

**FARKLI ORGANİK ASİTLERİN, BAL ARILARINDAKİ
(*APIS MELLIFERA* L.) AMERİKAN YAVRU
ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI ETKENİ *PAENIBACILLUS*
LARVAE ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ**

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF DIFFERENT ORGANIC
ACIDS AGAINST *PAENIBACILLUS LARVAE* THE
CAUSATIVE AGENT OF AMERICAN FOULBROOD
DISEASE IN HONEY BEES (*APIS MELLIFERA* L.)**

BİLLUR KÜÇÜKÖZMEN

DOÇ. DR. ASLI ÖZKIRIM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

FARKLI ORGANİK ASİTLERİN, BAL ARILARINDAKİ (*APIS MELLIFERA* L.) AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI ETKENİ *PAENIBACILLUS LARVAE* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Billur KÜÇÜKÖZMEN

Yüksek Lisans, BİYOLOJİ Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ash ÖZKIRIM

Ocak 2022, 84 sayfa

Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni Gram (+), streptobasil ve sporlu bir bakteri olan *Paenibacillus larvae*'dir. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) larvaları *P. larvae* ile enfekte olduğunda ölüm mutlaka gerçekleşmektedir. Larvalarda ölümün gerçekleşmesi koloninin devamlılığını etkilemekte ve hızlı gerçekleşen koloni çöküşlerine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmaların pek çoğunda uygulanan mücadele yöntemleri vejetatif forma karşı başarı elde etse de spor forma karşı bu yöntemler etkisiz olmaktadır. Ayrıca kullanılan mücadele yöntemlerinin arılarda toksik etki bırakmaması, arı ürünlerinde kalıntıya sebep olmaması, arıcılık sektöründe uygulanabilir ve ulaşılabilir olması gerekmektedir. Bu nedenle şimdiye kadar *P. larvae*'nin spor formuna etkili, arı ürünlerinde kalıntı bırakmayacak, arıcılık sektöründe uygulanabilir veya ulaşılabilir bir yöntem henüz keşfedilmemiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, büyük koloni kayıplarına sebep olan başka bir arı zararlısı *Varroa destructor* ile mücadele yöntemlerinde hâli hazırda kullanılmakta olan organik asitlerin (oksalik asit, formik asit, laktik asit, asetik asit), *P. larvae*'nin vejetatif, sporo-

vegetatif ve spor formlarına bir etkisinin olup olmadığının ortaya çıkarılmasıdır. Organik asitler daha önce *P. larvae* üzerinde denenmemiş olup, literatürde tespit edilen eksikliğin kapatılması yönünde bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında *P. larvae*'nin tüm formlarının eldesine dair metot geliştirilmiş, fakat sporovejetatif formun stabilliğini koruyamaması nedeniyle deneyler vegetatif ve spor formlar ile yeniden düzenlenmiştir. Organik asitlerin arıcılıkta *V. destructor* ile mücadelesinde kullanılan konsantrasyonlara (oksalik asit %3.5, formik asit %60, asetik asit %50, laktik asit %15) uygun olarak hazırlanmıştır. Organik asitler farklı dozları (5 mL, 2,5 mL ve 1,25 mL), farklı muamele sürelerini (1 gün, 3 gün, 7 gün) ve farklı bakteri yoğunluklarını (1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB) içerecek şekilde *P. larvae* üzerinde test edilmiştir. Deney gruplarında organik asitlerin etkinliğinin test edilmesi amacıyla dökme plak yöntemiyle canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Organik asitler, *P. larvae*'nin spor formuna uygulanmadan önce yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ardından dökme plak yöntemiyle sonuç alınamayınca spor formun vegetatif forma dönüşümünü desteklenmesi amacıyla deneyler sıvı ortamda yeniden gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak organik asitlerin *P. larvae*'nin vegetatif formuna bakterisidal etki gösterdiği ve spor forma karşı etkisiz olduğu gözlemlenmiştir. Arıcılıkta organik asitlerin sahada *V. destructor* mücadelesinde kullanımının erken ilkbaharda kovanda mevcut olan *P. larvae* sporlarının vegetatif forma dönüşmesini ve ilk yavru döneminde ortamda bulunması muhtemel vegetatif formlarının dezenfeksiyonunun sağlandığı düşünülmektedir. Organik asit kullanımının *P. larvae* enfeksiyonunu önleyici bir etkisi bulunmamasına rağmen ortamdaki vegetatif formları yok etmesi dolayısıyla enfeksiyon oranını azaltıcı ve bulaşım oranını düşürücü bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Paenibacillus larvae*, *Varroa destructor*, *Apis mellifera* L., Amerikan Yavru Çürüklüğü, Organik asitler.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL EFFECT OF DIFFERENT ORGANIC ACIDS AGAINST *PAENIBACILLUS LARVAE* THE CAUSATIVE AGENT OF AMERICAN FOULBROOD DISEASE IN HONEY BEES (*APIS MELLIFERA* L.)

