ekstraktlarının *P. larvae*'ye karşı farklı derecelerde antimikrobiyal etkisinin olduğunu göstermektedir. Özellikle, sırasıyla Artvin, Muğla ve Bursa propolis örneklerinin oldukça yüksek etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, genotiplendirme çalışmaları ile AFB epidemiyolojisinin anlaşılması ve hastalıkla savaşmada yeni stratejiler belirlenmesine ışık tutulması amaçlanmaktadır. Ayrıca propolisin, oldukça tehlikeli arı hastalıklarından biri olan AFB için alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği ve bu bilgiler ışığında koruma, yönetme ve tedavi programları geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera* L., Amerikan Yavru Çürüklüğü, *Paenibacillus larvae* , Genotipleme, Propolis

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF *Paenibacillus larvae* GENOTYPES IN TURKEY AND ANTIMICROBIAL EFFECT OF DIFFERENT PROPOLIS AGAINST THESE GENOTYPES**

**Aygün SCHIËSSER**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Nevin KESKİN**

**July 2014, 106 pages**

The European honey bee *Apis mellifera* L. is the most commonly managed useful insect in the world. Products of the honey bee and pollination with honey bees have great share within global economy. According to FAO stats global value of honey production was 679,12 million USD in 2012. Also, fruit or seed set of many plants depend on honey bee pollination.

The total number of managed honey bee colonies worldwide was estimated to be 79,9 million in 2012. Decline in colonies all over the world cause serious economic loss. There are several factors affecting the managed honey bee populations like pests, pathogens, pesticides, climate and poor beekeeping techniques.

One of the most lethal of these factors is *Paenibacillus larvae*, the agent of American Foulbrood disease. *Paenibacillus larvae* is a gram positive and spore forming bacteria that affects honey bee larvae. Due to increase of resistant AFB strains and residue problem in honey, it is restricted to use

antibiotics for treatment. Therefore, scientists and Research & Development companies are seeking for natural compounds for AFB remedy.

In the doctoral research, *Paenibacillus larvae* strains were isolated from field samples and their genotypes were determined by rep-PCR genotyping method. 14 propolis extracts were also tested for their antimicrobial activity against to 26 isolates of *P. larvae*.

According to genotyping studies, two different genotypes (ERIC I and ERIC II) were identified within Turkish isolates. Results showed that, all propolis extracts have antimicrobial effect against to *P. larvae* in different grades. Especially, Artvin, Muğla and Bursa propolis samples have shown higher effect respectively.

In conclusion, genotyping will provide new perspectives to understanding of epidemiology of AFB disease and identify new strategies against it. Also, propolis could be an alternative treatment for the most dangerous disease of honey bee and in accordance with these data, protection management and treatment programs could be created.

Keywords: *Apis mellifera* L., American Foulbrood, *Paenibacillus larvae*, Genotyping, Propolis



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, tez çalışmamın belirlenmesi, uygulanması ve yazıya dökülmesi aşamalarında titizlikle gösterdiği desteği ve yardımları; bizlere her zaman bir anne şefkati ile yaklaşıp üzerimizden eksik etmediği ilgisi için ve en önemlisi hep açık yürekli, dürüst ve hassasiyetle gösterdiği yaklaşımı için değerli danışmanım Prof. Dr. Nevin KESKİN' e saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim sırasında danışmanım, daha sonra iş arkadaşım olarak benimle tüm bilgisini paylaşan; sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Aslı ÖZKIRIM' a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başından sonuna önerileri ile yol gösteren Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Prof. Dr. İrfan KANDEMİR ve Prof. Dr. Hatice MERGEN'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Arıcılık ve Arı Ürünleri konusunda yapmakta olduğu çalışmalar ile bize yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Kadriye SORKUN'a; tez çalışmamda kullandığım materyallerin temini ve analizi aşamalarındaki sonsuz desteği için sevgili hocam Dr. Ömür GENÇAY ÇELEMLİ' ye teşekkür ederim.

Tüm arazi çalışmalarımın yürütülmesinde ve örnek temininde büyük payı olan, başta Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği olmak üzere, tüm İl Birlikleri'ne destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

014 T04 604 001 No'lu proje ile tez çalışmamı destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

ECOST-STSM-FA0803-210311-006818 nolu proje ile tez çalışmamı destekleyen COST Action: FA0803'e teşekkür ederim.

Gent Üniversitesi'nde yaptığım çalışmalar sırasında beni laboratuvarında ağırlayan Dr. Dirk De GRAAF'a ilgi ve yardımları için teşekkür ederim.

Çalıştığım koridorda ilgi ve güler yüzü eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ, Prof. Dr. Nurdan ÖZER, Dr. Güzin ÖZSOY, Dr. Banu Şebnem Önder'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin tüm sterilizasyon aşamalarında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Teknisyen Vedat MUTLU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince gösterdikleri ilgi ve sevgileri ile her zaman bana destek olan sevgili arkadaşlarım Uzman Ayşegül Elif YORULMAZ' a, Arş. Gör. Dr. Edibe ÖZMEN' e, Arş. Gör. Pınar BARKAN' a ve tüm bu serüveni benimle aynı anda yaşayan Arş. Gör. Seçil KARAHİSAR' a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı doktora öğrencisi sevgili ErKay ÖZGÖR'e teşekkür ederim.

Her zaman başarılı bir öğrenci olmamı dileyen, bilim adamı olma yolunda ilerlememle gurur duyan, maalesef bu mutlu sona şahit olamayan rahmetli büyükbabam Hüseyin GÜMÜŞ' e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde, beni okumaya, araştırmaya yönlendiren; Türk ulusunun değerlerini koruyan bir evlat olarak yetişmem için ellerinden gelen tüm çabayı gösteren; bilime inanan ve bana tüm eğitim hayatım ve tez çalışmalarım süresince gece gündüz demeden destek olan değerli annem Semra YALÇINKAYA ve babam Ahmet YALÇINKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Tüm bu süreç boyunca yanımda olan ve benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili kardeşim Aykut YALÇINKAYA'ya teşekkür ederim. En yoğun çalıştığım günlerde bile bana karşı anlayışlı ve sabırlı olan, desteği ile yol kat edebildiğim, hayattaki can yoldaşım, sevgili eşim Leonhard Alp M. SCHIESSER'e varlığı için teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Bal Arısı Yavru Hastalıkları .....	5
2.1.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü.....	5
2.2. Amerikan Yavru Çürüklüğü Tedavi ve Mücadele Yöntemleri .....	12
2.2.1. Kültürel Yöntemler .....	13
2.2.2. Kimyasal Yöntemler.....	13
2.2.3. Doğal Yöntemler .....	13
2.3. Propolis .....	14
2.3.1. Propolisin Tarihçesi .....	16
2.3.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri .....	17
2.3.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri.....	18
2.3.4. Propoliste tanımlanan önemli bazı bileşikler.....	19
3. MATERYAL-METOD .....	21
3.1. Hastalıklı Yavrulu Peteklerin Toplanması .....	21
3.2. İzolasyon ve Kültürasyon.....	23
3.3. Mikrobiyal ve Biyokimyasal Analizler .....	23

3.4.	İdentifikasyon .....	26
3.5.	rep-PCR Analizi ile Genotiplendirme .....	27
3.6.	Kullanılan Propolis Örnekleri ve Araziden Toplanması.....	30
3.7.	Propolis Örneklerinin Ekstrakte Edilmesi .....	32
3.8.	GC-MS Analizleri ve Propolislerin Özellikleri .....	34
3.9.	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkisinin Saptanması .....	35
3.10.	İstatistiksel Analizler .....	37
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	38
4.1.	Mikrobiyal ve Biyokimyasal Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar ..	38
4.2.	Moleküler Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar .....	39
4.2.1.	<i>Paenibacillus larvae</i> ' nin 16S rRNA PCR sonuçları .....	40
4.2.2.	Rep-PCR ile Genotiplendirme Sonuçları .....	42
4.3.	GC-MS Analizlerinden Elde Edilen Sonuçlar .....	46
4.4.	Antimikrobiyal Duyarlılık Testinden Elde Edilen Sonuçlar .....	49
4.5.	İstatistiksel Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar.....	76
4.6.	Elde Edilen Sonuçların Tartışılması .....	83
KAYNAKLAR .....		90
ÖZGEÇMİŞ .....		105

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. <i>Paenibacillus larvae</i> genotiplerinin karakteristik özellikleri.....	8
Çizelge 3.1. Örneklerin Elde Edildiği İller.....	22
Çizelge 3.2. Kullanılan besiyeri ve ayraçların içerikleri.....	25
Çizelge 3.3. AFB Forward ve AFB Reverse primerler.....	26
Çizelge 3.4. <i>16 S rRNA PCR</i> aşamaları.....	27
Çizelge 3.5. ERIC primerleri.....	28
Çizelge 3.6. Gradient PCR içeriği.....	28
Çizelge 3.7. Gradient PCR protokolü.....	29
Çizelge 3.8. Sıcaklık-Mg Gradient PCR içeriği.....	29
Çizelge 3.9. Sıcaklık-Mg Gradient PCR protokolü.....	29
Çizelge 3.10. Toplanan propolis örnekleri.....	31
Çizelge 4.1. Biyokimyasal Test Sonuçları .....	39
Çizelge 4.2. Amerikan Yavru Çürüklüğü Açısından Pozitif Örnekler.....	41
Çizelge 4.3. Rep-PCR ile Genotiplendirme Sonuçları.....	44
Çizelge 4.4. Propolis ekstraktlarının GC-MS analizine göre içerikleri.....	47
Çizelge 4.5. Propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin dağılımları.....	48
Çizelge 4.6. Eric I genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	50
Çizelge 4.7. Eric II genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	51

Çizelge 4.8. Eric III genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	52
Çizelge 4.9. Eric IV genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	53
Çizelge 4.10. 06/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	54
Çizelge 4.11. 06/14 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	55
Çizelge 4.12. 06/26 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	56
Çizelge 4.13. 04/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	57
Çizelge 4.14. 19/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	58
Çizelge 4.15. 31/10 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	59
Çizelge 4.16. 33/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	60
Çizelge 4.17. 36/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	61
Çizelge 4.18. 36/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	62
Çizelge 4.19. 36/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	63

Çizelge 4.20. 37/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	64
Çizelge 4.21. 41/06 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	65
Çizelge 4.22. 45/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	66
Çizelge 4.23. 47/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	67
Çizelge 4.24. 52/15 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	68
Çizelge 4.25. 58/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	69
Çizelge 4.26. 69/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	70
Çizelge 4.27. 74/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	71
Çizelge 4.28. 76/12 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	72
Çizelge 4.29. 76/13 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	73
Çizelge 4.30. 76/14 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	74
Çizelge 4.31. 81/21 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.....	75

Çizelge 4.32. Genotipler açısından inhibisyon zon çapları .....	76
Çizelge 4.33. Genotipler açısından inhibisyon zon çaplarının One-way ANOVA testi ile karşılaştırılması.....	76
Çizelge 4.34. Farklı genotiplerin propolise karşı duyarlılığının Duncan testi karşılaştırılması .....	77
Çizelge 4.35. İzolatlar açısından inhibisyon zon çapları.....	77
Çizelge 4.36. İzolatların duyarlılık düzeylerinin Duncan testi ile karşılaştırılması.....	79
Çizelge 4.37. Propolisler açısından inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması.....	80
Çizelge 4.38. Propolisler açısından inhibisyon zon çaplarının Duncan testi ile karşılaştırılması.....	81
Çizelge 4.39. Etki düzeyine göre propolis alt grupları.....	81
Çizelge 4.40. Farklı konsantrasyonlar açısından inhibisyon zon çapları.....	82
Çizelge 4.41. Farklı konsantrasyonlar açısından inhibisyon zon çaplarının One-way ANOVA testi ile karşılaştırılması.....	82



## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. (a) <i>Paenibacillus larvae</i> 'nin vejetatif formu; (b) <i>Paenibacillus larvae</i> 'nin vejetatif-spor geçiş formu; (c) <i>Paenibacillus larvae</i> 'nin spor formu.....	9
Şekil 2.2. <i>P. larvae</i> enfeksiyon mekanizması.....	10
Şekil 2.3. Hastalıklı petek görünümü (a) İpliğimsi larval kalıntı; (b) Delik kapaklı yavru göz.....	11
Şekil 2.4. Sarı-yeşil renkte ham propolis örneği.....	17
Şekil 2.5. Koyu kahverengi ham propolis örneği.....	18
Şekil 3.1. Petek örneği toplanan iller.....	23
Şekil 3.2. Propolis örneklerinin toplandığı iller.....	30
Şekil 3.3. Propolis toplanan aralık örneği.....	31
Şekil 3.4. Propolis toplanan (a)kovan ve (b) propolis tuzağı örneği.....	32
Şekil 3.5. Propolisin etanol ekstrasyonunun hazırlanması.....	33
Şekil 3.6. Propolis örneklerinin etanol ekstraktları.....	33
Şekil 3.7. GC-MS cihazı.....	34
Şekil 3.8. Disk difüzyon testi .....	35
Şekil 3.9. Bakteri kültürleri.....	36
Şekil 3.10. Disk difüzyon testinin uygulanması.....	37
Şekil 4.1. MYPGP agar üzerinde pozitif üreme (a) pigmentli (b) pigmentsiz koloni.....	38

Şekil 4.2. <i>Paenibacillus larvae</i> Gram boyama preparatı.....	39
Şekil 4.3. 16S rRNA PCR sonucu.....	40
Şekil 4.4. AFB şüphesi taşıyan örneklerin toplandığı ve pozitif sonuç elde edilen iller.....	42
Şekil 4.5. ERIC primerler kullanılarak rep-PCR ile genotiplendirme.....	43
Şekil 4.6. rep-PCR ile oluşan bantlar.....	45
Şekil 4.7. Toplanan örneklerin Amerikan Yavru Çürüklüğü sonuçları .....	45
Şekil 4.8. Genotiplerin Türkiye çapındaki dağılımları ve propolis alınan iller .....	46
Şekil 4.9. Disk difüzyon yöntemi uygulanan petriyeler .....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

AFB	Amerikan Yavru Çürüklüğü (American Foulbrood)
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
CSA	Columbia Ship Agar
ERIC	Enterobakteriyel Tekrarlanan İntergenik Konsensus(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)
LT <sub>100</sub>	Tüm organizmaların ölüm süresi
MYPGP Agar	Muller Hinton/Yeast extract/ Phosphate/Glucose/Pruvate Agar
REP	Tekrarlanan ekstragenik Palindromik (Repetitive Extragenic Palindromic)
Rep-PCR	Tekrarlanan elementlerin PCR amlifikasyonu
TBE	Tris/Borat/EDTA

# 1. GİRİŞ

İnsanlar tarafından en çok yetiştirilen ve en fazla ekonomik öneme sahip olan böcek türü bal arısıdır. İnsanlarla bal arılarının ilişkileri çok öncelere dayanmaktadır. Paleolitik çağ ve öncesinde fırsatçı avcılıkla bal elde etmeye başlayan insanlar zaman içinde arıları kovan içinde yetiştirmeyi öğrenmişlerdir. Arıcılığın başlamasıyla birlikte; arı hastalıkları, yetiştiriciler için sorun haline gelmiştir.

Bal ile propolis, arı sütü, polen, arı zehri ve balmumu gibi diğer arı ürünlerinin verimini doğrudan etkileyen arı hastalıkları, hem bilim adamlarının hem arıcıların hem de devlet yetkililerinin oldukça ilgisini çekmektedir.

Ülkemiz, farklı dönemlerde çiçeklenen oldukça fazla sayıda ballı bitkiye sahip olması ve sahip olduğu iklim koşulları nedeniyle arıcılık açısından oldukça büyük bir avantaja sahiptir. Ancak arıcı hareketlerinde tam etkin kontrolün yapılmaması, hastalık etkeni patojenlerde direnç artışı, epidemiyolojik çalışmaların azlığı, hastalıkların kontrol edilememesi ve hastalıklarla mücadelenin düzgün şekilde yapılamaması ülkemiz arıcılığı için dezavantaj oluşturmaktadır.

Beş milyonu aşan kovan sayısı ile, dünya sıralamasında 2. olan ülkemiz; 75.000 ton bal üretimi ile 4. sırada yer almaktadır. Kovan sayısı ile 2. ancak bal üretiminde 4. sırada yer alması, kovan başına bal veriminin diğer ülkelere göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır [1]. Verim düşüklüğünün başlıca etkeni ise arı hastalıklarıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Apis mellifera* L. Hymenoptera (Zar kanatlılar) ordosu, Apidae familyası, Apinae alt familyası ve *Apis* cinsine dahildir. 1758 yılında Carolus Linnaeus tarafından *Apis mellifera* L. olarak adlandırılan bal arıları, bombus arıları ve iğnesiz arılarla aynı familyaya bağlıdır [2].

Böceklerin ilk ortaya çıkışı, 300 milyon yıl kadar önce Karbonifer çağına rastlamaktadır. Bal arılarının bağlı olduğu Hymenoptera takımının muhtemel ataları, yaklaşık 200 milyon yıl önce evrim geçiren ve gelişen yırtıcı eşek arılarıdır. Arıların ise yaklaşık 100 milyon yıl kadar önce orta Kretase'de geliştiği görülür. Çiçekler geniş zaman periyotları boyunca özelleşerek hareketli tozlaştırıcılara bağımlı hale gelmişlerdir. Çiçeklerin tozlaşması için başta arılar olmak üzere böcekler çok önemli hale gelmiş, böcekler ve bitkilerin birbirlerine muhtaç olmaları dolayısı ile evrimleri de paralel olarak gerçekleşmiştir [3].

*Apis mellifera* L. Avrupa, Orta Doğu ve Afrika'da doğal olarak yayılım göstermektedir. Farklı habitatların gerektirdiği çeşitli ekolojik ve iklimik durumlara karşı adaptasyon, 24 alt türün oluşmasına neden olmuştur. Bal arıları, ayrıca insanlar tarafından dünyanın her tarafına taşınmıştır[4].

İnsanlarla bal arılarının ilişkileri çok öncelere dayanmaktadır. Paleolitik çağ ve öncesinde fırsatçı avcılıkla bal elde etmeye başlayan insanlar zaman içinde arıları kovan içinde yetiştirmeyi öğrenmişlerdir. İsrail'de bulunan M.Ö 10.000 yılına ait antik arı kovanları, arı yetiştiriciliğinin Neolitik çağın ilk zamanlarından beri var olduğunu ortaya koymaktadır [5, 6].

Bal arısı; baş, toraks (göğüs) ve abdomen (karın) olmak üzere 3 temel vücut kısmından oluşur. Baş üzerinde yerleşen gözler, antenler ve beslenme yapıları olarak proboscis (dil) ile mandibula (çeneler) bulunur.

Proboscis, sıvıları emmede, mandibula ise poleni ezme ve balmumunu şekillendirmek için kullanılmaktadır. Arıların üç basit (ocelli), iki bileşik olmak üzere beş gözü bulunur. Bileşik gözler ommatidia adı verilen bireysel olarak ışığı duyarlı yüzlerce hücreden oluşmuştur. Bu yapılar aracılığıyla gözler rengi, ışığa ve güneşin ultraviyole ışınlarından yön bilgisini algılar [3, 7].

Toraksa bağlı üç çift bacak bulunur. Üzerindeki özel yapılar ve kıllarla bacaklar arının kendisini temizlemesine, polen toplamasına ve taşımaya yardımcı olur. İşçi arıların arka bacakları, polenleri toplama ve taşımaya uygun olarak özelleşmiştir. Arka bacağın iç kısmını kaplayan kıllar polen taraclarını oluşturmaktadır. Arılar, ağızları ve bacakları ile topladıkları polenleri polen sepetine depolarlar. Toraks üzerinde bulunan diğer bir yapı ise spirakulumdur. Toraksta üç çift olarak bulunan spirakulumlar, solunum sisteminin dışa açılan kısımlarıdır. Birinci çift spirakulum, trake akarlarının yerleşim yeridir [3].

Abdomen, arının en önemli organlarını içeren kısmıdır. Sadece dişi arılarda bulunan arı iğnesi, abdomenin ucuna yerleşmiştir. Sadece işçilerde bulunan balmumu salgı bezleri, abdomenin alt kenarında; koku bezi ise iğnenin üzerindedir. İğne, dişi arıların yumurtlama organının (ovipositor) bir değişikliğe uğraması sonucu oluşmaktadır. Kraliçe arılar iğnelerini genellikle sadece rakip kraliçeleri öldürmek için kullanır. Bütün bir iğne yapısı; bir zehir kesesi, bir alkali bezi, birleşik alarm maddeleri ile kaslar ve sertleşmiş levhalardan oluşmaktadır. Sokma anında iğnenin eğrilmiş olta şeklindeki ucu deri içine yerleşir ve arı uzaklaşırken zehir kesesi dahil bütün iğne yapısı, arının vücudundan sökülür. Kaslar, yaklaşık bir dakika süreyle yeni çıkan bu kesenin temel kenarını pompalar, daha çok zehri yaraya göndermek için güç sarf eder. Sokma bölgesine, diğer işçilerin de sokmasını sağlayacak alarm kokuları bırakılır [3].