Billur KÜÇÜKÖZMEN

Master, Department of BIOLOGY

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslı ÖZKIRIM

January 2022, 84 pages

The causative agent of American Foulbrood is a spore-forming Gram (+) streptobacilli bacterium called *Paenibacillus larvae*. When honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae are infected with *P. larvae*, death is inevitable. Although the control methods applied in most of the studies achieve success against the vegetative form, these methods are ineffective against the spore form. In addition, the control methods used should not cause toxic effects on bees, cause residues in bee products, and should be applicable and accessible in the beekeeping. For this reason, a method that is effective on the spore form of *P. larvae* does not leave residues in bee products, and applicable or accessible in the beekeeping industry has not yet been discovered.

The aim of this thesis study is to determine the effects of organic acids (oxalic acid, formic acid, lactic acid, acetic acid) which are currently used in the control methods against *Varroa destructor* that is another bee pest that causes large colony losses, on vegetative, sporo-vegetative and spore forms of *P. larvae*. Organic acids have not been tested on *P. larvae* before, and this study has been carried out to close the gap that has been detected in the literature. Within the scope of the thesis, a method for obtaining all forms of *P. larvae* was developed, but the experiments were rearranged with vegetative and spore forms because the sporo-vegetative form could not maintain its stability. Organic acids were prepared by the concentrations used in the control *V. destructor* in beekeeping (oxalic acid 3.5%, formic acid 60%, acetic acid 50%, lactic acid 15%). Organic acids have been tested on *P. larvae* with different doses (5 mL, 2.5 mL, and 1.25 mL), different treatment times (1 day, 3 days, 7 days), and different bacterial densities (1×10^4 CFU, 1×10^3 CFU, and 1×10^2 CFU). To test the effectiveness of organic acids in the experimental groups, viable cell counting was performed using the pour plate method. Washing processes were carried out before the organic acids were applied to the spore form of *P. larvae*. Then, when no results could be obtained with the pour plate method, the experiments were carried out again in a liquid medium to support the germinating of *P. larvae* spores. As a result, it has been observed that organic acids have a bactericidal effect on the vegetative form of *P. larvae* and are ineffective against the spore form. It is thought that the use of organic acids in the field in beekeeping for the control of *V. destructor*, provides the transformation of *P. larvae* spores present in the hive into vegetative form in early spring, and the disinfection of the vegetative forms that are likely to be present in the environment during the first instar larvae of the brood. Although the use of organic acid does not have a preventive effect on *P. larvae* infection, it has been proven that it has an effect on reducing the infection rate and reducing the transmission rate, as it destroys the vegetative forms in the environment.

Keywords: *Paenibacillus larvae*, *Varroa destructor*, *Apis mellifera* L., American Foulbrood, Organic acids.

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımda ilgiyle takip etmemin ardından kapısını ilk çaldığım günden beri bana bir danışmandan çok daha fazlasını olan, tüm bilgi birikimi, hayata bakışı, zorluklar karşısında asla pes etmeyişiyle beni kendisine hayran bırakan, iyi bir bilim insanı olma yolunda her zaman örnek aldığım üzerimde çok fazla emeği olan sevgili hocam Doç. Dr. Aslı ÖZKIRIM'a,

Tez çalışmalarım sırasında yaşadığım aksiliklerde bana her zaman güler yüzle yardımcı olan başta Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR olmak üzere, Dr. Hasan AKYIL, Dr. Gülcan ŞAHAL ve Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tüm tez sürecimde bana her zaman tüm hevesiyle yardımcı olan, her koşulda destek olan, beraber gülüp beraber üzüldüğüm canım arkadaşım Beyza DOĞAN'a

Tez yazımı ve düzenlemesi sırasında karşıma çıkan problemlerde bana her zaman sakince ve güler yüzle yardım eden arkadaşım Burak BULUT'a,

Kendimi okula değil de evime geliyormuşum hissini yaratan, aynı koridoru paylaştığımız, her zaman güler yüzleriyle benimle sohbet eden tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Ümitsizliğe her düştüğümde beni oradan kurtaran ve devam etmemde bana her zaman destek olan, seneler içinde arkadaşım değil de kardeşim olan Özgün KÜRÜM'e