Bir kolonide işçiler, kraliçeler ve erkek arılar olmak üzere üç arı tipi bulunmaktadır. Bir arı kolonisinin en kalabalık üyeleri, steril (kısır) dişilerden oluşan işçi arılardır; normal bir kovanda işçilerin sayısı yaz ortasına kadar 40 000'e hatta daha fazlasına ulaşır. İşçi arılar erkeklerden daha küçüktür ve abdomenleri kraliçeden daha kısadır [2].

Bal arılarında partenogenez görülür; kraliçe ve işçi arılar döllenmiş yumurtalardan çıkarken, erkek arılar ise döllenmemiş yumurtalardan çıkmaktadır [2].

Yumurtalar, peteğin yavruluk kısmına bırakılır. Yumurtadan önce larva daha sonra pupa ve son olarak ergin arının oluşmasıyla tam metamorfoz süreci tamamlanmaktadır. Larva, büyük bir sindirim sistemi ile adeta yiyici bir makine halindedir. Her bir larva, günde 150–800 defa beslenmekte ve beşinci güne kadar kendi ağırlığının yaklaşık 900 katını kazanmaktadır. Larva, bu hızlı gelişme için 6 defa deri değiştirmektedir. Beşinci deri değiştirmede prepupa (önpupa) ortaya çıkmakta; son deri değiştirme ise tam arı çıkışından önce oluşmaktadır. İleride işçi arı olacakları önceden belirlenen larvalar, hipofaringeal bezler ve mandibular bezlerinden üretilen yavru bakım gıdası, polen ve bal ile beslenmektedir. Döllenmiş yumurtalardan çıkan ve özenli bir şekilde sadece arı sütüyle beslenen larvalar ise gelişerek kraliçe arıya dönüşmektedir. Pupa evresinde büyük iç ve dış morfolojik değişiklikler, meydana gelmekte; bu evrede bacaklar, kanatlar, abdomen ile bütün iç organlar ve kaslar gelişmektedir. Bu pupanın derisi ya da kutikulası, son bir deri değiştirdikten sonra yavaş yavaş kararır ve çıkış için ergin arı hazır hale gelir. Bu yeni çıkan arı, kutikulanın çok yumuşak olması nedeniyle, sertleşmesi için çıkıştan 3–4 saat önce kendi hücrelerinde kalır ve teneral arı olarak adlandırılır. Teneral arılar sokamaz ve nispeten yumuşaktır. Yumurtadan ergin arıya gelişim ve dönüşüm süreci kraliçe arıda 16, işçi arılarda 21 ve erkek arılarda 24 günde tamamlanmaktadır. Ömürleri yazın 40-60 gün, kışın ise 4-6 aydır [3].

Bal arıları, yaklaşık 4 km'ye kadar uçabilmektedir. Arıların bu kadar uzun mesafeler kat edebilmesi ve kovan içinde çok sayıda bireyin bulunması, onları çeşitli hastalıklara karşı hedef haline getirmekte ve bu hastalıkların çok geniş alanlara yayılmasına yol açmaktadır. Ayrıca kovan içi sıcaklığının 30–37 °C'de sabit tutulması birçok patojenin gelişmesine uygun ortam hazırlamaktadır [8, 9].

Bal arılarının, bal ve diğer arı ürünlerini üretmelerinin yanı sıra, uçuşları esnasında, hem yabancı hem de tarımsal değeri olan bitkilerin polinasyonunu sağlamaları nedeni ile sahip oldukları ekonomik önem, bu hastalıkların doğurduğu kaybı arttırmaktadır [10-13].

## **2.1. Bal Arısı Yavru Hastalıkları**

Sağlıklı kolonilerde yavrulu petekler, aralarında boşluk olmayan, birbiriyle sıkı bir şekilde bağlantılı yavru gözlerinden oluşmaktadır. Peteğin orta kısmından kenarlara doğru neredeyse bütün gözler işçi arı yumurta, larva ve pupalarını içerir. Tüm işçi arı petek gözlerinin kapakları aynı renkte ve konveks yapıdadır. Erkek arı gözleri dış kenarlarda, büyük ve dışa doğru kapaklı bir görünümde dir. Kraliçe arı gözleri ise Peteğin alt kısmında, dışa doğru uzanan bir yüzük biçiminde yer alır. Bunun aksine, hastalıklı kolonilerde; petek gözler arasında boşluklar bulunmaktadır. Ayrıca, petek gözlerinin kapakları koyu renkte, delikli ve içe çökük görünümde dir [9].

Yavru bal arılarında görülen hastalıklar, Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB), Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB), Kireç Hastalığı, Tulumsu Yavru Çürüklüğü ve Taş Hastalığı'dır [3]. Bunlardan AFB ve EFB bakteriyel, Kireç ve Taş fungal, Tulumsu Yavru Çürüklüğü ise viral etkenli hastalıklardır.

### **2.1.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü**

Amerikan Yavru Çürüklüğü, bal arısı larvalarını etkileyen bakteriyel bir hastalıktır. Etkeni gram pozitif, fakültatif anaerob ve spor oluşturan bir



bakteri olan *Paenibacillus larvae*'dir. Tedavi edilmediğinde hastalık, çoğunlukla koloninin çökmesi ile sonuçlanmaktadır.

Kısaca AFB olarak adlandırılan Amerikan Yavru Çürüklüğü arıcılık sektöründe çok büyük küresel ekonomik kayıplara neden olan, en tehlikeli arı hastalıklarından biridir. Oldukça bulaşıcı bir hastalıktır ve arıcılık malzemeleri, kovan materyali, işçi arılar ve kraliçe arı ile kolayca diğer kovan ve arılıklara bulaşabilir [14]. Tüm dünyada oldukça geniş bir alana yayılmıştır [15]. Bulaşımın önlenmesi amacıyla, kontrol önlemleri alınan çoğu arılıkta koloniler yakılmaktadır.

Hastalık etkeni olan bakteri ilk kez 1906 yılında hastalıklı ve ölmüş larvalarda White tarafından tanımlanmış ve vejetatif formunun sahip olduğu basil şeklinden dolayı *Bacillus larvae* olarak adlandırılmıştır. Amerikan Yavru Çürüklüğü adı, Philips tarafından, hastalığın ilk keşfedildiği yerin Amerika olmasından dolayı kullanılmıştır [16]. 1990'lı yıllarda, gelişen moleküler yöntemlerle taksonomik olarak yeniden incelenen *Bacillus* sınıfı önce 5 gruba ayrılmış; ardından içinde AFB etkeninin de bulunduğu üçüncü grup *Paenibacillus* adı verilerek ayrı bir cins olarak sınıflandırılmıştır [17, 18].

Daha sonra *Paenibacillus larvae* ile 1950 yılında Katznelson tarafından, yine hasta bal arısı larvalarından izole edilerek tanımlanan *Paenibacillus pulvifaciens*'in aynı cins içinde yer aldığı belirlenmiş; *Paenibacillus larvae larvae* ve *Paenibacillus larvae pulvifaciens* olarak iki alt türe ayrılmıştır. 10 yıl içinde gelişen tekniklerle yapılan yeni çalışmalar sonucunda iki alt tür birleştirilerek, *Paenibacillus larvae* adı altında tek tür olarak sınıflandırılmıştır [19, 20].

Son yıllarda, standart hale getirilmiş yeni tekniklerin geliştirilmesi ile farklı *P. larvae* suşları arasındaki ayrımın yapılabilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu ayrım AFB'nin epidemiyolojik çalışmaları için oldukça önemlidir [21].

*P. larvae* suşlarının ayırımında günümüze kadar kullanılmış ve halen kullanılmakta olan birçok teknik bulunmaktadır. Son yıllara kadar kullanılan yöntemler, hücre ve koloni morfolojisinin incelenmesi; SDS-PAGE ile tüm bakteriyel proteinlerin analizi veya biyokimyasal profilin çıkarılması gibi fenotipik özellikleri temel almaktadır [19, 22-25]. Ancak son 10-15 yılda genetik analizleri temel alan yöntemler daha çok ilgi çekmektedir. Restriksiyon endonükleaz fragment kalıpları, pulsed-field elektroforezi, AFLP (amplified fragment length polymorphism) analizi gibi yöntemler kullanılarak *P. larvae*'nin genetik çeşitliliği değerlendirilmeye çalışılmıştır [19, 26-29]. Kullanılan yöntemler arasında, en kesin ayrımı yapması ve tüm laboratuvarlarda eşit şekilde sonuç vermesi nedeni ile en çok tercih edilen yöntem Repetitif elementlerin PCR amplifikasyonu (rep-PCR) olmuştur [30, 31]. Bakteri genomunda, rastgele dağılmış üç set repetitif element bulunmaktadır. Bunlar, enterobakteriyel repetitif intergenik konsensus (ERIC) elemanları, repetitif ekstragenik palindromik (REP) elemanları ve boxA, boxB ve boxC'yi içeren Box elemanlarıdır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin genotiplendirmesinde faydalı olabilecek bu elemanları amplifiye eden primer çiftleri, birçok çalışma ile rapor edilmiş ve onaylanmıştır [30, 32]. Rep-PCR yöntemi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [22, 31, 33-37]. Rep-PCR yöntemi ile yapılan çalışmalarda kullanılan primer çiftine göre farklı genotip grupları oluşmaktadır. Bu yöntemde, en kullanışlı olan primerler ERIC1R-ERIC2'dir. Bu primer çifti ile *Paenibacillus larvae* 4 farklı genotip oluşturmaktadır (ERIC I, II, III and IV) [19]. Bunlardan ERIC I ve II geçmişteki alt tür *P. larvae larvae*'yi temsil ederken; ERIC III ve IV *P. larvae pulvifaciens*'i temsil etmektedir [14].

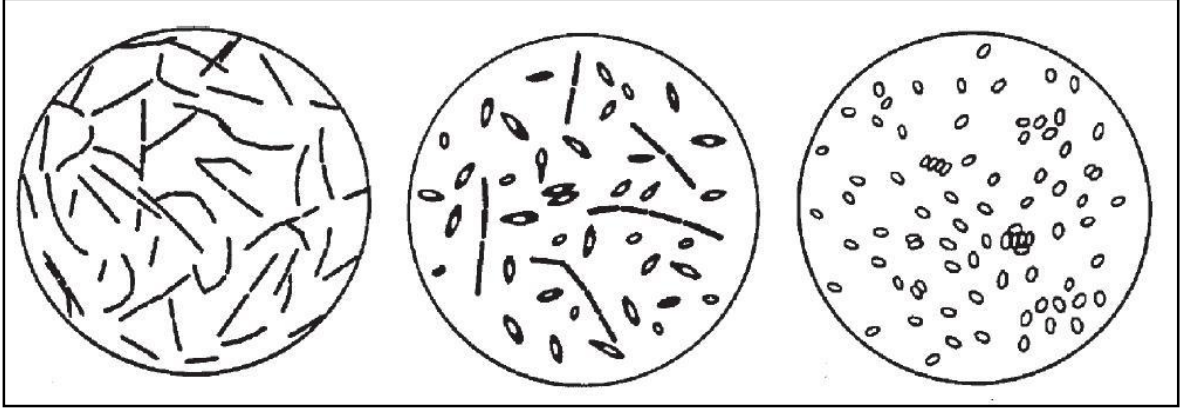
*P. larvae* genotip ERIC I en yaygın görülen genotiptir. ERIC I, hem Avrupa hem de Amerika'da bulunmaktadır. ERIC II ise sadece Avrupa kıtası ile sınırlı bir yayılım göstermektedir. ERIC III ve ERIC IV, onlarca yıldır toplanan arazi örneklerinde tespit edilmemiştir; ancak birkaç izolat kültür koleksiyonlarında saklanmaktadır [14].

Genotipik özelliği, *P. larvae*'nin oluşturduğu enfeksiyonda önemli etki göstermekte ve kovanlardaki ya da arılıklardaki multi-genotip enfeksiyonlar daha karmaşık halde görülebilmektedir. Enfeksiyon oluşumu ve klinik semptomların ortaya çıkma hızında farklılıklar, göstererek tespit ve teşhisi daha zor hale getirebilir [38, 39]. Genotipe bağlı virulans farklılıklarından en önemlisi ERIC I ve ERIC II' nin larvayı öldürme süresidir. ERIC I ortalama 12 günde larva ölümüne sebep olurken ERIC II, 7 günde larvaların ölmesine sebep olmaktadır [40]. ERIC I, II, III ve IV genotiplerinin birçok farklı karakteristik özelliği bulunmaktadır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. *Paenibacillus larvae* genotiplerinin karakteristik özellikleri[14]

Tür [19] Önceki Alttür[20]	<i>Paenibacillus larvae</i>			
	<i>P. l. larvae</i>		<i>P. l. pulvifaciens</i>	
ERIC genotipleri	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Patojenik, AFB semptomları	+	+	+	+
LT <sub>100</sub>	~12 gün	~7 gün	~7 gün	~7 gün
Pigmentli koloni morfolojisi	-	-	-	-
CSA'da hemoliz	-	-	+	+
Mannitol fermentasyonu	-	+	+	+
Salisin fermentasyonu	+	-	-	-

*Paenibacillus larvae*'nin vejetatif formu 2,5–5 µm boyunda, 0,5–0,8 µm eninde; spor formu ise 1,3 µm x 0,6 µm boyutlarındadır. Gram pozitif olan *Paenibacillus larvae*'nin vejetatif formu Gram boyama ile mor renkte boyanırken; karbol fuksin ile boyanan sporların duvarları kırmızımsı-mor renkte olmaktadır. Boya almayan spor merkezleri şeffaf görünmektedir [9, 41, 42] (Şekil 2.1.).



(a)

(b)

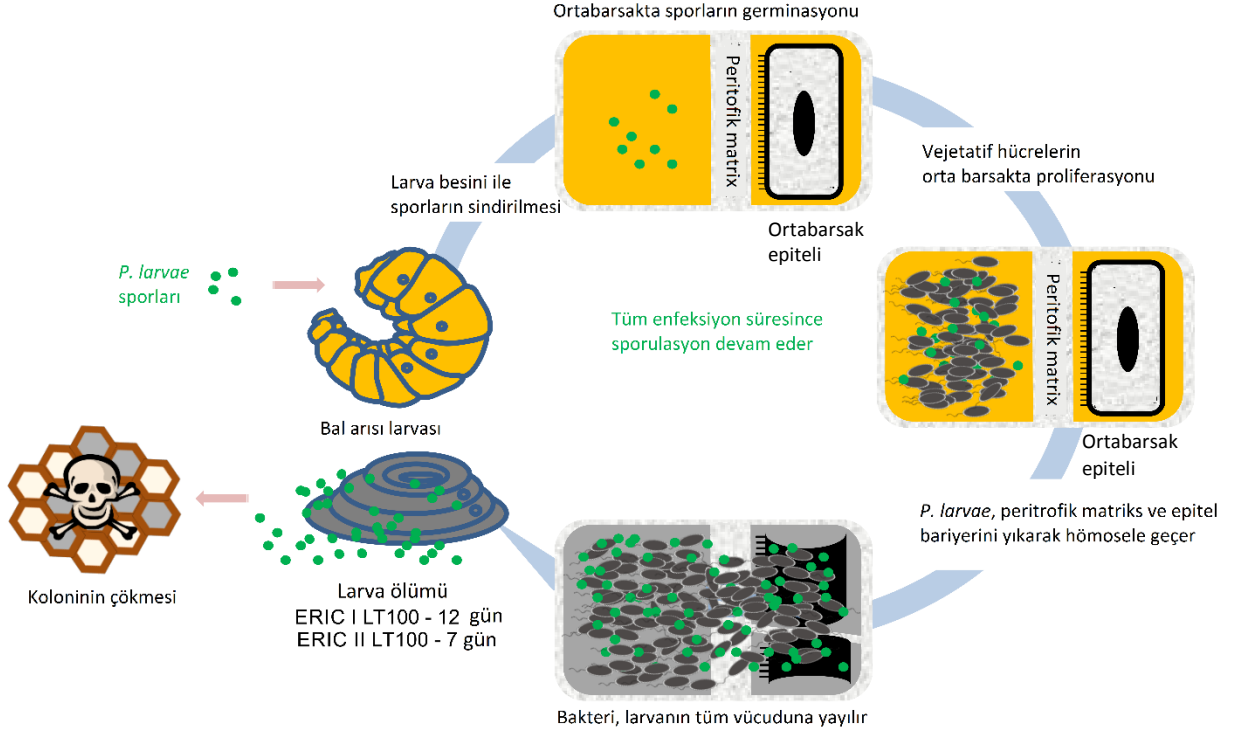
(c)

Şekil 2.1. (a) *Paenibacillus larvae*'nin vejetatif formu; (b) *Paenibacillus larvae* 'nin vejetatif-spor geçiş formu; (c) *Paenibacillus larvae*'nin spor formu [9]

Beslenme sırasında larvalara bulaşan sporer sindirim sistemine geçerek barsak lümeninde hızla vejetatif forma dönüşmektedir. Barsak lümeninde gelişen bakteriler, Salgıladıkları proteazlar ve toksinler sayesinde önce peritrofik matriksi daha sonra ekstraselüler matriks ve hücre-hücre bağlantılarını parçalayarak orta bağırsak epitel hücrelerine yerleşmektedir. Vejetatif hücreler, epitel hücrelerinin lizise uğramasının ardından, hemosöle geçerek hemolenf içinde hızla çoğalmaya başlamaktadır [40, 43]. Larva, hücrelerin parçalanması ve enfeksiyon sonucunda prepupa evresinde ölmektedir [44, 45]. Hastalığın ilk safhasında larvada renk değişikliği gözlenmektedir. Larvanın inci beyazı rengi önce açık kahverengiden koyu kahverengine doğru bir renge dönüşür. İlerleyen safhalarda bu renk siyah-kahverengine dönüşmektedir [9]. Hastalığın son aşamasında, *P. larvae*, ölü larvayı yapışkan iplikçik haline gelene kadar çürütmektedir. Bu yapı daha sonra kuruyarak içinde milyarlarca spor barındıran pulsu bir hale dönüşür [14] (Şekil 2.2).

Son yıllarda yapılan protein ve genom analizleri ile patojenitenin nasıl oluştuğu daha detaylı bir şekilde anlaşılmaya çalışılmaktadır. Yapılan

çalışmalar, *P. larvae*'nin çeşitli toksinler ve proteazlar ürettiğini göstermekle birlikte tam olarak etki mekanizması anlaşılamamıştır [40, 46, 47].



Şekil 2.2. *P. larvae* enfeksiyon mekanizması [40].

*Paenibacillus larvae*'nin patojenitesi oldukça fazladır. Bir günlük larvayı 10 spor bile enfekte edebilmektedir. Larva büyüdükçe enfeksiyon için gerekli spor sayısı artmaktadır [15, 42, 48].

Hastalıklı yavru gözlerde tipik belirtiler oluşmaktadır. Bunlardan en önemlisi sağlıklı peteklerin aksine yavru gözlerin sıkı ve bir bütün halinde olmaması, aralarda boş gözlerin bulunmasıdır. Kapalı yavru gözlerinin renkleri koyulaşmakta; kapakları delikli ve içe çökük bir hal almaktadır. Hastalığın sonraki safhalarında larva yapışkan ve ipliğimsi bir hal almakta ve 20–25 mm'ye kadar uzayabilmektedir (Şekil 2.3.). Hastalıklı peteklerin diğer bir tipik özelliği ise, tutkalımsı kötü bir kokusu olmasıdır [9].

Çoğunlukla temizleme özelliği fazla olan başka bir deyişle hijyenik davranışa sahip kolonilerde, kovan temizliğinden sorumlu olan işçi arılar, hastalıklı larvaları tespit edip kovan dışına atmaktadır. Ancak genellikle larva petek göz içinde kalmakta ve bir süre sonra kuruyarak petek gözün dip kısmına yapışmaktadır [42, 49].

Petek gözün tabanında bulunan larval kalıntı, içerdiği milyarlarca spor nedeniyle oldukça tehlikelidir. Kovan içindeki sporların 65-70 yıl kadar yaşayabildikleri tespit edilmiştir [9].



(a)

(b)

Şekil 2.3. Hastalıklı petek görünümü (a) İpliğimsi larval kalıntı; (b) Delik kapaklı yavru göz[50]

Ergin arılar, hastalıkla enfekte olmamalarına rağmen hastalığın yayılımı açısından oldukça büyük öneme sahiptir. Ergin arılar üzerlerinde yoğun miktarda spor taşıyarak bakterilerin bulaşımında rol almaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarla henüz klinik olarak belirti göstermeyen kolonilerde bile ergin arılardaki spordan hastalığın varlığının tespit edilebildiği görülmüştür [51].

Arı hastalıklarının iki bulaşım şekli vardır. Bunlardan biri, ana kovandan oğula bulaşma yolu olan dikey bulaşımdır. Diğer bulaşım yolu olan yatay bulaşım ise kovanlar arasında ve aynı kolonideki bireyler arasında gerçekleşmektedir. Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı, bu iki bulaşım

yol ile de bulaşabilir. *P. larvae* aynı koloni içinde ergin arılar aracılığıyla larvadan larvaya; bir koloniden diğerine; hatta ana koloniden oğula bulaşabilir [52, 53]. Hastalık, bu doğal bulaşım yolları dışında arıcıların yanlış teknikler uygulaması ve steril olmayan malzemeler kullanmasıyla oldukça hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Hastalıklı kovanlardaki peteklerin sağlıklı kovanlara aktarılması; arıların, hastalıklı ya da ölmüş kolonilerin balıyla beslenmesi ve uygun koşullarda sterilize edilmemiş hazır peteklerin kullanılması, *P. larvae'* nin kovandan kovana, arılıktan arılığa hızla bulaşmasına yol açmaktadır [16, 54].

Hastalığın tanısı, çeşitli mikrobiyal ve moleküler yöntemler kullanılarak larvalardan, peteklerden, baldan ve ergin arılardan yapılabilmektedir. En yaygın olarak kullanılan yöntem, hastalık şüphesi taşıyan yavrulu peteklerden alınan örneklerin laboratuvar ortamında mikrobiyolojik olarak incelenmesidir. Bu inceleme sonucunda elde edilen bakteriler üzerinde mikroskopik ve biyokimyasal testler uygulanarak kesin tanı konulmaktadır. Son yıllarda PCR uygulamaları ve ELİSA testleriyle kesin ve hızlı bir şekilde *P. larvae'* nin varlığı tespit edilebilmektedir [9, 23, 44, 55-57].

## **2.2. Amerikan Yavru Çürüklüğü Tedavi ve Mücadele Yöntemleri**

Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığında, hastalık etkeninin sporlu bir bakteri olması, tedavisini ve tedavi sonrası mücadelesini zorlaştırmaktadır. Hastalıkla mücadelede kültürel ve mekanik yöntemler, sentetik antibiyotiklerle tedavi yöntemleri ve bitkisel yağlarla tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak, en etkili yöntem eradikasyon yani içindeki arılarla beraber tüm kovan materyalinin yakılmasıdır [58].

### **2.2.1. Kültürel Yöntemler**

Hastalıklı kovanlardan alınan ergin arıların temiz kovanlara silkelenmesi en yaygın kullanılan kültürel yöntemdir. Hastalıklı petekler imha edilerek, yeni kovandaki kraliçe arının, temiz petekler üzerinde yeniden yavru yapması teşvik edilmektedir. Bu yöntem, hastalığın tamamen tedavi edilmesini sağlamazken, kolonideki spor yoğunluğunu azaltmaktadır [42]. Yapılan çalışmalar, bu yöntemin yeni kovanlara aktarılan kolonilerin hayatta kalma oranını ve süresini arttırdığını göstermiştir [59, 60].

### **2.2.2. Kimyasal Yöntemler**

Amerikan Yavru Çürüklüğü' nü tedavi edebilmek için çok sayıda antibiyotik kullanılmıştır. Sülfatiazole ile Oksitetrasiklin ilk kullanılan antibiyotikler olup, Linkomisin, Monensin ve Tilosin ise en etkin antibiyotiklerdir [61].

Antibiyotiklerin kullanımı iki önemli sorunu birlikte getirmektedir. Bunlar; bal ile diğer arı ürünlerinde kalıntı bırakması ve bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasıdır. Bu sebeplerden dolayı Avrupa Birliği ülkelerinde antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır [61-63].

### **2.2.3. Doğal Yöntemler**

Antibiyotiklerin getirdiği sorunlar, son yıllarda araştırmacıları alternatif yollar bulmaya yönlendirmiştir. Bunlardan en etkilisi de AFB tedavisinde antibakteriyel etkiye sahip olan bitkisel yağların kullanılmasıdır. Ticari kekik, tıbbi kekik, biberiye, sitrus, okaliptüs yağlarının ve bazı bitki ekstraktlarının etkili olduğu çeşitli araştırmalar sonucunda görülmektedir [58, 64-68]. Ayrıca propolisin AFB üzerine antibiyotik etkisiyle ilgili çalışmalar da yapılmıştır [69, 70].



Son yıllarda *Paenibacillus larvae*'nin biyokontrolüyle ilgili araştırmalarda çeşitli bakterilerin etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, bal arısı mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin antagonistik etki yaparak *P. larvae*'nin üremesini inhibe ettiği görölmektedir [71-73].

Ülkemizde yapılan birçok alışma, Amerikan Yavru ürüklüğü'nün Türkiye genelinde var olan bir hastalık olduğunu göstermektedir [74-80].

Amerikan Yavru ürüklüğü ile koloni düzeyinde mücadele etmenin ve yayılmasını önlemenin en etkili yolu hastalıklı kolonilerin kullanılan malzemelerle birlikte imha edilmesidir [42]. Ancak, ülkesel çapta hastalığı anlamak ve karşı koymak için epidemiyolojik çalışmalar yapılmalı ve sonuçları doğrultusunda önlem alınmalıdır [81].

Bu mücadele ve alternatif tedavi yöntemleri arasında propolis üzerinde durulması gereken bir arı ürünüdür. Biyoaktivitesi ve AFB üzerine etkisi ile ilgili yetersiz araştırma olması; bu konuyu ilgi çekici hale getirmektedir. Bu tez çalışması ile propolisin AFB üzerine etkisi daha detaylı olarak araştırılmaya çalışılmıştır.

### **2.3. Propolis**

Propolis, ağaçların kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden salgılanan maddelerin bal arıları tarafından toplanarak, kendi salgıları ile birleştirmeleri sonucunda oluşturdukları yapışkan bir maddedir [82]. Arılar, propolisi kovan içi temizliğin ve yalıtımın sağlanmasında kullanmaktadırlar. Kovan içinde, bakteri ve fungusların düşük insidansta olmasının sebebi olarak propolis görölmektedir. Ayrıca, propolis dış etkenlere karşı da bariyer oluşturmaktadır[83].

Arıların, patojenik mikroorganizmalara karşı en önemli koruyucusu olması nedeniyle propolis, eski çağlardan beri insanlar tarafından ilaç olarak kullanılmaktadır [84-86].

Propolisin, antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, antiinflamatuvar, antiülser, lokal anestetik, hepatoprotektif, antitümör gibi biyoaktivitelere sahiptir [86].

Propolisin bitkisel kaynağı onun kimyasal çeşitliliğini belirlemektedir. Propolisin kimyasal içeriği, toplanma bölgesinin lokal bitki örtüsü ile alanın coğrafik ve iklimsel özelliklerine bağlıdır. Propolisin kimyasal içeriğinin dikkat çeken çeşitliliği özellikle tropikal bölgelerde gözlenmektedir [87, 88].

Günümüzde propolis birçok alanda kullanılmaktadır. İlaç ve besin desteği olarak kullanılmasının yanısıra birçok kozmetik ve bakım ürününün de içeriğinde bulunmaktadır. Propolis, yaraların iyileşmesi, doku rejenerasyonu, yanıkların tedavisi, nörodermatit, bacak ülseri, sedef hastalığı, uçuk ve dermatofitlere karşı etkilidir. Propolisin romatizma ve burkulma tedavileri için de piyasaya sunulmuş formülasyonları mevcuttur. Diş hekimliğinde, kokainden 5 kat daha etkili bir anestetik olduğu iddia edilmektedir. Diş macunlarının içine katılarak, diş eti iltihabı, dudak iltihabı ve mukoza iltihaplarına karşı gargaralarda kullanılmaktadır. Kozmetikte de yüz kremi, merhem ve losyon şeklinde yerini almıştır. Avrupa'da propolisli ürün kullanımı Amerika'dan daha yaygındır; ancak Amerikan sağlık-yiyecek mağazalarında propolis, kapsül olarak satılmakta ve diş macunlarında kullanılmaktadır [83].

Propolisin kovan içinde anestetik ve öldürücü etki gösterdiği bilinmekte ve arı hastalıklarına karşı etkisi araştırılmaktadır [89]. Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni *Paenibacillus larvae*, Kireç hastalığı etkeni *Ascosphaera apis* ve Varroasis etkeni *Varroa destructor'* a karşı sırasıyla antibakteriyel, antifungal ve akarisidal etki gösterdiği çeşitli araştırmalarla tespit edilmiştir [69, 70, 90, 91].

### **2.3.1. Propolisin Tarihçesi**

Propolis, eski Yunan'da pro; ön, giriş ve polis; şehir anlamında bal arılarının kovan savunması ile ilgili olarak kullanılmıştır. Propolis çok eski çağlarda ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal antibiyotik olarak [92], Yunanlılar ve Romalılar tarafından deri apselerinin tedavisinde kullanılmıştır [93].

Propolisten insanoğlu çok eski zamanlarda yapıştırıcı olarak ve çatlakları kapatmak için faydalanmıştır. Tıpta ise özellikle antimikrobiyal özelliklerinden dolayı kullanımı yaygındır. Yunanca yazılmış olan "Historia animalium" adlı kitapta "mitys " denilen yaraların tedavisinde ve iltihabi yaralarda kullanılan bir maddeden bahsedilmektedir. Bu maddenin propolis olduğu düşünülmektedir. Kayıtlara göre papirüs kağıdı yapımında kullanılmış ve "siyah mum" olarak tanımlanmıştır [94].

17. yüzyılda Stradivari, propolisi telli çalgıların cilasında kullanmıştır. Günümüzde halen telli çalgılar için ve akordeonların tamiri için kullanılmaktadır [95]. Bunun dışında, etli yiyeceklerin saklanması için propolisin kullanıldığı bilinmektedir [96].

Propolisin kullanımına ait kayıtlar M.Ö. 300'lere dayanmaktadır ve günümüzde de yüzeysel ev ilaçları olarak ve kişisel ürünler olarak, başka ürünlere katılarak (diş macunu, beslenme desteği vb.) kullanımı devam etmektedir. Çünkü propolis antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik, kanama durdurucu, spazmolitik, iltihap-önleyici, anestetik ve antioksidan özelliklere sahiptir [97].

### 2.3.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis 15-25 °C arasında mum kıvamında, bunun altındaki düşük sıcaklıklarda katı-kırılgan, yüksek sıcaklıklarda (30-40 °C) ise yumuşak ve yapışkan bir yapıdadır. 80 °C de ise kısmen erimektedir [98].

Propolis, bitkisel kaynağına göre farklı renklerde oluşmaktadır. Bu renkler, sarı, yeşil ve koyu kahverengine kadar değişiklik göstermektedir (Şekil 2.4 ve 2.5.) [92].



Şekil 2.4. Sarı-yeşil renkte ham propolis örneği (Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)



Şekil 2.5. Koyu kahverengi ham propolis örneği (Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)

### **2.3.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri**

Propolis, genel olarak %50 reçine ve bitkisel balzam, % 30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik kalıntıları içeren diğer maddeleri içermektedir [99].

Propolisin ana bileşenlerinin çoğunun kaynağı flavonlar, flavonoller ve flavononlardır [84].

Propolisten izole edilen flavonoidler arının propolisi topladığı bitki kaynağıyla doğrudan ilgilidir. Farklı coğrafik bölgelere ait propolislerin kimyasal içeriği çok değişkendir [100].

Farklı coğrafik lokasyonlara ait propolislerin, kimyasal içeriklerindeki büyük farklılıklara rağmen, belirgin antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdiği saptanmıştır [101]. Bu çalışmalar farklı örneklerde, farklı maddelerin kombinasyonunun, propolisin biyolojik aktivitesi için gerekli

olduğunu göstermektedir. Bu yaklaşımı geliştirmek için, propolis örneklerinin coğrafik orijini ve biyolojik aktivitesi arasındaki istatistiksel ilişki, anlamlı bir korelasyon için araştırılmıştır. Sonuçlar, kimyasal içerikteki kesin farklılıklara rağmen, farklı propolislerin benzer aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [102].

Propoliste; vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E, nikotinik asit ve pantotenik asit değişik miktarlarda bulunmuştur. Propolisin bu bileşiklere ek olarak kül kalıntısı demir, kalsiyum, alüminyum, vanadyum, strontiyum, manganez ve silikon içerdiği de gösterilmiştir [84].

#### **2.3.4. Propoliste tanımlanan önemli bazı bileşikler**

Propolisin farmakolojik olarak aktif bileşenleri alkol gibi organik çözücülerde çözünen bileşiklerdir. En önemlileri flavonoidler, çeşitli fenolikler ve aromatiklerdir.

Alkoller:  $\alpha$ - ve  $\beta$ -gliserofosfat, arı metabolizmasından, gliserol mumdan ve diğer bileşenler kavak tomurcuğu sızıntısından türevlenmektedir.

Amino asitler: Propoliste amino asit miktarları çok düşüktür. Propoliste basit bir amino asit olan glutamik asitten türevlenen proglutamik asit tanımlanmıştır. Önemli bir propolis kaynağı olan kavak tomurcuk sızıntılarında ise hiç amino asite rastlanamamıştır. Propoliste bulunan amino asitin arılardan geldiği düşünülmektedir [103].

Alifatik asitler ve esterleri: Uzun zincirli asitler muhtemelen bal mumu kaynaklıdır. Kısa zincirli uçucu asit ve esterinin ise orijini bilinmemekle birlikte, kavak tomurcuk sızıntısından geldiğinden şüphelenilmektedir [103].

Aromatik asitler ve esterleri: Bir kaçının alerjen karşı, genellikle antifungal ve antibakteriyel özellikleri bulunmaktadır [103].

Flavonoidler: İnsan vücudunda sentezlenemeyen, bitki fitokimyasallarıdır. Flavonoidler altı gruba ayrılmıştır. Bu gruplar; flavononlar, flavonlar, flavonoller, isoflavonoidler, antosiyaninler ve flavanlardır [104]. Flavonoidler; bitkilerde UV-B radyasyonuna karşı koruma sağlarlar. Flavanoller ve flavonlar insan beslenmesinde özellikle önemlidir. Çünkü antioksidan olarak rol alırlar. Çalışmalar, flavonoid tüketimiyle kanser riski ve kardiovasküler hastalıkların azaldığını göstermiştir [105]. Birçok flavonoid, antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitelere sahiptir [106].

Hidrokarbonlar: Bu bileşikler hem arı metabolizmasından hem de kavak tomurcuk sızıntısından türevlenmektedir [103].

Terpenoidler ve diğer bileşenler: Uçucu C10 terpenoidler keskin kokuludur. Bu kokuların propolisin keskin kokusuna neden olabileceği düşünülmektedir [103].

### **3. MATERYAL-METOD**

Yapılan çalışmada, Türkiye çapından hastalık şüphesi taşıyan larvalı petek örnekleri toplanarak Hacettepe Üniversitesi Arı Sağlığı Laboratuvarı'nda mikrobiyal, biyokimyasal ve moleküler açıdan incelenmiştir. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilmiş propolis örnekleri ise Hacettepe Üniversitesi Palinaloji ve Arı Ürünleri Laboratuvarı'nda ekstrakt haline getirilmiş ve kimyasal analizleri yapılmıştır. Tez çalışmasında, elde edilen *Paenibacillus larvae* izolatlarının genotipleri belirlenmiş ve Propolis ekstraktlarının bu izolatlar üzerine antimikrobiyal etkisi karşılaştırılmıştır.

#### **3.1. Hastalıklı Yavrulu Peteklerin Toplanması**

Örnekler, tez çalışması kapsamında düzenlenen arazi çalışmaları ile Türkiye'nin 7 coğrafi bölgesinden homojen dağılım gösterecek şekilde belirlenmiş illerden toplanmış ya da bu illerdeki arıcular tarafından laboratuvarımıza gönderilmiştir. Örnek toplama aşamasında Amerikan Yavru Çürüklüğü şüphesi taşıyan koloniler belirlenerek; bu kolonilerden yavrulu petekler alınmıştır. Toplam 112 örneğin elde edildiği iller çizelge halinde sunulmuştur (Çizelge 3.1.). İllerin dağılımları harita üzerinde gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Çizelge 3.1. Örneklerin Elde Edildiği İller

1.	Ankara	17.	Kocaeli
2.	Antalya	18.	Manisa
3.	Artvin	19.	Mardin
4.	Balıkesir	20.	Muğla
5.	Bingöl	21.	Ordu
6.	Bitlis	22.	Rize
7.	Burdur	23.	Sivas
8.	Çankırı	24.	Tokat
9.	Çorum	25.	Trabzon
10.	Erzincan	26.	Yozgat
11.	Hatay	27.	Bayburt
12.	Isparta	28.	Bartın
13.	İçel	30.	Iğdır
14.	İstanbul	31.	Karabük
15.	Kars	32.	Düzce
16.	Kastamonu		



Şekil 3.1. Petek örneği toplanan iller

### 3.2. İzolasyon ve Kültürasyon

İlk aşamada, *Paenibacillus larvae*, hastalık şüphesi taşıyan yavrulu petekten izole edilmiştir. Öncelikle, iki adet steril pamuk eküvyon, 5'er yavru göze batırılıp-çıkarılmış ve eküvyonlar 5 ml steril PBS (pH:7.2) içinde yıkanmıştır. Daha sonra, vejetatif bakterileri elimine etmek amacıyla 80 °C su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Her bir örnek için 150 µl alınarak antibiyotikli MYPGP agara (Muller Hinton/Yeast extract/Phosphate/Glucose/Pruvate Agar) (Çizelge 3.2.) inokulasyon yapılmıştır [107]. Daha sonra 37 °C'de 3-4 gün süre ile inkübe edilmiştir [21, 108].

### 3.3. Mikrobiyal ve Biyokimyasal Analizler

Amerikan Yavru Çürüklüğü tanısını koyabilmek amacıyla biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. MYPGP agarda üremiş olan bakteri kültürü öncelikle katalaz özelliği bakımından incelenmiştir.

*Katalaz Testi:* Bir damla %3' lük hidrojen peroksit, 37 °C'de 3-4 gün inkübe edilmiş kültürden lam üzerine alınan bakteri örneğine damlatılır.

Çoğu aerobik bakteri, peroksiti su ve oksijene parçalayarak köpük oluşumuna neden olur, fakat *P. larvae* bu teste daima negatif reaksiyon vermektedir [9, 109].

İndol Testi: Triptofan bulunan bir besiyerinde üretilen bakterilerin, triptofanı hidrolize uğratarak indol oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla yapılan bir testtir (Çizelge 3.2.). Triptofanlı besiyerine inokülasyon yapıldıktan sonra, 72 saat süresince inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 0.2–0.3 ml kovaks ayırıcı ilave edilir. Üst kısımda kırmızı renk oluşumu pozitif reaksiyonun, sarı-kahverengi ise negatif reaksiyonun göstergesidir [110].

Metil Red Testi: Glukozun karışık asit fermentasyonu ile kullanılıp kullanılmadığını tespit etmek amacıyla uygulanmaktadır. Glukoz fosfatlı sıvı besiyerine ekim yapılmasının ardından 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası, kültüre metil red ayırıcı damlatılır ve oluşan rengin kırmızı ya da sarı olmasına göre sonuç belirlenir (Çizelge 3.2.). Renk kırmızı ise bakteri fermentasyon sonucu organik asitler oluşturmuş demektir ve test pozitifdir. Rengin sarı olması halinde ise sonuç negatifdir [110].

Voges-Proskauer Testi: 37°C' de 24 saatlik Glukoz fosfatlı besiyerinde üremiş kültürden alınan bakteri örneği üzerine 0,6 ml %5' lik  $\alpha$ -naftol ve 0,2 ml %40' lık KOH damlatılıp tüp çalkalanarak (oksijenle temas sağlanarak) 10–15 dakika sonunda kırmızı rengin (+) oluşup oluşmadığı incelenir [109].

Nişastanın Hidrolizi Testi: Nişastalı besiyerinde 37 °C'de 1–2 günlük inkübasyon sonucu nişasta hidrolizinin oluşumu, besiyeri üzerine iyodür damlatılarak anlaşılmaktadır. Nişastanın amilaz enzimine sahip bakterilerce parçalanması sonucu iyodür, besiyerinde mavi renk oluşturmamaktadır [109].

Ekim yapılan besiyerinde üreme gösteren bakteri, Gram-boyama yapılarak Gram özelliği, hücre ve spor morfolojisi açısından mikroskopik; koloni morfolojisi ve pigment oluşturma özellikleri açısından ise makroskopik olarak incelenmiştir [19].

Çizelge 3.2. Kullanılan besiyeri ve ayraçların içerikleri

Besiyeri	İçeriği
MYPGP Agar	% 1,0 Muller Hinton Broth %1,5 Maya ekstresi %0,1 Sodyum piruvat ( $\text{CH}_3\text{COCOO Na}$ ) %0,2 Glukoz %0,3 Dipotasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) %2,0 Agar %0,002 Pipemidik Asit %0,001 Nalidiksik Asit
Triptofanlı Besiyeri	%1 Tripton %0,1 L-Triptofan %0,5 Sodyum klorit
Glukoz Fosfatlı Besiyeri	%0,5 Glukoz %0,5 Dipotasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) %0,5 Proteoz pepton
Nişastalı Besiyeri	Nütrient agar %0,4 Nişasta
Kovacs Ayracı	5 gr Paradimetilaminobenzaldehit 75 ml Amil alkol 25 ml Hidroklorik asit (HCl)

### 3.4. İdentifikasyon

Amerikan Yavru Çürüklüğü tanısını koyabilmek amacıyla biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. MYPGP agarda üreme göstermiş, katalaz negatif, Gram-pozitif özellikte ve strepto-basil formunda olan kültürlerin kesin tanısı için 16S rRNA gen bölgesi için spesifik primerler seçilerek PCR metodu kullanılmıştır [21, 108, 111].

*DNA izolasyonu:* DNA izolasyonu için, bakteri kültüründen alınan küçük bir koloni 50 µl DNaz içermeyen deiyonize su içinde süspanse edilerek 95 °C' de 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kalıp olarak kullanılmıştır.