Bana olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, zor anlarımda beni rahatlatan, seçtiğim yolu destekleyen ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 19369.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Keşfedilmesi ve Sınıflandırılması	6
2.2. <i>P. larvae</i> Morfolojisi ve Fizyolojisi	7
2.3. <i>P. larvae</i> 'nin Virülans Faktörleri	11
2.3.1. <i>P. larvae</i> Tarafından Sentezlenen Yüzey Proteini	12
2.3.1.1. S Tabakası Yüzey Proteini "SplA":	12
2.3.2. <i>P. larvae</i> Tarafından Sentezlenen Enzimler	13
2.3.2.1. Kitinaz "PICBP49"	13
2.3.2.2. Proteaz	14
2.3.2.3. Enolaz	15
2.3.3. <i>P. larvae</i> Tarafından Sentezlenen Sekonder Metabolitler	15
2.3.3.1. Antimikrobiyal Moleküller;	16
2.3.3.1.1. Bacillibactin	16
2.3.3.1.2. Paenilarvin	16
2.3.3.1.3. Sevadisin	17
2.3.3.1.4. Paenilamicin	17
2.3.3.2. Toksinler	19
2.3.3.2.1. Plx1	19
2.3.3.2.2. Plx2	20
2.3.3.2.3. Plx3, Plx4 ve Plx5	20
2.3.3.2.4. C3larvin	21
2.4. <i>P. larvae</i> 'nin Enfeksiyon Oluşturma Mekanizması	21
2.5. <i>P. larvae</i> Enfeksiyonunda Ortaya Çıkan Klinik Belirtiler	23
2.6. <i>P. larvae</i> 'nin Yayılım Şekilleri	24
2.7. <i>P. larvae</i> 'ye Karşı Geliştirilen Mücadele Yöntemleri	25
2.7.1. <i>P. larvae</i> ile Mücadelede Mekanik Yöntemler	26
2.7.1.1. Yakma Yöntemi (Eradikasyon)	26
2.7.1.2. Silkme Yöntemi	26
2.7.2. <i>P. larvae</i> ile Mücadelede Kemoterapötik Yöntemler	27
2.7.3. <i>P. larvae</i> ile Mücadelede Doğal İçerikli Ürünler	28

2.7.3.1. Bitkisel Yağ ve Ekstraktlar	28
2.7.3.2. Arı Ürünleri	29
2.7.3.2.1. Propolis.....	30
2.7.3.2.2. Arı Sütü.....	31
2.7.4. <i>P. larvae</i> ile Mücadelede Biyokontrol.....	31
2.7.4.1. Probiyotik Mikroorganizmalar.....	31
2.7.4.2. Faj Terapileri.....	32
2.7.5. <i>P. larvae</i> ile Mücadelede Nanopartiküllerin Kullanılması	34
2.8. Organik Asitler ve Arıcılıkta Kullanım Alanları	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1. <i>P. larve</i> İzolatlarının Canlandırılması ve Safılıklarının Kontrol Edilmesi ..	36
3.2. 16S rRNA PCR Analizleriyle Tür Tayini	36
3.3. Organik Asitlerin Hazırlanması	38
3.4. <i>P. larvae'nin</i> Vejetatif, Sporovejetatif ve Spor Formlarının Hazırlanması	38
3.4.1. <i>P. larvae'nin</i> Sporovejetatif Form Eldesine Dair Metot Geliştirme	38
3.5. <i>P. larvae</i> Üretimi ve Bakteri Sayımı	39
3.6. Organik Asitlerle <i>P. larvae</i> İzolatlarının Muamelesi	40
3.7. Organik Asitlerin Etkinliğinin Dökme Plak Metoduyla Test Edilmesi	41
3.7.1. <i>P. larvae'nin</i> Vejetatif Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre	
Sayımı	41
3.7.2. <i>P. larvae'nin</i> Spor Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre	
Sayımı	42
3.7.2.1. <i>P. larvae'nin</i> Spor Formuna Dökme Plak Yöntemi Öncesi	
Yıkama Metodu Geliştirilmesi	42
3.7.2.2. <i>P. larvae</i> Spor Formunun Vejetatif Forma Dönüşümüne	
(canlılık testi) Dair Metot Geliştirme	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
4.1. <i>P. larve</i> İzolatlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları	46
4.2. 16S rRNA PCR ile Tür Tayini Sonuçları	47
4.3. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Etkinlik Test Sonuçları.....	48
4.3.1. <i>P. larvae'nin</i> Vejetatif Formunda Antimikrobiyal Etkinlik Test	
Sonuçları	48
4.3.1.1. Oksalik Asit.....	48
4.3.1.2. Formik Asit.....	50
4.3.1.3. Asetik Asit.....	52
4.3.1.4. Laktik Asit	54
4.3.2. <i>P. larvae'nin</i> Spor Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre Sayım	
Sonuçları	56
4.3.2.1. Oksalik Asit	56
4.3.2.2. Formik Asit.....	58
4.3.2.3. Asetik Asit.....	60
4.3.2.4. Laktik Asit	62
4.3.3. <i>P. larvae</i> Spor Formunun Vejetatif Formuna Dönüşümüne (Canlılık	
Testi) Dair Metot sonuçları.....	64
5. YORUM.....	69