*16 S rRNA PCR:* PCR işlemi 25 µl son hacimde (1 µl dNTP, 0,5 µl Qiagen 10X PCR buffer, 1 µl AFB forward primer, 1 µl AFB reverse primer, 0,25 µl Qiagen HotstarTaq 5 units/ul, 1 µl DNA kalıp) Qiagen kit kullanılarak yürütülmüştür. Kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3'te sunulmuştur. PCR döngüsü Çizelge 3.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. AFB Forward ve AFB Reverse primerler [111]

---

Primer 1 F 5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'

---

Primer 2 R 5'- TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG-3'

---

Çizelge 3.4. 16 S rRNA PCR aşamaları

Aktivasyon	95 °C	15 dk	1X
Denatürasyon	93 °C	1 dk	
Annealing (Primerlerin bağlanması)	55 °C	30 sn	X30
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	5 dk	1X

*Elektroforez:* Elektroforez, 0,5 X TBE ile hazırlanmış %1,4 agaroz jel kullanılarak yapılmıştır. Yürütme aşamasında, 2 µl 6X veya 1 µl 10X yükleme boyası ve 1 kb plus DNA ladder (GeneRuler 1 kb plus DNA ladder 1 kb plus 0,1 µg/µl) kullanılmış; her bir örnekten 10 µl yüklenmiştir. 100 V 30-45 dk yürütülen jel, 15 dk Etidium bromür solüsyonu içinde boyandıktan sonra incelenerek fotoğrafları çekilmiştir [21].

### 3.5. rep-PCR Analizi ile Genotiplendirme

Her bir *Paenibacillus larvae* izolatu, genotipleri açısından incelenmiştir. Bu çalışma, Genersch et al. 2006'da belirtilen protokol ve primerler temel alınarak yapılmıştır [19]. Ancak, belirtilen protokolün laboratuvar koşullarına tam olarak uyum sağlaması ve net sonuçlar elde edilememesi dolayısı ile farklı sıcaklık ve içerik kombinasyonları denenerek en iyi sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Protokolü daha verimli hale getirmek amacıyla üzerinde bazı değişiklikler yapılmıştır.

*DNA izolasyonu:* Kültürden alınan bir bakteri kolonisi 200 µl steril deiyonize su içerisinde süspanse edilerek 12.000rpm de 2 dakika santrifüj edilmiş; daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet 150 µl InstaGene Matrix ile tekrar süspanse edilerek, 56 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından yüksek hızda vortekslenen tüpler 100 °C'de 20 dakika bekletilmiş; ardından vortekslenerek 12.000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. 25 µl final hacimde hazırlanan PCR için, 5 µl süpernatant kalıp olarak kullanılmıştır [19, 21].

*ERIC PCR:* Bu aşamada öncelikle makalede önerilen protokol takip edilmiş ancak net sonuç alınamamıştır. Daha sonra, protokol öncelikle, 51-59 °C sıcaklıkları arasında gradient PCR (Çizelge 3.5.-3.6.-3.7.); sonra da farklı MgCl<sub>2</sub> miktarları eklenerek (0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 µl /2,5 µM) gradient PCR (Çizelge 3.8.-3.9.) yapılarak optimize edilmiştir. Buna göre, MgCl<sub>2</sub> miktarı 3 µl ve annealing sıcaklığı 52,4 °C olarak belirlenmiştir [19, 21].

Çizelge 3.5. ERIC primerleri [30]

ERIC1R	5´-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3´
ERIC2	5´-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3´

Çizelge 3.6. Gradient PCR içeriği

	<i>25 µl reaksiyon hacmi</i>
*10x reaksiyon tamponu(1,5 µl MgCl <sub>2</sub> içeren)	2,5 µl
*2,5 µM MgCl <sub>2</sub>	1µl
*250 µl dNTP (her birinden 10 µl)	1 µl
*10 µl primer Eric 1	1 µl
*10 µl primer Eric 2	1 µl
*0,3 unite Taq (stok 5 unite/µl)	0,25 µl
*H <sub>2</sub> O	13,25 µl
*Instagene Matrix ile elde edilen örnek	5 µl

Çizelge 3.7. Gradient PCR protokolü

Aktivasyon	95 °C	15 dk	1X
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Annealing	<b>51-59 °C</b>	1 sn	X35
Uzama	72 °C	2,5 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	1X

Çizelge 3.8. Sıcaklık-Mg Gradient PCR içeriği

	<i>25 µl reaksiyon hacmi</i>
*10x reaksiyon tamponu(1,5 µl MgCl <sub>2</sub> içeren)	2,5 µl
*2,5 µM MgCl <sub>2</sub>	<b>0-0,5-1-1,5-2µl</b>
*250 µl dNTP (her birinden 10 µl)	1 µl
*10 µl primer Eric 1	1 µl
*10 µl primer Eric 2	1 µl
*0,3 unite Taq (stok 5 unite/µl)	0,25 µl
*H <sub>2</sub> O	13,25 µl
*Instagene Matrix ile elde edilen örnek	5 µl

Çizelge 3.9. Sıcaklık-Mg Gradient PCR protokolü

Aktivasyon	95 °C	15 dk	1X
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Annealing	<b>51,4-52,4-53,3 °C</b>	1 sn	X35
Uzama	72 °C	2,5 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	1X



*Elektroforez:* Elektroforez, 0,5 X TBE ile hazırlanmış %1,4 agaroz jel kullanılarak yapılmıştır. Yürütme aşamasında, 2µl 6X veya 1 µl 10X yükleme boyası ve 1 kb plus DNA ladder (GeneRuler 1 kb plus DNA ladder 1 kb plus 0,1 µg/µl) kullanılmış; her bir örnekten 10 µl yüklenmiştir. 100 V 30-45 dakika yürütülen jel, 15 dakika Etidium bromür solüsyonu içinde boyandıktan sonra incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.6. Kullanılan Propolis Örnekleri ve Araziden Toplanması**

Tez çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Palinoloji Laboratuvarı'nda ekstrakte edilmiş ve GC-MS ile test edilmiş 14 adet propolis ekstraktı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan propolislerin ekstrasyonu ve GC-MS analizleri Dr. Ömür GENÇAY ÇELEMLİ tarafından yapılmıştır.

Tüm propolis örnekleri Türkiye'nin farklı bölgelerinden, Eylül ayında toplanmıştır (Şekil 3.2., Çizelge 3.10). Örnekler propolis tuzakları kullanılarak ya da kovanların kenarlarından, dip tahtasından ve çerçeve kenarlarından çelik bir spatula ile kazınarak alınmıştır (Şekil 3.3-3.4).



Şekil 3.2. Propolis örneklerinin toplandığı iller

Çizelge 3.10. Toplanan propolis örnekleri

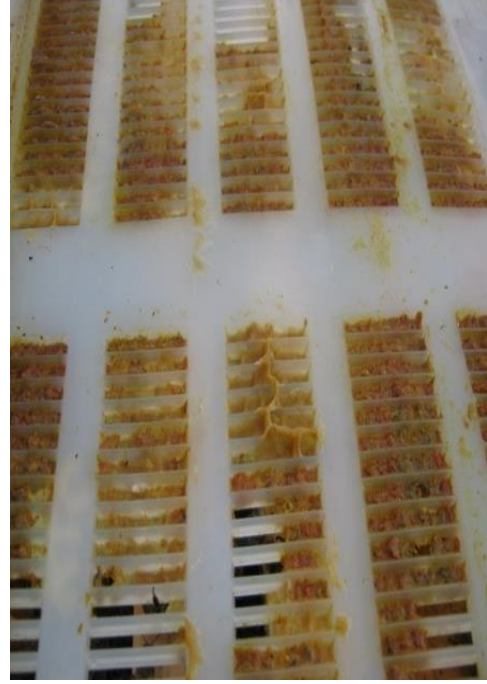
Örnek No	Örnekler
1.	Bartın 1
2.	Bartın 2
3.	Artvin
4.	Tekirdağ 1
5.	Tekirdağ Paçal
6.	Türkiye Paçal
7.	Bursa
8.	Rize
9.	Kastamonu
10.	Kırklareli
11.	Ankara
12.	Çanakkale
13.	İzmir
14.	Muğla



Şekil 3.3. Propolis toplanan arılık örneği (Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)



(a)



(b)

Şekil 3.4. Propolis toplanan (a) kovan ve (b) propolis tuzağı örneği  
(Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)

### 3.7. Propolis Örneklerinin Ekstrakte Edilmesi

Donmuş olarak saklanan her bir propolis örneği ezilmiş ve 1:3 (w/v) oranında %96'lık alkol içinde çözülmüştür. Karışım, ağzı sıkıca kapalı bir şişe içinde 30 °C'deki inkübatörde iki hafta bekletilmiştir (Şekil 3.5.). Daha sonra, süpernatant iki kez Whatman (Maidstone, England) No. 4 ve No. 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Filtre edilmiş haldeki solüsyon (1:10, w/v) Propolisin etanol ekstraktı olarak tanımlanmış ve bu derişim %100'lük konsantrasyon olarak kabul edilmiştir. (Şekil 3.6) [87, 88].



Şekil 3.5. Propolisin etanol ekstrasyonunun hazırlanması (Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)



Şekil 3.6. Propolis örneklerinin etanol ekstraktları (Fotoğraf: Aygün Schiesser)

### 3.8. GC-MS Analizleri ve Propolislerin Özellikleri

Propolis ekstraktlarının GC-MS analizlerinin yapılmasında, Agilent GC 6890N Agilent (Palo Alto, CA, USA) ve kütle dedektörü (MS5973; Agilent) kullanılmıştır (Şekil 3.7.). Öncelikle, propolisin etanol içinde çözülmesi ile hazırlanan ekstraktlar, kuru hale gelene kadar alkolü uçurulmuştur. Daha sonra, 5 mg kuru madde 75 µl kuru piridin ve 50 µl bis (trimetilsilil)-trifloroasetamid (BSTFA) ile karıştırılarak 80 80 °C'de 20 dakika ısıtılmıştır. Son süpernatant, gaz kromatografisi ve kütle spektrofotometrisi (GC-MS) ile analiz edilmiştir [98].

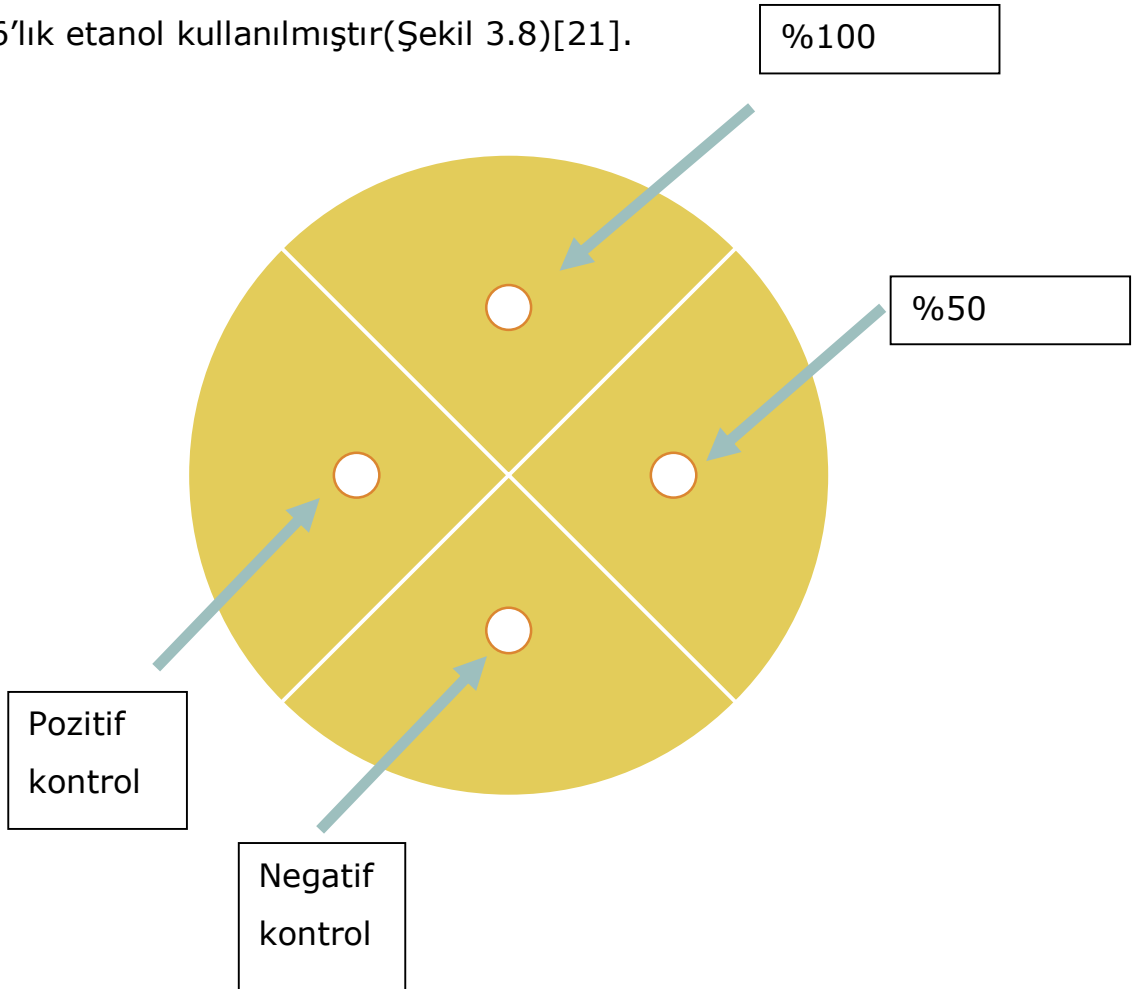
Organik bileşikleri tanımlama, NIST 98.L, Wiley 7n., Pest. Kütüphaneleri kullanılarak, bilgisayar ortamında yapılmıştır.



Şekil 3.7. GC-MS cihazı (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Palinoloji Laboratuvarı) (Fotoğraf: Ömür Gençay Çelemlı)

### 3.9. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ile Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkisinin Saptanması

Bu çalışmada, propolis ekstraktlarının *Paenibacillus larvae* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkisini tespit etmek amacıyla; antimikrobiyal duyarlılık testlerinden, en yaygın olarak kullanılan, "Disk difüzyon metodu" tercih edilmiştir. Propolis örneklerinin %100 ve %50' lik konsantrasyonları ayrı ayrı denenerek, farklılıklar karşılaştırılmıştır. %50'lik konsantrasyon %96'lık etanol ile dilüe ederek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak 30 mg Tetrasiklin diski, negatif kontrol olarak ise %96'lık etanol kullanılmıştır(Şekil 3.8)[21].



Şekil 3.8. Disk difüzyon testi

*Disklerin hazırlanması:* Hazır olarak alınan boş antibiyotik disklerine 14 farklı propolis ekstraktının %100'lük ve %50'lik konsantrasyonlarından 10 µl eklenerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak hazır 30 mg'lık Tetrasiklin diskleri temin edilmiş; negatif kontrol için boş disklere 10 µl %96'lik etanol emdirilmiştir.

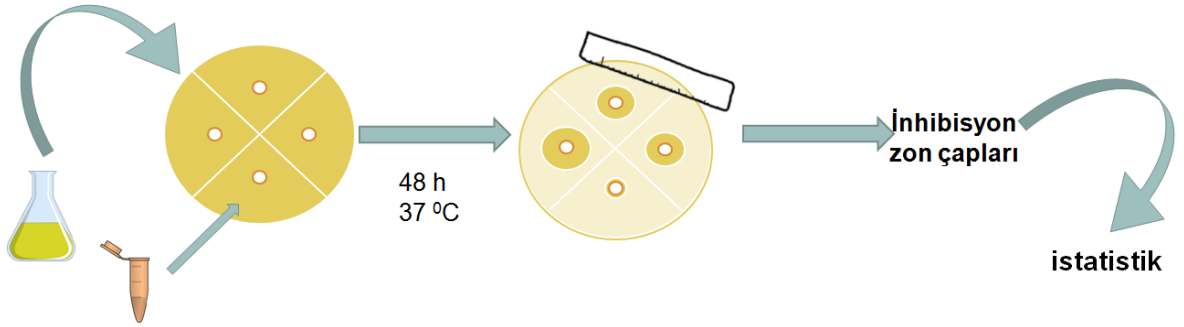
*Besiyerlerinin hazırlanması:* Antibiyotik eklenmeden hazırlanan MYPGP agar, petrilere 4 mm kalınlığında dökülmüştür. Petriler bir süre buzdolabında bekletildikten sonra yüzeylerinde su damlacıkları olmamasına dikkat edilerek test için kullanılmıştır.

*Bakteri kültürlerinin hazırlanması:* *Paenibacillus larvae* izolatları MYPGP broth besiyerinde 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Bakteri kültürleri (Fotoğraf: Aygün Schiesser)

*Duyarlılığın tespiti:* 48 saatlik kültürler öncelikle Neubauer lamında sayılmış ve yoğunluk  $1 \times 10^8$  CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Alınan 0,1 ml kültür MYPGP agar üzerine yayma ekim tekniği ile inoküle edilmiştir. Kısa bir süre bekletildikten sonra besi yeri üzerine diskler yerleştirilmiştir. Test her bir örnek için, 2 kontrol halinde uygulanmıştır. Uygulamadan sonra petriyer 37°C' lik etüve ters şekilde yerleştirilmiştir. 48 saatlik inkübasyonun ardından zon çapları ölçülmüştür (Şekil 3.10) [21].



Şekil 3.10. Disk difüzyon testinin uygulanması

### 3.10. İstatistiksel Analizler

Propolis örneklerinin antimikrobiyal etkisini saptamak ve etkinin genotipler üzerindeki anlamlı farklılıklarını tespit etmek amacı ile One-way ANOVA ve Duncan testleri uygulanmıştır. Ayrıca ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerlerini belirlemek için deskriptif analizler yapılmıştır. Tüm analizler için IBM SPSS 21 programı kullanılmıştır.

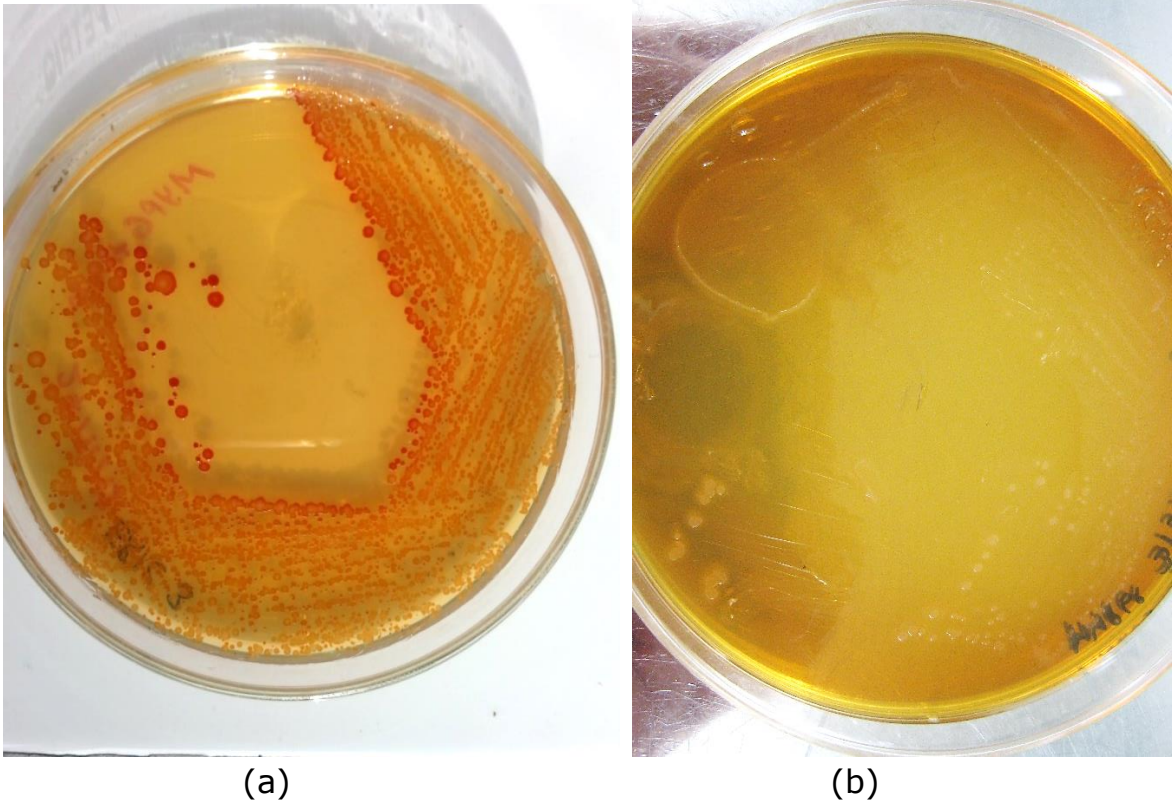


## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

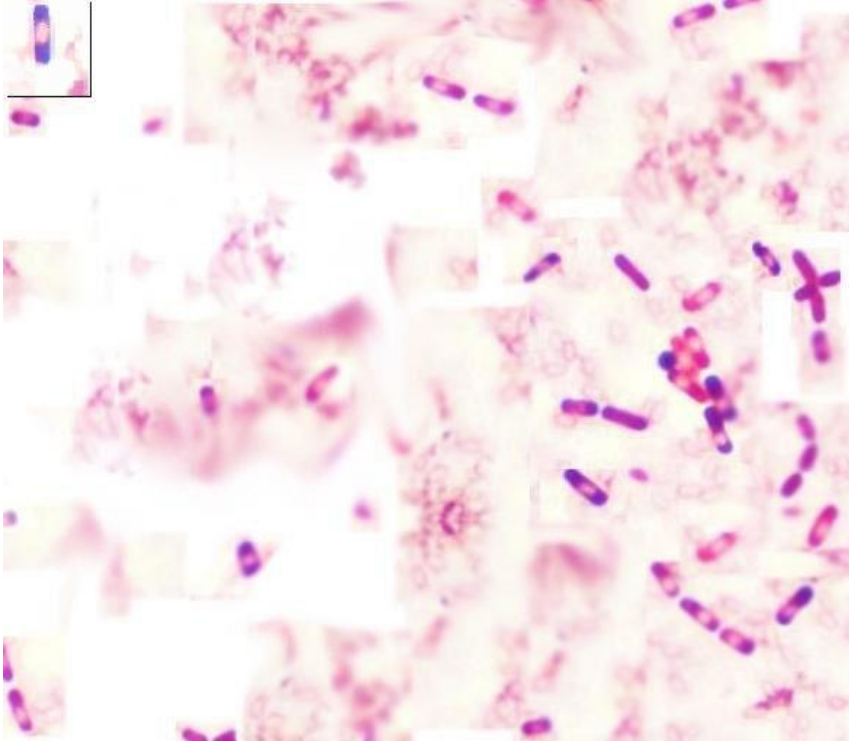
Yapılan arazi çalışmaları ile elde edilen 112 petek örneği ve *Paenibacillus larvae* genotiplerinin kültür koleksiyonu izolatları üzerinde çalışılmıştır. Bu kültürler üzerinde mikrobiyal ve moleküler analizler yapılmış; sonuçlar istatistiksel testlerle değerlendirilmiştir.

### 4.1. Mikrobiyal ve Biyokimyasal Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar

Çalışma kapsamında laboratuvara getirilen petek örneklerinden antibiyotikli MYPGP agar kullanılarak izolasyon ve kültürasyon yapılmıştır. MYPGP agarda üreme gösteren kültürlere biyokimyasal testler uygulanmış ve Gram boyama yapılarak mikroskobik olarak incelenmiştir (Şekil 4.1-4.2). Biyokimyasal testlerin sonuçları çizelge halinde sunulmuştur (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.1. MYPGP agar üzerinde pozitif üreme (a) Pigmentli (b)Pigmentsiz koloniler (Fotoğraf: Aygün Schiesser)



Şekil 4.2. *Paenibacillus larvae* Gram boyama preparatı (Fotoğraf: Aygün Schiesser-Edibe Özmen)

Çizelge 4.1 Biyokimyasal Test Sonuçları

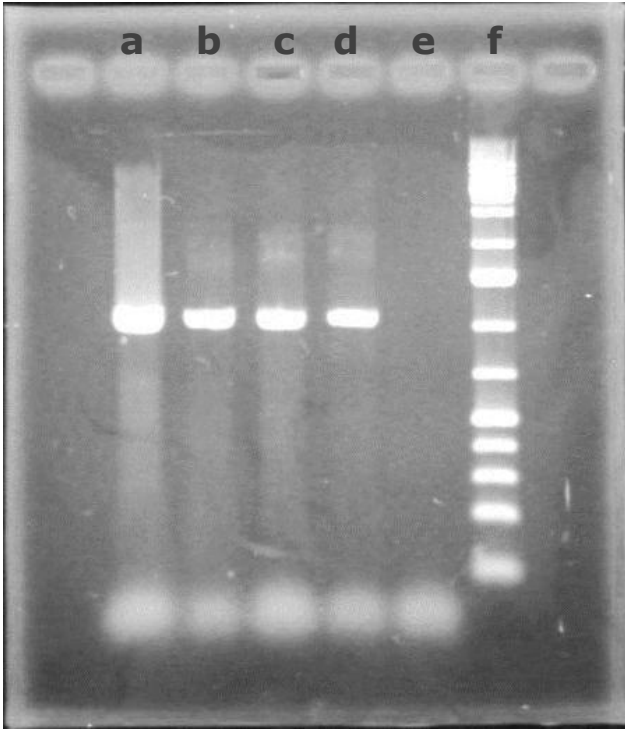
Hastalık	Bakteri türü	Katalaz	İndol	Metil Red	Voges Proskauer	Nişastanın hidrolizi	Gram özelliği
AFB	<i>P. larvae</i>	-	+	+	-	-	+

#### 4.2. Moleküler Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar

Çalışma, aşamalar halinde yürütülmüş ve her bir genotip 16S rRNA PCR ve Rep-PCR yöntemleri ile incelenmiştir. Sonuçlar, aşağıda sırasıyla verilmiştir.

#### 4.2.1. *Paenibacillus larvae*'nin 16S rRNA PCR sonuçları

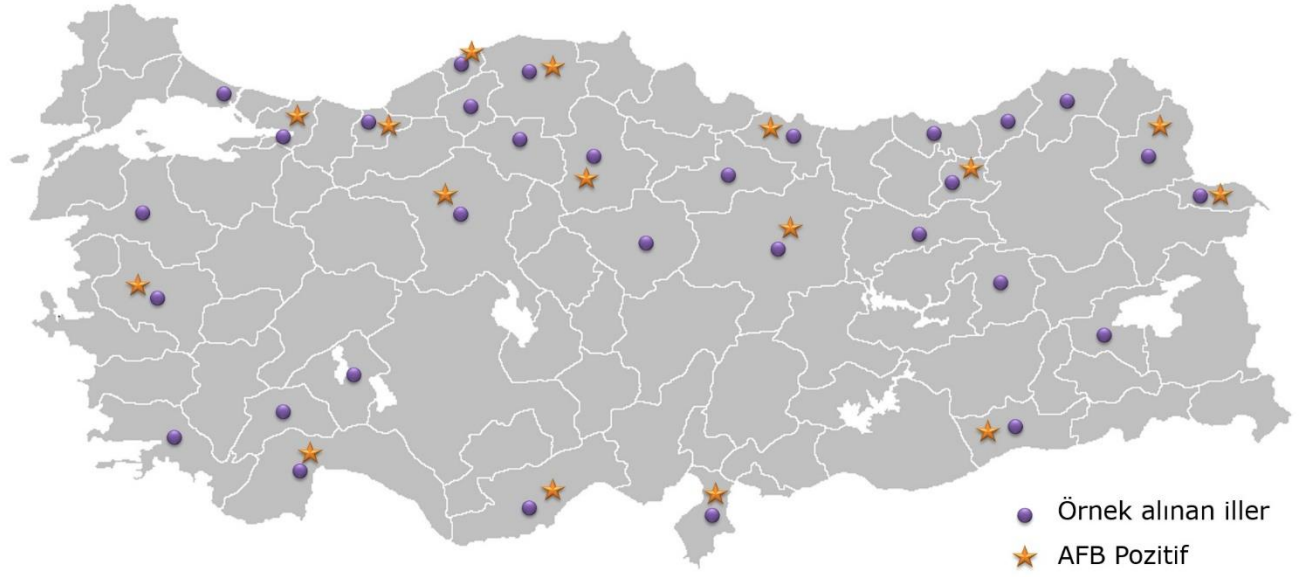
Mikrobiyal ve biyokimyasal analizler sonucu AFB açısından pozitif olan petek örnekleri tespit edilmiş; bu örneklerden *P. larvae* izolatları saf kültür haline getirilmiştir. Daha sonra bu kültürlerin kesin teşhisinin yapılabilmesi amacı ile 16s rRNA gen bölgesini temel alan PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Spesifik primerler kullanılarak yürütülen PCR sonucu 1000 kb büyüklüğünde bantlar oluşturan örnekler pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.) [21, 111]. Mikrobiyal ve moleküler analizlerin sonuçlarına göre 22 izolat *P. larvae* olarak teşhis edilmiştir (Çizelge 4.2.). Pozitif örneklerin elde edildiği iller ve dağılımları harita üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. 16S rRNA PCR sonucu a)06/04 b)07/04 c)31/10 d) *Paenibacillus larvae* pozitif kontrol ATCC 9545 e)Negatif kontrol f) Qiagen GelPilot 1 kb Plus ladder (Fotoğraf: Aygün Schiesser)

Çizelge 4.2.Amerikan Yavru Çürüklüğü Açısından Pozitif Örnekler

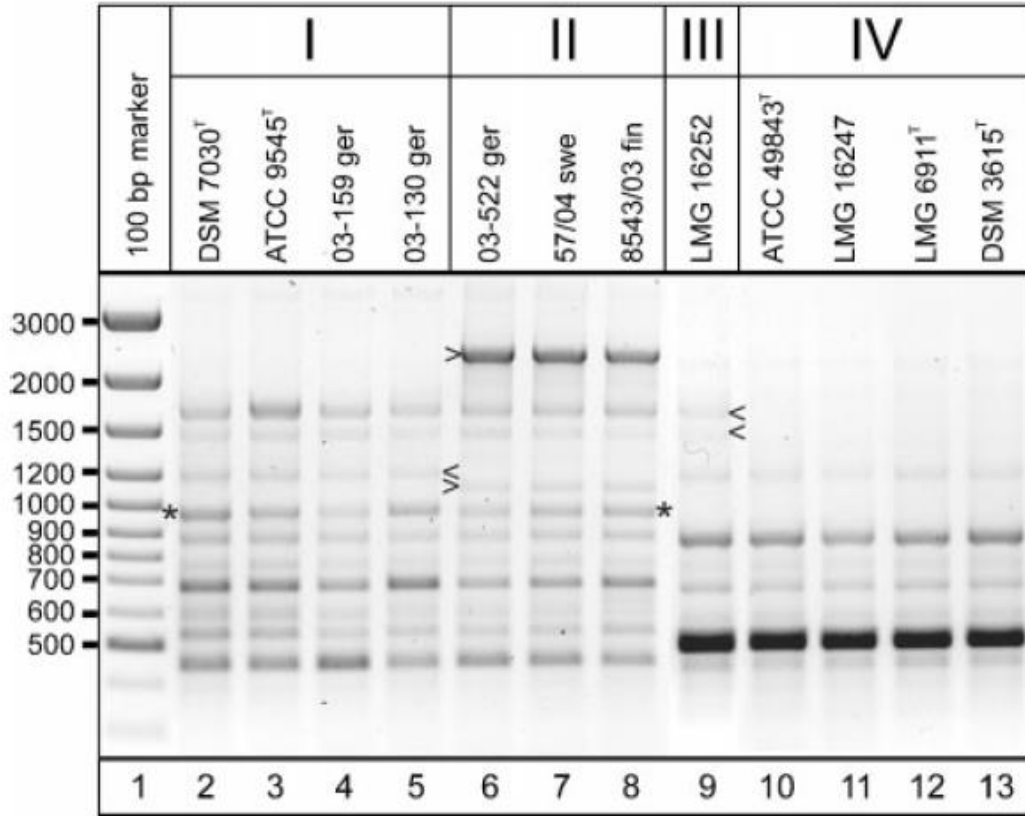
	İl	Örnek no
1.	Ankara	06/04
2.	Ankara	06/14
3.	Ankara	06/26
4.	Antalya	07/04
5.	Çorum	19/04
6.	Hatay	31/10
7.	İçel	33/01
8.	Kars	36/01
9.	Kars	36/02
10.	Kars	36/04
11.	Kastamonu	37/02
12.	Kocaeli	41/06
13.	Manisa	45/01
14.	Mardin	47/01
15.	Ordu	52/15
16.	Sivas	58/04
17.	Bayburt	69/01
18.	Bartın	74/02
19.	İğdır	76/12
20.	İğdır	76/13
21.	İğdır	76/14
22.	Düzce	81/21



Şekil 4.4. AFB şüphesi taşıyan örneklerin toplandığı ve pozitif sonuç elde edilen iller

#### 4.2.2. Rep-PCR ile Genotiplendirme Sonuçları

Genotiplendirme için kullanılacak PCR protokolü, en verimli sonuçları elde edilebilmek amacı ile revize edilmiştir. Sıcaklık ve Mg gradient PCR uygulanarak optimum bağlanma sıcaklığı ve  $MgCl_2$  miktarı belirlenmiştir. Buna göre Rep-PCR analizleri için optimum bağlanma derecesinin  $52,4\text{ }^{\circ}C$  ve  $MgCl_2$  miktarının  $3\ \mu l$  olduğuna karar verilmiştir. Her bir genotipin ayrımı, bu koşullarda yapılan PCR sonuçlarına göre yapılabilmektedir. Genotiplerin ayrımı Genersch et. al, 2006 [19] tarafından belirlenen spesifik bant oluşumları ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5.).

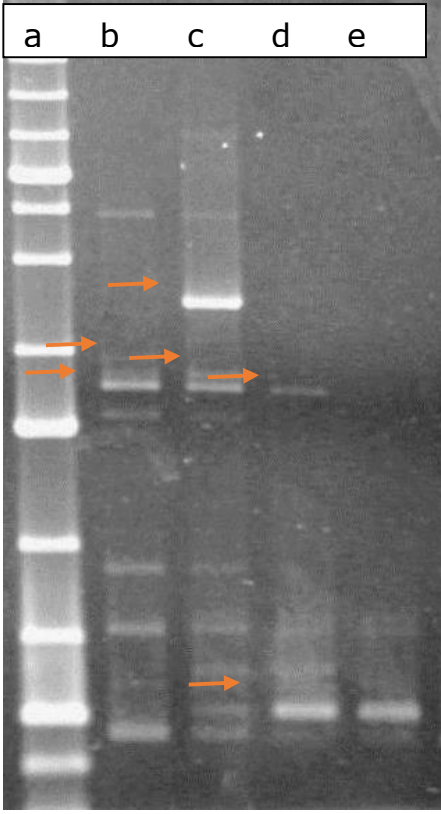


Şekil 4.5. ERIC primerler kullanılarak rep-PCR ile genotiplendirme. Dört ERIC genotipinin ayırımı için önemli olan bantlar oklar ile gösterilmiştir (I: ERIC I, II: ERIC II, III: ERIC III, IV: ERIC IV) [19].

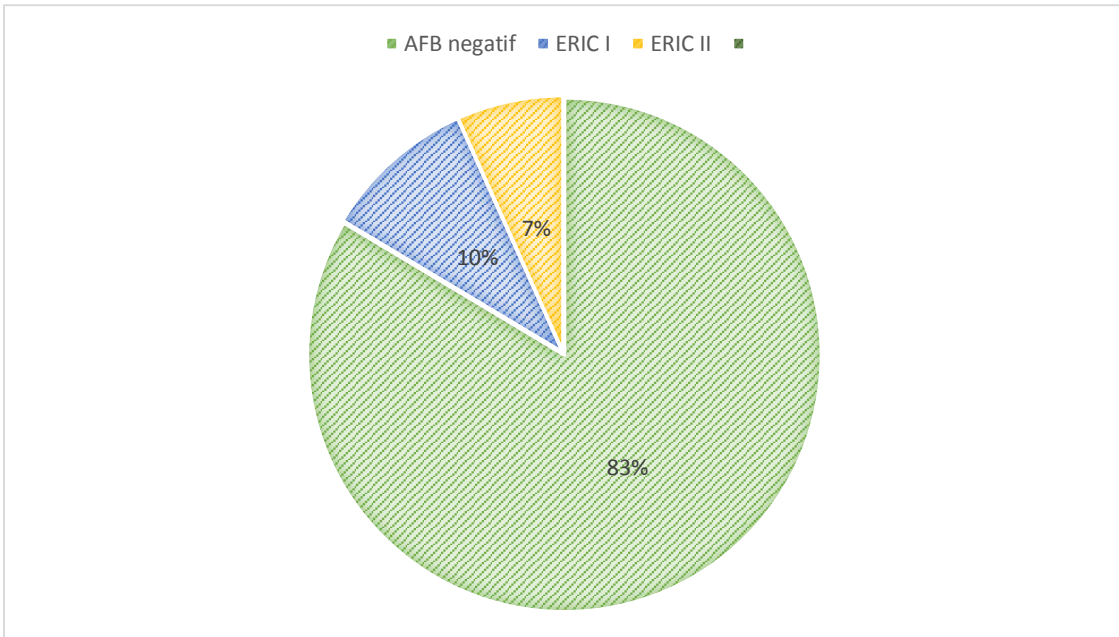
Türkiye'den elde edilen 22 izolattan elde edilen verilere göre, ERIC III ve ERIC IV genotipinde *Paenibacillus larvae* bulunmamaktadır. Tüm izolatlar ERIC I ya da ERIC II genotipindedir (Şekil 4.6). Elde edilen analiz sonuçları çizelge ve şekil halinde sunulmuştur (Çizelge 4.3) (Şekil 4.7.). Ayrıca, propolis ve petek örneği toplanan lokasyonlar ile pozitif sonuç elde edilen örnekler, genotipleri belirtilerek harita üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.8.).

Çizelge 4.3. Rep-PCR ile Genotiplendirme Sonuçları

İl	Örnek no	Genotip
1. Ankara	06/04	ERIC I
2. Ankara	06/14	ERIC II
3. Ankara	06/26	ERIC I
4. Antalya	07/04	ERIC I
5. Çorum	19/04	ERIC II
6. Hatay	31/10	ERIC I
7. İçel	33/01	ERIC II
8. Kars	36/01	ERIC II
9. Kars	36/02	ERIC II
10. Kars	36/04	ERIC II
11. Kastamonu	37/02	ERIC I
12. Kocaeli	41/06	ERIC I
13. Manisa	45/01	ERIC II
14. Mardin	47/01	ERIC I
15. Ordu	52/15	ERIC I
16. Sivas	58/04	ERIC I
17. Bayburt	69/01	ERIC I
18. Bartın	74/02	ERIC I
19. Iğdır	76/12	ERIC II
20. Iğdır	76/13	ERIC I
21. Iğdır	76/14	ERIC II
22. Düzce	81/21	ERIC I

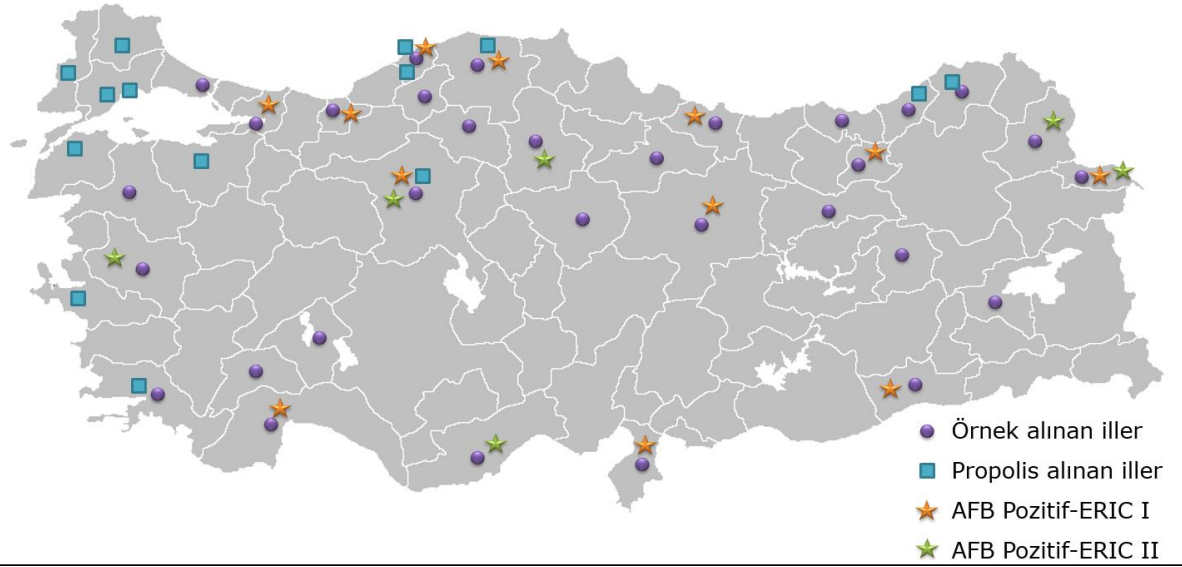


Şekil 4.6. rep-PCR ile oluşan bantlar a) Qiagen GelPilot 1 kb Plus ladder b) ERIC I kontrol c)ERIC II kontrol d) ERIC III kontrol e)ERIC IV kontrol (Fotoğraf: Aygün Schiesser)



Şekil 4.7. Toplanan örneklerin Amerikan Yavru Çürüklüğü sonuçları





Şekil 4.8. Genotiplerin Türkiye çapındaki dağılımları ve propolis alınan iller

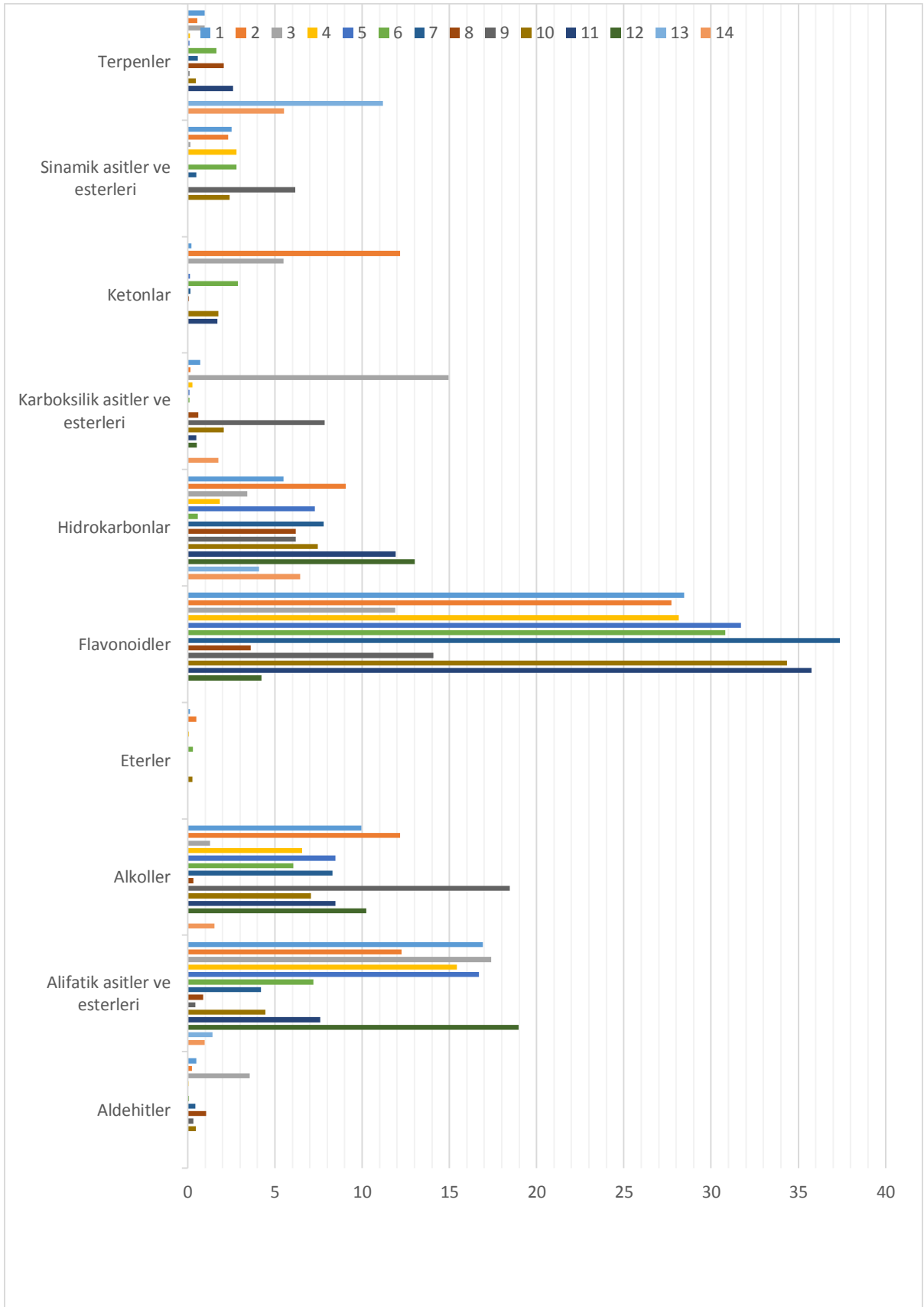
### 4.3. GC-MS Analizlerinden Elde Edilen Sonuçlar

Deneylerde kullanılan propolis ekstraktlarının GC-MS analizleri yapılmış ve içerikleri çizelgeler halinde düzenlenmiştir. Bileşiklerin toplam oranları yüzde halinde belirtilmiştir (Çizelge 4.4). Tüm propolisler, içerikleri açısından grafik üzerinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5)

Çizelge 4.4. Propolis ekstraktlarının GC-MS analizine göre içerikleri

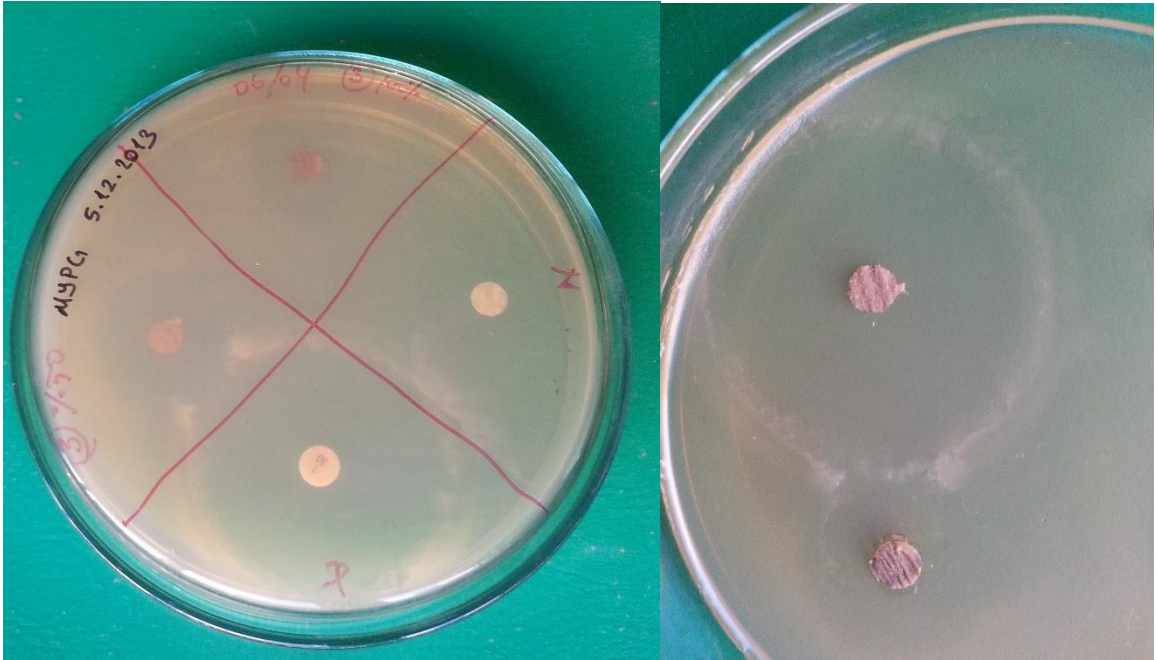
Propolis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Aldehitler</i>	0,5	0,25	3,55	0,05	0,02	0,08	0,43	1,05	0,33	0,47	0	0	0	0
<i>Alkoller</i>	16,93	12,27	17,39	15,42	16,7	7,21	4,19	0,89	0,45	4,45	7,59	18,96	1,43	0,98
<i>Alifatik asitler ve esterleri</i>	9,97	12,18	1,28	6,57	8,46	6,05	8,3	0,34	18,45	7,06	8,47	10,25	0	1,53
<i>Eter</i>	0,12	0,49	0	0,07	0,07	0,31	0	0	0	0,26	0	0,06	0	0
<i>Karboksilik asit</i>	0,72	0,15	14,94	0,27	0,11	0,11	0	0,62	7,85	2,07	0,49	0,53	0	1,75
<i>Flavonoids</i>	28,47	27,74	11,89	28,14	31,71	30,82	37,38	3,6	14,09	34,36	35,77	4,24	0	0
<i>Hidrokarbonlar</i>	5,49	9,07	3,42	1,84	7,28	0,58	7,8	6,19	6,18	7,47	11,91	13,01	4,09	6,44
<i>Ketonlar</i>	0,21	12,18	5,49	0	0,14	2,87	0,16	0,06	0	1,77	1,71	0	0	0
<i>Sinnamik asitler</i>	2,52	2,31	0,17	2,79	0	2,79	0,49	0	6,17	2,41	0	0	0	0
<i>Terpenler</i>	0,98	0,56	0,98	0,13	0,1	1,65	0,57	2,06	0,09	0,46	2,61	0	11,18	5,52

Çizelge 4. 5 Propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin dağılımları



#### 4.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testinden Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmada, Türkiye'den elde edilmiş 22 *Paenibacillus larvae* izolatu ve tüm genotipler üzerindeki etkinin belirlenebilmesi amacı ile 4 farklı genotipteki kontrol izolatları üzerinde, kaynakları farklı 14 propolis ekstraktı antimikrobiyal etkileri açısından incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile uygulanan testlerden farklı sonuçlar elde edilmiş; zon çaplarının ölçülmesiyle elde edilen veriler her izolat için ayrı ayrı izelge haline getirilerek sunulmuştur (şekil 4.9) (izelge 4.6.-4.31.). Pozitif kontrol olarak 30 mg Tetrasiklin diski ve negatif kontrol olarak %96'lık etanol emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Pozitif kontrol, zon oluşumu olması açısından, negatif kontrol oluşmaması açısından deneyin düzgün işlediğinin göstergesi olarak kabul edilmiş; aksi sonuç gösteren petriler gözardı edilerek deney tekrarlanmıştır.



şekil 4.9. Disk difüzyon yöntemi uygulanan petriler

Çizelge 4.6. Eric I genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	Eric I			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	16	14	16
2	14	14	11	11
3	22	23	21	22
4	17	16	14	13
5	16	18	16	17
6	22	21	19	19
7	19	19	19	17
8	9	11	10	10
9	12	12	8	7
10	13	13	10	10
11	14	16	11	10
12	12	12	10	9
13	15	14	12	13
14	18	19	18	18

Çizelge 4.7. Eric II genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	Eric II			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	12	13	13	13
2	11	12	10	10
3	21	21	16	16
4	10	11	11	11
5	11	12	13	13
6	14	14	15	15
7	10	10	15	15
8	9	10	5	5
9	10	10	5	5
10	7	8	6	5
11	12	13	6	6
12	12	13	6	7
13	7	8	7	8
14	10	11	10	12

Çizelge 4.8. Eric III genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	Eric III			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	7	8	8	8
2	11	10	10	8
3	15	18	24	18
4	11	11	13	13
5	11	10	15	13
6	9	13	11	10
7	11	9	12	11
8	9	8	10	7
9	6	6	6	6
10	8	8	8	8
11	11	13	12	10
12	12	11	14	15
13	10	9	10	10
14	10	9	11	11

Çizelge 4.9. Eric IV genotipinde disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	Eric IV			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	14	12	13	14
2	19	20	22	19
3	25	27	33	32
4	14	11	22	19
5	21	21	28	28
6	28	28	20	20
7	28	24	14	22
8	12	9	9	7
9	6	6	7	6
10	12	9	7	9
11	16	13	7	11
12	18	18	9	9
13	15	9	11	7
14	14	13	9	10



Çizelge 4.10. 06/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	06/04			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	16	17	18	18
2	13	14	15	16
3	20	21	20	19
4	14	15	17	16
5	15	15	20	17
6	20	21	18	19
7	16	17	10	18
8	11	11	8	10
9	10	10	8	8
10	13	13	13	13
11	13	14	15	16
12	12	12	10	10
13	14	15	16	16
14	18	18	19	19

Çizelge 4.11. 06/14 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	06/14			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	15	16	14	14
2	9	10	11	11
3	18	19	17	18
4	15	15	12	13
5	15	15	17	17
6	16	17	12	13
7	15	16	13	14
8	5	5	6	6
9	5	5	5	6
10	6	7	8	8
11	8	9	9	9
12	5	6	7	8
13	12	13	11	11
14	15	16	15	15

Çizelge 4.12. 06/26 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	06/26			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	18	16	16
2	18	18	12	12
3	21	22	18	19
4	20	20	14	14
5	13	14	15	16
6	16	17	18	19
7	17	17	17	17
8	15	15	8	9
9	13	13	7	8
10	13	14	11	11
11	14	14	12	12
12	14	13	10	11
13	18	17	13	14
14	18	19	17	17

Çizelge 4.13. 07/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	07/04			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	19	18	16	17
2	16	16	14	14
3	29	27	32	25
4	16	18	16	17
5	17	16	16	17
6	20	21	19	19
7	20	19	18	18
8	12	12	8	8
9	12	11	7	8
10	15	16	12	13
11	13	14	14	14
12	14	14	10	10
13	17	16	15	15
14	20	21	19	19

Çizelge 4.14. 19/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	19/04			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	11	11	14	13
2	8	9	9	10
3	18	18	22	20
4	9	10	14	13
5	11	11	15	16
6	19	17	18	17
7	15	13	15	16
8	5	6	5	5
9	6	6	5	6
10	8	8	7	6
11	8	9	10	9
12	8	8	6	6
13	9	10	10	11
14	15	15	16	17

Çizelge 4.15. 31/10 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	31/10			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	16	16	14	14
2	13	13	10	10
3	20	21	21	20
4	15	15	13	13
5	15	16	13	13
6	20	19	18	17
7	17	18	16	16
8	12	11	8	8
9	7	7	6	7
10	12	13	9	9
11	13	13	9	10
12	12	12	8	9
13	15	15	12	13
14	18	19	17	17

Çizelge 4.16. 33/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	33/01			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	13	14	13	14
2	11	12	11	11
3	17	17	18	19
4	14	13	13	13
5	13	13	13	14
6	17	17	15	16
7	14	15	13	14
8	11	11	6	6
9	7	7	6	6
10	9	10	9	8
11	11	11	10	10
12	10	12	8	8
13	11	12	12	12
14	16	16	14	14

Çizelge 4.17. 36/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	36/01			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	13	14	13	13
2	12	12	12	12
3	16	17	18	16
4	13	13	13	13
5	13	14	13	14
6	15	16	17	17
7	14	15	12	12
8	5	5	5	6
9	5	6	5	5
10	6	7	10	8
11	8	8	10	10
12	5	6	8	9
13	12	13	11	11
14	15	15	14	14



Çizelge 4.18. 36/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	36/02			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	11	11	10	10
2	10	10	8	9
3	16	16	14	15
4	11	11	10	10
5	11	12	10	10
6	14	15	12	13
7	12	13	11	12
8	5	5	5	5
9	5	5	5	5
10	7	8	6	7
11	9	10	7	8
12	5	5	6	7
13	10	10	10	9
14	14	14	11	12

Çizelge 4.19. 36/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	36/04			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	12	13	12	12
2	11	11	9	9
3	21	21	19	20
4	12	12	10	10
5	12	13	10	11
6	20	20	14	15
7	14	15	12	13
8	6	7	5	5
9	6	6	5	5
10	8	9	8	8
11	10	12	8	9
12	6	7	8	8
13	12	12	9	9
14	15	15	12	13

Çizelge 4.20. 37/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	37/02			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	18	18	16	16
2	16	16	13	14
3	26	27	20	20
4	17	17	15	15
5	17	17	15	16
6	23	23	19	18
7	19	20	17	17
8	14	14	8	8
9	11	12	5	6
10	15	15	9	10
11	16	15	12	13
12	15	15	9	9
13	16	17	14	15
14	20	19	18	18

Çizelge 4.21. 41/06 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	41/06			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	17	14	15
2	14	15	11	12
3	19	20	23	23
4	15	15	13	13
5	15	16	13	13
6	18	18	17	16
7	17	18	15	14
8	12	12	8	9
9	10	10	8	8
10	9	10	11	12
11	13	14	11	11
12	13	14	11	11
13	14	14	12	12
14	17	18	16	17

Çizelge 4.22. 45/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	45/01			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	12	12	13	14
2	10	10	10	11
3	17	18	21	19
4	11	12	10	11
5	11	12	12	13
6	14	14	19	19
7	13	13	13	13
8	8	9	5	5
9	5	6	5	5
10	10	10	8	9
11	10	10	9	9
12	9	10	5	5
13	11	11	10	11
14	13	14	15	15

Çizelge 4.23. 47/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	47/01			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	16	17	15	16
2	15	15	12	12
3	21	21	21	20
4	16	16	15	14
5	16	16	15	15
6	18	18	20	20
7	16	17	18	18
8	10	10	7	8
9	6	7	6	6
10	14	15	11	11
11	13	15	11	11
12	13	13	8	8
13	15	15	13	13
14	18	17	16	16

Çizelge 4.24. 52/15 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	52/15			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	18	18	15	16
2	17	17	13	14
3	25	24	21	22
4	17	17	14	14
5	17	18	15	15
6	20	21	18	19
7	19	19	16	16
8	13	14	10	11
9	12	13	7	8
10	16	16	12	12
11	16	17	12	13
12	14	15	11	12
13	17	17	14	14
14	20	20	18	18

Çizelge 4.25. 58/04 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	58/04			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	18	18	18	17
2	16	17	13	13
3	23	23	22	21
4	17	17	14	14
5	17	18	17	17
6	23	22	21	20
7	21	20	18	16
8	15	15	10	10
9	13	13	5	6
10	15	16	11	11
11	16	17	13	13
12	15	15	7	8
13	17	17	13	13
14	21	21	19	19



Çizelge 4.26. 69/01 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	69/01			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	18	15	16
2	18	14	11	11
3	21	21	18	19
4	16	17	13	14
5	17	17	15	15
6	20	21	16	16
7	18	18	15	16
8	12	13	6	6
9	10	11	5	5
10	13	14	10	10
11	13	14	10	11
12	13	13	9	9
13	15	16	13	13
14	19	19	15	16

Çizelge 4.27. 74/02 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	74/02			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	14	14	16	17
2	14	14	13	14
3	19	19	20	21
4	16	17	15	15
5	15	16	16	17
6	15	16	17	17
7	22	23	16	16
8	19	19	10	10
9	18	17	9	10
10	13	13	13	13
11	18	18	13	14
12	9	10	13	14
13	19	20	14	15
14	10	10	17	16

Çizelge 4.28. 76/12 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	76/12			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	13	13	14	15
2	10	10	8	8
3	21	20	18	17
4	10	11	12	11
5	12	12	13	13
6	15	15	17	17
7	13	13	15	15
8	7	7	5	6
9	6	6	5	6
10	9	10	6	6
11	9	9	6	7
12	8	7	5	6
13	10	10	10	9
14	13	14	16	15

Çizelge 4.29. 76/13 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	76/13			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	17	16	16
2	15	16	11	12
3	21	21	18	19
4	17	16	12	12
5	17	17	15	16
6	20	21	18	18
7	17	18	17	18
8	13	14	9	10
9	13	13	7	6
10	15	15	10	10
11	15	15	11	11
12	13	14	10	10
13	16	16	12	12
14	18	19	17	18

Çizelge 4.30. 76/14 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	76/14			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	15	14	8	9
2	8	8	6	6
3	18	18	15	16
4	12	12	7	8
5	13	13	8	8
6	16	16	10	10
7	14	15	9	9
8	5	6	5	6
9	5	5	6	6
10	6	6	5	5
11	7	8	6	6
12	5	5	5	6
13	11	12	6	6
14	15	16	9	10

Çizelge 4.31. 81/21 izolatında disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları (mm)

<i>P. larvae</i>	81/21			
Propolis	%100		%50	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
1	17	18	15	15
2	16	16	11	12
3	21	22	18	16
4	16	16	15	15
5	16	17	15	16
6	20	21	17	18
7	18	19	16	15
8	12	12	8	9
9	9	9	6	7
10	14	14	9	9
11	14	15	9	10
12	12	13	9	9
13	16	16	14	15
14	19	20	17	18

#### 4.5. İstatistiksel Analizlerden Elde Edilen Sonuçlar

Tez çalışmasından elde edilen verilerin analizinde, IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılmıştır. Genotipler, İzolatlar ve Propolisler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için minimum, maksimum, standart sapma değerleri hesaplanmış; One-way ANOVA ve Duncan testleri uygulanmıştır.  $P \leq 0,05$  bulunan sonuçlar arasındaki fark, istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.32. Genotipler açısından inhibisyon zon çapları

Genotip	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
ERIC I	5,00	28,50	14,9362	3,89928
ERIC II	5,00	63,00	11,1179	5,02275
ERIC III	6,00	21,00	10,6429	3,14129
ERIC IV	6,00	32,50	15,8214	7,40647

Çizelge 4.33. Genotipler açısından inhibisyon zon çaplarının One-way ANOVA testi ile karşılaştırılması

Genotip		Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	P
ERIC I	Gruplar arası	4233,084	13	325,622	71,903	,000
	Grup içi	1711,821	378	4,529		
	Toplam	5944,906	391			
ERIC II	Gruplar arası	3495,843	13	268,911	84,589	,000
	Grup içi	845,625	266	3,179		
	Toplam	4341,468	279			
ERIC III	Gruplar arası	239,429	13	18,418	9,550	,000
	Grup içi	27,000	14	1,929		
	Toplam	266,429	27			
ERIC IV	Gruplar arası	1264,357	13	97,258	6,282	,001
	Grup içi	216,750	14	15,482		
	Toplam	1481,107	27			

$P \leq 0,05$  olduğundan genotipler açısından inhibisyon zonları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır.

Çizelge 4.34. Farklı genotiplerin propolise karşı duyarlılığının Duncan testi karşılaştırılması

Genotip	N	Alt Grup	
		a	b
ERIC III	28	10,6429	
ERIC II	280	10,9393	
ERIC I	392	14,9362	
ERIC IV	28	15,8214	
P		,712	,271

Çizelge 4.35. İzolatlar açısından inhibisyon zon çapları

Konsantrasyon	%100			%50		
	İnhibisyon Zon Çapı					
İzolat	Min(mm)	Maks(mm)	Ort±SS(mm)	Min(mm)	Maks(mm)	Ort±SS(mm)
ERIC I kontrol	10,00	22,50	15,86±3,65	7,50	21,50	13,75±4,27
ERIC II kontrol	7,50	21,00	11,50±3,30	5,00	16,00	9,96±4,02
ERIC III kontrol	6,00	16,50	10,14±2,48	6,00	21,00	11,14±3,72
ERIC IV kontrol	6,00	28,00	16,50±6,72	6,50	32,50	15,14±8,23
06/04	10,00	20,50	14,93±3,20	8,00	19,50	15,07±3,80
06/14	5,00	18,50	11,71±4,85	5,50	17,50	11,43±3,84
06/26	13,00	21,50	16,36±2,67	7,50	18,50	13,67±3,56
07/04	11,50	28,00	17,10±4,24	7,50	28,50	15,36±5,31
19/04	5,50	18	10,75±4,04	5,00	21,00	11,82±5,05
31/10	7,00	20,50	14,75±3,60	6,50	20,50	12,50±4,15



33/01	7,00	17,00	12,64±2,87	6,00	18,50	11,64±3,61
36/01	5,00	16,50	11,18±4,15	5,00	17,00	11,46±3,63
36/02	5,00	16,00	10,18±3,55	5,00	14,50	9,18±2,84
36/04	6,00	21,00	12,07±4,57	5,00	19,50	10,28±3,81
37/02	11,50	26,50	17,43±3,80	5,50	20,00	13,75±4,33
41/06	9,50	19,50	14,79±2,98	8,00	23,00	13,18±3,79
45/01	5,50	17,50	11,25±2,83	5,00	20,00	11,21±4,74
47/01	6,50	21,00	14,96±3,51	6,00	20,50	14,42±4,49
52/15	12,50	24,50	17,39±3,04	7,50	21,50	14,28±3,57
58/04	13,00	23,00	17,71±2,98	5,50	21,50	14,25±4,77
69/01	10,50	21,00	16,00±3,11	5,00	18,50	12,43±3,98
74/02	9,50	22,50	15,96±3,67	9,50	20,50	14,68±2,87
76/12	6,00	20,50	11,18±3,75	5,50	17,50	10,75±4,62
76/13	13,00	21,00	16,39±2,44	6,50	18,50	13,25±3,83
76/14	5,00	18,00	10,86±4,58	5,00	15,50	7,71±2,78
81/21	9,00	21,50	16,00±3,45	6,50	17,50	12,96±3,81

Min: Minimum Maks: Maksimum Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 4.36. İzolatların duyarlılık düzeylerinin Duncan testi ile karşılaştırılması

İzolat	Alt Gruplar				
	a	b	c	d	e
76/14	9,29				
36/02	9,68	9,68			
ERIC III kontrol	10,64	10,64			
ERIC II kontrol	10,73	10,73			
76/12	10,96	10,96			
36/04	11,18	11,18	11,18		
45/01	11,23	11,23	11,23		
19/04	11,29	11,29	11,29		
36/01	11,32	11,32	11,32		
06/14	11,57	11,57	11,57		
33/01		12,14	12,14	12,14	
31/10			13,63	13,63	13,6250
41/06				13,9821	13,9821
47/01				14,1964	14,1964
69/01				14,2143	14,2143
81/21				14,4821	14,4821
ERIC I kontrol					14,8036
76/13					14,8214
06/04					15,0000
06/26					15,0179
74/02					15,3214
37/02					15,5893
Eric IV kontrol					15,8214
52/15					15,8393
58/04					15,9821
07/04					16,2321
Sig.	,080	,057	,051	,059	,051

Çizelge 4.37. Propolisler açısından inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması

Konsantrasyon	%100			%50		
	İnhibisyon Zon Çapı			İnhibisyon Zon Çapı		
İzolat	Min(mm)	Maks(mm)	Ort±SS(mm)	Min(mm)	Maks(mm)	Ort±SS(mm)
1. Bartın 1	7,50	18,50	14,92±2,81	8,00	18,00	14,17±2,45
2. Bartın 2	8,00	19,50	13,35±3,12	6,00	20,50	11,48±2,78
3. Artvin	16,00	28,00	20,63±3,13	14,50	32,50	20,00±3,76
4. Tekirdağ 1	9,50	20,00	14,33±2,73	7,50	20,50	13,29±2,52
5. Tekirdağ Paçal	10,50	21,00	14,73±2,60	8,00	28,00	14,87±3,57
6. Türkiye Paçal	11,00	28,00	18,35±3,59	10,00	20,50	16,77±2,81
7. Bursa	10,00	26,00	16,58±3,63	9,00	18,00	15,00±2,40
8. Rize	5,00	19,00	10,33±3,64	5,00	10,50	7,38±1,88
9. Kastamonu	5,00	17,50	8,85±3,41	5,00	9,50	6,27±1,19
10.Kırklareli	6,00	16,00	11,21±3,27	5,00	13,00	9,23±2,26
11.Ankara	7,50	18,00	12,62±2,90	6,00	15,50	10,31±2,39
12.Çanakkale	5,00	18,00	11,10±3,55	5,00	14,50	8,75±2,32
13.İzmir	7,50	19,50	13,62±3,04	6,00	16,00	11,75±2,44
14.Muğla	9,50	21,00	16,27±3,23	9,50	19,00	15,37±2,92

Çizelge 4.38. Propolisler açısından inhibisyon zon çaplarının Duncan testi ile karşılaştırılması

Propolis	Alt Gruplar								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
3	20,31								
6		17,55							
14			15,81						
7			15,78						
5			14,79	14,79					
1			14,54	14,54					
4				13,80	13,80				
13					12,68	12,68			
2						12,41			
11						11,46			
10							10,22		
12							9,92	9,92	
8								8,86	
9									7,56
Sig.	1,000	1,000	,51	,117	,059	,52	,617	,074	1,000

İstatistiksel analizlere göre 9 Duncan alt grubu belirlenmiştir ( $P \leq 0.05$ ). En etkili grup "a", en az etkili olan ise "i" grubudur.

Çizelge 4.39. Etki düzeyine göre propolis alt grupları

Duncan grupları	Propolis örnekleri
a	Artvin
b	Türkiye Paçal
c	Muğla, Bursa, Tekirdağ Paçal, Bartın
d	Tekirdağ 1
e	İzmir
f	Bartın 2, Ankara
g	Çanakkale, Kırklareli
h	Rize
i	Kastamonu

Çizelge 4.40. Farklı konsantrasyonlar açısından inhibisyon zon çapları

Konsantrasyon	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
%100	5,00	28,00	14,06	4,43
%50	5,00	32,50	12,47	4,53

Çizelge 4.41. Farklı konsantrasyonlar açısından inhibisyon zon çaplarının One-way ANOVA testi ile karşılaştırılması

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Grup içi	458,907	1	458,907	22,883	,000
Gruplar arası	14559,861	726	20,055		
Toplam	15018,768	727			

$P \leq 0,05$  olduğundan konsantrasyonlar açısından inhibisyon zonları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır.

#### 4.6. Elde Edilen Sonuçların Tartışılması

Bal arıları, dünya çapında oldukça büyük ekonomik öneme sahip canlılardır. Bal ve balmumu üretimi ile polinasyona olan katkıları bal arılarının değerini açıkça ortaya koymaktadır. Avrupa bal arısı *Apis mellifera* L., en çok yetiştirilen arı türüdür ve tüm kıtalara götürülerek yerleştirilmiştir. İstatistiklere göre 2012 yılında 679,12 milyon dolarlık bal üretilmiş ve ülkeler arasında ticareti yapılmıştır[1]. Bu pahada balı üretmek için yaklaşık 80 milyon kolonideki arılar, çiçeklerden nektar ve polen toplamıştır. Bir kovandaki 50-60 bin arının, günde yüzlerce çiçeği ziyaret ettiği düşünöldüğünde, arıların polinasyona olan katkısı da gözler önüne serilmektedir. Bal arıları, farklı bitkileri ziyaret etme ve yaklaşık 4,5 km çapında uçuş yapabilme özelliklerinden ötürü oldukça iyi polinatörlerdir ve bazı ülkelerde bu amaçla koloniler, özel olarak tarım alanlarına yerleştirilmektedir. Tarım ürünlerinin boyutu, kalitesi ve miktarı açısından değerlendirildiğinde; polinasyon sayesinde yaklaşık %10 ile %40 arasında üretimde artış olduğu bilinmektedir. Küresel boyutta böceklerle sağlanan polinasyonun, üretime yıllık katkısının yaklaşık 212 milyar dolar olduğu düşünölmekte ve bu miktarın tüm tarımsal üretimin %10' unu kapsadığı görölmektedir. Polinatör popülasyonlarındaki düşüş, doğrudan tarımsal üretimde azalmaya sebep olduğundan, dünyadaki bal arısı kayıpları hem devletlerin hem de bilim adamlarının oldukça dikkatini çekmektedir. Son 10 yıldır, bal arısı kolonilerinde düşüş görölmekte; bu durum birçok proje kapsamında çok sayıda bilim adamı tarafından araştırılmaktadır. Avrupa Birliği başta olmak üzere, birçok ülke yönetimi, kayıpların önüne geçilebilmesi için stratejiler geliştirmeye çalışmaktadır. Şu ana kadar yapılan çalışmalar doğrutusunda, koloni kayıplarına etki eden birçok etken bulunmaktadır. Bunların en önemlileri; patojenler, pestisitler, iklim değişiklikleri ile yetersiz ve bilinçsiz arıcılık uygulamalarıdır. Bu etkenler arasında, en büyük zarara neden olanlardan birisi de *Paenibacillus larvae*'dir [11, 14].

*Paenibacillus larvae*, oldukça bulaşıcı bir bakteridir. Bu özelliği sayesinde, hızla kovandan kovana, arılıktan arılığa geçebilmektedir. Spor oluşturan bir bakteri olması, olumsuz çevre koşullarına rağmen onlarca yıl kovan ortamında canlı kalabilmesine olanak vermekte ve ilaç tedavilerinin zor olmasına sebep olmaktadır. Amerikan Yavru Çürüklüğü, birçok ülkede bildirilmesi zorunlu hastalık olup; korunma ve tedavi için çok fazla seçenek bulunmamaktadır. Antibiyotik kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır. Antibiyotik kullanımının yasaklanmasının başlıca sebepleri; antibiyotiklerin çoğunlukla spora etki edememesi ve sadece belirtileri baskılaması; bal ve diğer arı ürünlerindeki antibiyotik kalıntısının insan sağlığını tehdit etmesi; antibiyotik kullanılan kolonilerde larva canlılığı oranı ve ergin ömür uzunluğunun kısalması ve antibiyotiğe karşı dirençli izolatların ortaya çıkmasıdır [14, 61, 112-114].

Bu sebeplerden dolayı, alternatif tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu stratejiler üç farklı yönde ilerlemektedir: AFB'ye karşı bireysel veya koloni düzeyinde direnç gösteren bal arısı ırklarının yetiştirilmesi; antagonistik bakteriler ile biyolojik kontrol ve son olarak doğal antibakteriyel bileşikler ile tedavi yöntemleri. Bu amaçla birçok bitkisel yağ test edilmiş; içeriğindeki fenolik bileşikler ve alkaloidler nedeniyle *Paenibacillus larvae*'ye karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür [58, 115, 116]. Bunun yanı sıra son yıllarda, başta fenolik bileşikler ve alkaloidler olmak üzere birçok kimyasal madde içeren propolisin, arı hastalıklarına karşı etkisi araştırılmaktadır [70].

Floral zenginliği açısından ülkemiz hem arıcılık hem de propolis üretimi yönünden çok değerli bir kaynak durumundadır. Birçok alanda denenmekte olan Türkiye propolisinin, *Paenibacillus larvae*'ye karşı antibakteriyel etkisinin saptanması ve farklı genotipteki izolatlar üzerindeki etki derecelerinin belirlenmesinin, arıcılığın ilerlemesi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir aşama olduğu düşünülmektedir.

Bu amaçla yürütülen tez çalışmasından elde edilen sonuçlar gruplar halinde incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Buna göre veriler; genotipler, izolatlar ve propolis ekstraktlarının etki dereceleri açısından tartışılmıştır.

Çalışma kapsamında toplanan örnekler, mikrobiyal, biyokimyasal ve moleküler analizlerle incelenmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucu toplanan 112 larvalı petek örneğinden 22 AFB pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu peteklerden izole edilen *Paenibacillus larvae*'nin 13'ünün ERIC I, 9'sinin ERIC II genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; Türkiye genelinden toplanan örneklerin %83' ü AFB negatif; %10 ERIC I ve %7 ERIC II genotipinde olmak üzere, %17' si AFB pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.). ERIC III ve ERIC IV genotipinde örneğe rastlanmamıştır. Elde edilen bu bulgu, literatür ile de desteklenmekte; onlarca yıldır ERIC III ve ERIC IV genotipindeki izolatlar kültür koleksiyonu haricinde rastlanmamaktadır [14]. ERIC I ve II bal arısı larvalarının enfeksiyonundaki en önemli genotiplerdir. Özellikle, virulansları arasındaki farklılıklar üzerlerinde araştırma yapılması ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. ERIC II'nin ERIC I'den çok kısa sürede larvanın ölümüne sebep olması birey ve koloni düzeyinde farklılıklara neden olmaktadır. Bu bilgiler ışığında, ERIC I ile enfekte kolonide larvadaki enfeksiyon gelişimin daha yavaş olması bireysel bağışıklık mekanizmalarının daha etkin olabileceğini düşündürmektedir. Aksine ERIC II ile enfekte olmuş kolonide, larva hızla öleceği, buna karşı koloni düzeyinde bağışıklık mekanizmalarının devreye girerek ölü larvanın uzaklaştırılması sağlanabileceği düşünülmektedir [40].

Türkiye çapından elde edilen *P. larvae* izolatları üzerinde farklı propolis ekstraktlarının antibakteriyel etkisi, genotipler açısından değerlendirilmiştir. Ülkemizde sadece ERIC I ve ERIC II genotipinde izolatlar bulunsa da; antibakteriyel etkinin tüm genotipler üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacı ile kültür koleksiyonundan elde edilen ERIC III ve ERIC IV genotipleri de kullanılmıştır. Disk difüzyon testi ile



oluşan zon çapları istatistiksel açıdan incelenmiş; minimum, maksimum ve standart sapma değerleri sunulmuştur (Çizelge 4.32.). Genotipler arasında, propolise karşı duyarlılık düzeyinde fark olup olmadığı, One-way ANOVA testi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.33.). Bu teste göre dört genotip, propolise karşı istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkta ( $P \leq 0,05$ ) duyarlılık göstermiştir. Bu duyarlılık derecesinin belirlenmesinde Duncan testi kullanılmıştır (Çizelge 4.34.). Duncan testine göre, en duyarlıdan en az duyarlıya doğru genotipler; ERIC IV, ERIC I, ERIC II ve ERIC III şeklinde sıralanmaktadır. Ayrıca, ERIC IV-ERIC I ve ERIC II-ERIC III şeklinde iki Duncan alt grubu oluşturmaktadır. Duyarlılık düzeylerinin farklılık göstermesi, gelecekte tedavi oluşturmak amaçlı yapılacak çalışmalar bu durumun göz önüne alınması gerekebileceğini; direnç-duyarlılık durumuna göre farklı preparatların seçilebileceğini ortaya koymaktadır.

ERIC II' nin propolise karşı daha dirençli olduğu görülmekte ve ERIC I genotipinin Türkiye'de daha yaygın olmasının ülkemizdeki tedavi yolları ve salgın oluşturma potansiyeli açısından nispeten olumlu bir sonuç olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, izolatların duyarlılıkları ayrıca tek tek değerlendirilmiştir (Çizelge 4.35). Uygulanan Duncan testine göre, izolatların 5 alt grupta duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.36.). Bu sonuçlara göre propolis ekstraktlarına karşı en dirençli izolat Iğdır'dan elde edilmiş olan 76/14 numaralı örnektir. İzolatları, duyarlıdan dirençliye doğru sıraladığımızda; birinci alt grupta 07/04, 58/04, 52/15, ERIC IV kontrol, 37/02, 74/02, 06/26, 06/04, 76/13, Eric1, 81/21, 69/01, 47/01, 41/06 ve 31/10; ikinci alt grupta 33/01; üçüncü alt grupta 06/14, 36/01, 19/04, 45/01 ve 36/04; dördüncü alt grupta 76/12, ERIC II kontrol, ERIC III kontrol ve 36/02 izolatları ile beşinci alt grupta 76/14 izolatu bulunmaktadır. Bu duyarlılık düzeyleri, genotipik özelliği ile aynı doğrultuda olmakla birlikte farklı izolatların farklı duyarlılık derecesine

sahip olabileceği görülmüştür. Duyarlılığı belirleyen en önemli özellik genotip olsa da, hastalığın bulunduğu çevre koşulları, uygulanan kimyasallar vb. gibi birçok faktörün izolatlar arasında farklılık yaratabileceği düşünülmektedir. Farklı *P. larvae* suşlarının ayırımı sağlayan standart tekniklerin bulunması; AFB'nin epidemiyolojik çalışmaları için oldukça gereklidir. Bu sayede, salgınlar, enfeksiyon kaynakları, salgınlar arasındaki ilişki, daha virulent olan suşlar tespit edilebilir; gerekli izleme, koruma ve tedavi stratejileri geliştirilebilir [14].

Tez çalışmasında 14 farklı propolis ekstraktı antibakteriyel etkileri açısından değerlendirilmiş; zon çapları, minimum, maksimum ve standart sapma değerleri sunulmuştur (Çizelge 4.37). Etki dereceleri Duncan testi ile analiz edilmiş (Çizelge 4.38.-4.39.); en etkiliden en az etkiliye şu şekilde sıralanmıştır: Artvin, Türkiye paçal, Muğla, Bursa, Tekirdağ, Bartın 1, Tekirdağ 1, İzmir, Bartın 2, Ankara, Kırklareli, Çanakkale, Rize, Kastamonu. Ormanlık alanlardan elde edilen propolislerin daha etkili olduğu görülmüştür. Kimyasal içerikleri açısından karşılaştırıldığında, her propolisin kendine has bir bileşime sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, antibiyotik etki seviyesi ile içeriğindeki spesifik herhangi bir madde ile doğrudan bir ilişki kurulamamıştır. Örneğin en yüksek etkiyi gösteren Artvin propolisinde Karboksilik asitler, Alifatik asitler ve Ketonlar yüksek oranda bulunurken; ikinci en etkili Türkiye paçal propoliste Flavonoidler ve Alkoller yüksek oranda bulunmaktadır. Propolisin etkisinin, içeriğindeki tek bir maddeden ve direk olarak coğrafi orijininden ziyade bileşimindeki maddelerin kombinasyonu ve etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Yapılan çalışmalarda, kimyasal içerikteki kesin farklılıklara rağmen Avrupa ve Brezilya propolislerinin benzer aktiviteye sahip olduğunu göstermiş; bu propolislerin Orta Amerika propolisinden daha yüksek antibakteriyel etkisi olduğu gösterilmiştir [102]. Ayrıca, propolis ekstraktlarının, antibiyotik ve antifungal ilaçlarla da etkileşim gösterdiği görülmektedir [117, 118]. İleriki çalışmalarla, etken maddeler

tek tek izole edilip kontrollü olarak farklı kombinasyonların etkisi araştırılarak, tedavi için etkin bir preparat haline getirilebileceği düşünülmektedir.

Son aşama olarak, propolislerin disk difüzyon testinde uygulanan farklı konsantrasyonları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.40.-4.41.). One-way ANOVA testine göre, %100 ve %50 konsantrasyon oranları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı olsa da zon çapları arasında çok büyük fark olmadığı görülmüştür. Hatta bazı örneklerde %50 konsantrasyonun daha etkili olduğu dikkat çekmiştir. Daha seyreltilmiş olan bu disklerde difüzyon oranı daha fazladır. Bu durum, propolisin etki mekanizmasının hem içeriğindeki etken madde miktarı ile hem de kapladığı yüzey alanı ile doğru orantılı olabileceği sonucunu düşündürmektedir. Oluşturulabilecek tedavi yönteminde bu özelliğin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Tez çalışması literatürdeki diğer yayınlar ile karşılaştırıldığında, bu alanda çok fazla çalışma olmadığı görülmektedir. Propolisin birçok mikroorganizma üzerindeki biyolojik aktivitesi Türkiye’de ve birçok ülkede araştırılmıştır [119-125]. Çeşitli gram pozitif ve negatif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir [117, 126, 127]. Ancak; propolisin AFB üzerine etkisi ile ilgili birkaç yayın bulunmaktadır ve bu araştırmalar özellikle Brezilya propolisi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışma ile Anadolu’dan elde edilen propolisin AFB üzerine etkinliği ortaya konulmuştur [69, 70, 128, 129, 130].

Tüm dünyada bilim adamları Amerikan Yavru Çürüklüğü’ne karşı doğal tedavi yöntemleri aramaktadır. Ancak bu doğal ürün arayışı sırasında, ürünün kovan ile uyumu göz önünde bulundurulmalıdır. Propolisin, kovan içinde doğal bir malzeme olması, kötü koku oluşturmaması ve kalıntı bırakmaması bu açıdan avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, içerikleri aynı

olmayan farklı orijinli propolis ekstraktlarının dönüşümlü kullanılması ile bakterinin direnç oluşturması önlenebilecektir [87, 102].

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, ileriki araştırmaların genotipler arasındaki ayrımların daha detaylı olarak belirlenmesi ve propolis ekstraktlarının *in vivo* olarak kovan üzerinde denenmesi şeklinde olabileceği yönündedir. Henüz tam olarak aydınlatılmamış bu konu üzerinde daha detaylı çalışmalar yapılmalı; propolisin, ilaç haline getirilme olasılıkları üzerinde durulmalıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] FAO,FAO Statistics Reports, <http://faostat.fao.org>, **2014**.
- [2] Triplehorn, C. A., and Johnson, N. F., *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*, Thomson Brooks/Cole, **2005**.
- [3] Sammataro, D., and Avitabile, A., *The Beekeeper's Handbook*, Cornell University Press, **1998**.
- [4] Clarke, K. E., Oldroyd, B. P., Javier, J., Quezada-Euan, G., and Rinderer, T. E., Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis, *Molecular Ecology*, 10:6, 1347-1355, **2001**.
- [5] Crane, E., *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*, Routledge, **1999**.
- [6] Mazar, A., Tel Rehov, *Hadashot Arkheologiyot – Excavations and Surveys in Israel (HA-ESI)*, 119, **2007**.
- [7] Morse, R. A., and Nowogrodzki, R., *Honey bee pests, predators, and diseases*, Comstock Publishing Associates, **1990**.
- [8] Goulet, H., and Huber, J. T., *Hymenoptera of the world: an identification guide to families*, Research Branch, Agriculture Canada, **1993**.
- [9] Shimanuki, H., and Knox, D. A., *Diagnosis of honey bee diseases*, AU.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. AH-690, 61 pp., **2000**.
- [10] Hill, D. S., *The economic importance of insects*, Springer, **1997**.
- [11] vanEngelsdorp, D., and Meixner, M. D., A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 80-95, **2010**.
- [12] Johansen, C. A., and Mayer, D. F., *Pollinator protection: a bee & pesticide handbook*, Wicwas Press, **1990**.

- [13] Mizrahi, A., and Lensky, Y., *Bee products: properties, applications, and apitherapy*, Plenum Publishing Corporation, **1997**.
- [14] Genersch, E., American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 10-19, **2010**.
- [15] Ashiralieva, A., and Genersch, E., Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees-a review, *Apidologie*, 37:4, 411-420, **2006**.
- [16] Alippi, A. M., Bacterial diseases, *Bee Disease Diagnosis*.(Eds. Colin, ME; Ball, BV and Kilani, M.). *Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches*, 31-59, **1999**.
- [17] Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., and Collins, M. D., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, *Letters in Applied Microbiology*, 13:4, 202-206, **1991**.
- [18] Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M. D., Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek*, 64:3, 253-260, **1993**.
- [19] Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., and Fries, I., Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, 56:3, 501-511, **2006**.
- [20] Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke K., Hoste, B., Janseen B., Kersters, K. , De Vos, P., Logan N. A., Ali, N., Kerkeley, R.C.W., Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al.1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with amended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 270-279, **1996**.

- [21] de Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., and Foster, L. J., Standard methods for American foulbrood research, *Journal of Apicultural Research*, 52:1, 1, **2013**.
- [22] Antunez, K., Piccini, C., Castro-Sowinski, S., Rosado, A., Seldin, L., and Zunino, P., Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates, *Veterinary Microbiology*, 124:1, 178-183, **2007**.
- [23] de Graaf, D. C., De Vos, P., Heyndrickx, M., Van Trappen, S., Peiren, N., and Jacobs, F. J., Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis, *Journal of Invertebrate Pathology*, 91:2, 115-123, **2006**.
- [24] Hornitzky, M., and Djordjevic, S., Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide profiles and Western blots of *Bacillus larvae*, *Journal of Apicultural Research*, 37:1, 47-49, **1992**.
- [25] Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., and Genersch, E., Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen, *Microbiology*, 150:7, 2381-2390, **2004**.
- [26] Djordjevic, S., Ho-Shon, M., and Hornitzky, M., DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*, *Journal of Apicultural Research*, 33:2, 95-103, **1994**.
- [27] Alippi, A. M., López, A. C., and Aguilar, O. M., Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 68:7, 3655-3660, **2002**.
- [28] Wu, X.-Y., Chin, J., Ghalayini, A., and Hornitzky, M., Pulsed-field gel electrophoresis typing and oxytetracycline sensitivity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isolates of Australian origin and those recovered

from honey imported from Argentina, *Journal of Apicultural Research*, 44:2, 87-92, **2005**.

[29] Pentikäinen, J., Kalliainen, E., and Pelkonen, S., Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* infection in Finland, *Apidologie*, 40:1, 73-81, **2009**.

[30] Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F., and Lupski, J. R., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction, *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5:1, 25-40, **1994**.

[31] Genersch, E., and Otten, C., The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, *Apidologie*, 34:3, 195-206, **2003**.

[32] Olive, D. M., and Bean, P., Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 37:6, 1661-1669, **1999**.

[33] Alippi, A. M., and Aguilar, O. M., Characterization of Isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from Diverse Geographical Origin by the Polymerase Chain Reaction and BOX Primers, *Journal of Invertebrate Pathology*, 72:1, 21-27, **1998**.

[34] Alippi, A., and Aguilar, O., Unique DNA fingerprint patterns of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains, *Journal of Apicultural Research*, 37:4, 273-280, **1998**.

[35] Alippi, A., Reynaldi, F. J., López, A. C., De Giusti, M. R., and Aguilar, M., Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province, *Journal of Apicultural Research*, 43:3, 135-143, **2004**.

[36] Peters, M., Kilwinski, J., Beringhoff, A., Reckling, D., and Genersch, E., American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia), *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53:2, 100-104, **2006**.



- [37] Loncaric, I., Derakhshifar, I., Oberlerchner, J. T., Köglberger, H., and Moosbeckhofer, R., Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria, *Journal of Invertebrate Pathology*, 100:1, 44-46, **2009**.
- [38] Forsgren, E., Stevanovic, J., and Fries, I., Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes, *Veterinary Microbiology*, 129:3, 342-349, **2008**.
- [39] Di Pinto, A., Novello, L., Terio, V., and Tantillo, G., ERIC-PCR genotyping of *Paenibacillus larvae* in southern Italian honey and brood combs, *Current Microbiology*, 63:5, 416-419, **2011**.
- [40] Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., Liesegang, H., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., and Daniel, R., How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*, *PLoS one*, 9:3, e90914, **2014**.
- [41] Bailey, L., and Ball, B. V., Honey bee pathology, *Academic Press, London, United Kingdom*, **1991**.
- [42] Lindström, A., *Distribution and Transmission of American Foulbrood in Honey Bees*, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences,, Uppsala, **2006**.
- [43] Alvarado, I., Phui, A., Elekonich, M. M., and Abel-Santos, E., Requirements for in vitro germination of *Paenibacillus larvae* spores, *Journal of Bacteriology*, 195:5, 1005-1011, **2013**.
- [44] Alippi, A., Bacterial diseases, *Bee Disease Diagnosis*. (Eds. Colin, ME; Ball, BV and Kilani, M.). *Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches*, 31-59, **1999**.
- [45] Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., and Genersch, E., Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent

of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *Environmental Microbiology*, 10:6, 1612-1620, **2008**.

[46] Fünfhaus, A., Poppinga, L., and Genersch, E., Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, *Environmental Microbiology*, 15:11, 2951-2965, **2013**.

[47] Fünfhaus, A., and Genersch, E., Proteome analysis of *Paenibacillus larvae* reveals the existence of a putative S-layer protein, *Environmental Microbiology Reports*, 4:2, 194-202, **2012**.

[48] Brødsgaard, C. J., Ritter, W., and Hansen, H., Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* spores; Sensibilite des larves d'abeilles elevees in vitro a diverses doses de spores de *Paenibacillus larvae*, *Apidologie*, 29:6, 569, **1998**.

[49] Spivak, M., and Reuter, G. S., Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior, *Apidologie*, 32:6, 555-565, **2001**.

[50] American Foulbrood,  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Diseases\\_of\\_the\\_honey\\_bee](http://en.wikipedia.org/wiki/Diseases_of_the_honey_bee), **2014**.

[51] Lindstrom, A., Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American Foulbrood, *Microb Ecol*, 56:2, 253-259, **2007**.

[52] Fries, I., Lindström, A., and Korpela, S., Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), *Veterinary Microbiology*, 114:3-4, 269-274, **2006**.

[53] Fries, I., and Camazine, S., Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, *Apidologie*, 32:1, 199-214, **2001**.

[54] Özkırım, A., and Keskin, N., The Culture of *Bacillus* spp. from comb foundation, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 34, 37-41, **2005**.

- [55] Dietemann, V., Neumann, P., and Ellis, J. D., The COLOSS BEEBOOK-Part 1, *Journal of Apicultural Research*, 52, 1, **2013**.
- [56] Govan, V. A., Allsopp, M. H., and Davison, S., A PCR Detection Method for Rapid Identification of *Paenibacillus larvae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5, 2243, **1999**.
- [57] de Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S. F., Schuch, D. M. T., and Titera, D., Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols, *Letters in Applied Microbiology*, 43:6, 583-590, **2006**.
- [58] Özkırım, A., *Bazı Sentetik Antibiyotikler Ve Bitkisel Yağların Bal Arısı (Apis Mellifera L.) Yavru Çürüklüğü Hastalıklarındaki (Amerikan Ve Avrupa Yavru Çürüklüğü) Antibakteriyel Etkilerinin Saptanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.
- [59] Guler, A., The effects of the shook swarm technique on honey bee (*Apis mellifera* L.) colony productivity and honey quality, *Journal of Apicultural Research*, 47:1, 27-34, **2008**.
- [60] Munawar, M. S., Raja, S., Waghchoure, E. S., and Barkat, M., Controlling American foulbrood in honeybees by shook swarm method, *Pakistan Journal of Agricultural Research (Pakistan)*, **2010**.
- [61] Kochansky, J., Knox, D. A., Feldlaufer, M., and Pettis, J. S., Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and-resistant *Paenibacillus larvae*, *Apidologie*, 32:3, 215-222, **2001**.
- [62] Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S., and Doi, R. H., Verification of Oxytetracycline-Resistant American Foulbrood Pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States, *Journal of Invertebrate Pathology*, 75:1, 95-96, **2000**.
- [63] Bogdanov, S., Contaminants of bee products, *Apidologie*, 37:1, 1-18, **2006**.
- [64] González, M., and Marioli, J., Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus*

*larvae*, the causative agent of American Foulbrood, *Journal of Invertebrate Pathology*, 104:3, 209-213, **2010**.

[65] Reyes, M. G., Torres, M. J., Maggi, M. D., Marioli, J. M., Gil, R. R., Sosa, V. E., Uriburu, M. L., and Audisio, M. C., In vitro inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from *Flourensia* spp., *Industrial Crops and Products*, 50, 758-763, **2013**.

[66] Boligon, A. A., Brum, T. F. d., Zadra, M., Piana, M., Alves, C. F. d. S., Fausto, V. P., Júnior, V. d. S. B., Vaucher, R. d. A., Santos, R. C. V., and Athayde, M. L., Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae* *Journal of Invertebrate Pathology*, 112:2, 105-107, **2013**.

[67] Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86:6, 985-990, **1999**.

[68] Fuselli, S. R., García de la Rosa, S. B., Eguaras, M. J., and Fritz, R., Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-6, **2008**.

[69] Bastos, E., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., and Spivak, M., In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97:3, 273-281, **2008**.

[70] Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., and Zunino, P., Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood, *Veterinary Microbiology*, 131:3, 324-331, **2008**.

[71] Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., and Suzuki, C., Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials, *Journal of Invertebrate Pathology*, 112:1, 62-67, **2013**.

- [72] Alippi, A. M., and Reynaldi, F. J., Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources, *Journal of Invertebrate Pathology*, 91:3, 141-146, **2006**.
- [73] Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., and Fries, I., Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae, *Apidologie*, 41:1, 99-108, **2010**.
- [74] Güzerin, E., *Ardahan ve Artvin yöresindeki bal arılarının (Apis mellifera L.) mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [75] Özgör, E., *Isparta ve Burdur illeri bal arılarında (Apis mellifera L.) kış sonu kayıplarının mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [76] Özkırım A, and Keskin, N., Distribution of the major bacterial brood diseases diagnosed in Ankara and its surroundings, *Mellifera*, 2:4, 40-44, **2002**.
- [77] Özkırım, A., *Ankara ili ve çevresindeki bal arılarının (Apis mellifera L.) paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi*, Hacettepe Üniversitesi, **2000**.
- [78] Şahinler, N., and Gül, A., Hatay yöresinde bulunan arıcılık işletmelerinde arı hastalıklarının araştırılması, *Uludağ Bee Journal*, 5, 27-31, **2005**.
- [79] Şimşek, D., *Muğla İli Bal Arılarının (Apis mellifera L.) Mikrobiyal Ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [80] Yalçınkaya, A., *Hatay ve Adana Yöresindeki Bal Arılarının (Apis mellifera L.) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi*,

Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.

[81] Mill, A. C., Rushton, S. P., Shirley, M. D., Smith, G. C., Mason, P., Brown, M. A., and Budge, G. E., Clustering, persistence and control of a pollinator brood disease: epidemiology of American foulbrood, *Environmental Microbiology*, doi: 10.1111/1462-2920.12292, **2013**.

[82] Marcucci, M. C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26:2, 83-99, **1995**.

[83] Burdock, G., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food and Chemical Toxicology*, 36:4, 347-363, **1998**.

[84] Ghisalberti, E., Propolis: a review [honey-bees], *Bee world*, 60, 59-84, **1979**.

[85] Wollenweber, E., Hausen, B., and Greenaway, W., Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru, *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols*, 15, 112-120, **1990**.

[86] Bankova, V. S., de Castro, S. L., and Marcucci, M. C., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, 31:1, 3-16, **2000**.

[87] Gençay, Ö., and Salih, B., GC-MS analysis of propolis samples from 17 different regions of Turkey, four different regions of Brazil and one from Japan, *Mellifera*, 9, 19-28, **2009**.

[88] Çelemlı, Ö. G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., and Özkırım, A., More Insight into the Chemical Composition of Greek Propolis; Differences and Similarities with Turkish Propolis, *Z. Naturforsch.*, 68c, 429-438, **2013**.

[89] Schkurat, B., and Propawko, C., Effect of propolis against Varroa, *Pchelovodstvo*, 1, 19, **1980**.

[90] Mihai, C. M., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Chirilă, F., Moritz, R. F., and Schlüns, H., Interactions among flavonoids of propolis

affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae* *Journal of Invertebrate Pathology*, 110:1, 68-72, **2012**.

[91] Şahinler, N., and Kurt, S., A study on antifungal activity of formic acid and propolis extract against Chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis*, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3:8, 554-556, **2004**.

[92] Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B., and Ceyran, G., Önemli bir arı ürünü: propolis, *Uludağ Arıcılık Derg*, 2:2, 10-24, **2002**.

[93] Jolly, V., Propolis varnish for violins, *Bee World*, 59:4, 158-161, **1978**.

[94] Crane, E. *The past and present importance of bee products to man*, In: *Bee Products*. Springer, pp 1-13, **1997**.

[95] Monti, M., Bertt, E., Carminati, G., and Cusini, M., Occupational and cosmetic dermatitis from propolis, *Contact Dermatitis*, 9:2, 163-163, **1983**.

[96] Han, S., and Park, H., A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP on protein change of meat products, *Korean Journal of Animal Science (Korea Republic)*, **1995**.

[97] Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., and Krol, W., Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:Article ID 964149, 11, **2013**.

[98] Gençay Çelemlı, Ö., *Tekirdağ Bölgesi Propolis Örneklerinin Flavonoid, Karboksilik Asit ve Türevlerinin İzolasyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Mikroskopik Analizi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.

[99] Cirasino, L., Pisati, A., and Fasani, F., Contact dermatitis from propolis, *Contact dermatitis*, 16:2, 110-111, **1987**.

[100] Capasso, R., and Mascolo, N., Inhibitory effect of the plant flavonoid galangin on rat vas deferens in vitro, *Life sciences*, 72:26, 2993-3001, **2003**.

- [101] Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., and Popov, S., Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *Journal of Ethnopharmacology*, 64:3, 235-240, **1999**.
- [102] Popova, M., Bankova, V., Naydensky, C., Tsvetkova, I., and Kujumgiev, A., Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach, *Macedonian Pharm Bull*, 50, 9-14, **2004**.
- [103] Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T., and Whatley, F., Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis, *Zeitschrift für Naturforschung, C*, 46, 111-121, **1990**.
- [104] Peterson, J., and Dwyer, J., Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, *Nutrition Research*, 18:12, 1995-2018, **1998**.
- [105] Crozier, A., Jensen, E., Lean, M. E., and McDonald, M. S., Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 761:1, 315-321, **1997**.
- [106] Liu, R., Gao, M., Yang, Z.-H., and Du, G.-H., Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro, *Brain research*, 1216, 104-115, **2008**.
- [107] Dingman, D., and Stahly, D. P., Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components, *Applied and Environmental Microbiology*, 46:4, 860-869, **1983**.
- [108] *OIE Terrestrial Manual: American foulbrood of honey bees*, OIE, [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.02\\_AMERICAN\\_FOULBROOD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf), **2014**.



- [109] Benson, H. J., Brown A. E. *Benson's Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology*, McGraw-Hill Boston, **2006**.
- [110] Madigan, M. T., and Martinko, J. M., *Brock Biology of Microorganisms Prentice Hall*, 11th ed, **2011**.
- [111] Dobbelaere, W., de Graaf, D. C., Peeters, J. E., and Jacobs, F. J., Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR, *Apidologie*, 32:4, 363-370, **2001**.
- [112] Feldlaufer, M. F., Pettis, J. S., Kochansky, J. P., and Kramer, M., Residue levels in honey after colony treatment with the antibiotic tylosin, *American Bee Journal*, 144:2, 143-145, **2004**.
- [113] Thompson, H. M., Waite, R. J., Wilkins, S., Brown, M. A., Bigwood, T., Shaw, M., Ridgway, C., and Sharman, M., Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood, *Food Additives and Contaminants*, 22:6, 573-578, **2005**.
- [114] Wallner, K., Varroacides and their residues in bee products, *Apidologie*, 30:2-3, 235-248, **1999**.
- [115] Evans, J. D., Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 85:2, 105-111, **2004**.
- [116] Evans, J. D., and Lopez, D. L., Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae), *Journal of Economic Entomology*, 97:3, 752-756, **2004**.
- [117] Mirzoeva, O., Grishanin, R., and Calder, P., Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, *Microbiological Research*, 152:3, 239-246, **1997**.
- [118] Fernandes Júnior, A., Balestrin, E. C., Betoni, J. E. C., Orsi, R. d. O., Cunha, M. d. L. R. d., and Montelli, A. C., Propolis: anti-

Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100:5, 563-566, **2005**.

[119] Kilic, A., Baysallar, M., Besirbellioglu, B., Salih, B., Sorkun, K., and Tanyuksel, M., In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant Enterococcus faecium, *Ann. Microbiol*, 55:2, 113-117, **2005**.

[120] Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., and Topçu, G., Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology*, 86:1, 69-73, **2003**.

[121] Katircioğlu, H., and Mercan, N., Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions, *African Journal of Biotechnology*, 5:11, 1151-1153, **2006**.

[122] Melliou, E., and Chinou, I., Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis, *Planta medica*, 70:06, 515-519, **2004**.

[123] Vardar-Ünlü, G., Silici, S., and Ünlü, M., Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:7, 1011-1017, **2008**.

[124] Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., and Bankova, V. S., Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis, *Phytochemistry*, 70:10, 1262-1271, **2009**.

[125] Hegazi, A. G., Abd El Hady, F., and Abd Allah, F., Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 55:1/2, 70-75, **2000**.

[126] Arslan, S., Silici, S., Perçin, D., Koç, A. N., and Er, Ö., Antimicrobial activity of poplar propolis on mutans streptococci and caries development in rats, *Turkish Journal of Biology*, 36:1, 65-73, **2012**.

[127] Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J. A., and Rosalen, P. L., Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms, *Current microbiology*, 36:1, 24-28, **1998**.

[128] Mlagan, V., and Sulimanovic, D., Action of propolis solutions on *Bacillus larvae Apiacta*, 17, 16-20, **1982**.

[129] Simone-Finstrom, M., and Spivak, M., Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, *Apidologie*, 41:3, 295-311, **2010**.

[130] Keskin, N., Hazir, S., Baser, K.H.C., Kurkcuoglu, M., Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis, *Z. Naturforsch. C.*, 56:11-12, 1112-1115, **2001**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Aygün Schiesser

Doğum Yeri: İstanbul

Medeni Hali: Evli

E-posta: aygun@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Beytepe/ANKARA

## Eğitim

Lise: Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi/ANKARA-2001

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü-2005

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü-2008

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü-2014

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce/İleri Derece

## İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi,  
2007-Devam ediyor

## Deneyim Alanları

Mikrobiyoloji, Parazitoloji

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Türkiye'deki *Paenibacillus larvae* Genotiplerinin Tespit Edilmesi ve Farklı Propolislerin Bu Genotipler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

Proje No: 014 T04 604 001 Bütçe: 2100 TL

## **Tezden Üretilmiş Yayınlar**

-

## **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

**A. Schiesser, Ö. Gençay Çelemlı, A. Özkırım, N. Keskin,** The Preliminary Study about the Effect of Propolis against different Genotypes of *Paenibacillus larvae* , Apimondia-43th International Apicultural Congress, 29th September-4th October 2013, Kiev-UKRAINE- **Sözlü Sunum**