EKLER.....	83
EK 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. larvae</i> 'nin koloni morfolojileri [38]. ERIC I: A-B, ERIC II: C-F.	7
Şekil 2.2. <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formu (Billur Küçüközmen).....	8
Şekil 2.3. <i>P. larvae</i> sporlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri. A) ERIC I, B) ERIC II, C) ERIC III, D) ERIC IV, E) ERIC V [36].	9
Şekil 2.4. <i>P. larvae</i> 'nin Mikrobiyolojik yöntemlerle yapılan izolasyon işlemlerinde izole edilebilecek türlerin spor ya da vejetatif koloni morfolojisi farklılıkları; A) <i>P. larvae</i> vejetatif ve sentral sporlanma, B) <i>E. feacalis</i> vejetatif morfolojisi, C) <i>B. laterosporus</i> terminal spor yapısı, D) <i>B. alvei</i> terminal spor yapısı [45].....	9
Şekil 3.1. 1×10^8 KOB olan kültürün, 1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB yoğunluklarına dilüsyonu (Billur Küçüközmen).	40
Şekil 3.2. <i>P. larvae</i> 'nin değişen yoğunluktaki 1×10^4 KOB (mavi rak), 1×10^3 KOB (pembe rak) ve 1×10^2 KOB (sarı rak) kültürlerin organik asitlerle muamelesi (Billur Küçüközmen).....	41
Şekil 3.3. Dökme Plak gerçekleştirilen deney grubu (Billur Küçüközmen).	41
Şekil 3.4. Farklı yoğunluklarda hazırlanan <i>P. larvae</i> 'nin spor formlarıyla değişen oranlarda organik asitlerle muamele edilen örneklerin yıkama prosedürünün ardından sıvı besiyerine aktarımı (Billur Küçüközmen).....	43
Şekil 3.5. Tez deneylerinin grafiksel özeti; her bir organik asit ve muamele süresi için aynı metot kullanılmıştır. A) Deney setleri, B) Deney gruplarından dökme plak metoduyla organik asitlerin antimikrobiyal etkinliklerinin test edilmesi.	44
Şekil 4.1. 06/04 kodlu izolatin agaroz jel görüntüsü (Billur Küçüközmen).....	48
Şekil 4.2. Oksalik asitin <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).	49
Şekil 4.3. Formik asitin <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).	51
Şekil 4.4. Asetik asitin <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).	53
Şekil 4.5. Laktik asitin <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).	55

Şekil 4.6. Oksalik asitin <i>P. larvae</i> 'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).....	57
Şekil 4.7. Formik asitin <i>P. larvae</i> 'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).....	59
Şekil 4.8. Asetik asitin <i>P. larvae</i> 'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).....	61
Şekil 4.9. Asetik asitin <i>P. larvae</i> 'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).....	63
Şekil 4.10. Organik asitlerle yapılan <i>P. larvae</i> spor formunun vejetatife dönüşümü deneylerinde inkübasyonun 5. günü (Oksalik asit grubu).....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 PCR örneklerinin hazırlanması	37
Çizelge 3.2. Tez deneylerinde kullanılan etkiletmeler (Örneğin OM15 etiketli test plağı; Oksalik asitin, <i>P. larvae</i> 'nin 1x10 ⁴ KOB ile 1 gün 5 mL dozda muamele edilmesi anlamına gelmektedir.	45
Çizelge 4.1. Kültür koleksiyonunda bulunan izolatların özellikleri	46
Çizelge 4.2. <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif formlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda negatif kontrol grubu sonuçları	56
Çizelge 4.3. <i>P. larvae</i> 'nin spor formlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda negatif kontrol grubu sonuçları	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

km	Kilometre
%	Yüzde
°C	Santigrat
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
g	Gram
ng	Nanogram
mL	Mililitre
L	Litre
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
v/v	Hacim/Hacim Oranı

Kısaltmalar

10-HDA	trans10-Hidroksi Dekanoik Asit
ADP	Adenozin difosfat
AdYÇ	Adi Yavru Çürüklüğü
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
ART	ADP-ribo transferaz Toksini
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
AvYÇ	Avrupa Yavru Çürüklüğü
AYÇ	Amerikan Yavru Çürüklüğü
BHI	Brain-Heart Infusion
Bp	Baz Çifti

BYE	Bitkisel Yağ ve Ekstraktlar
CoIA	Kollojenaz Aktivite Gösteren Metalloproteaz
DMSO	Dimetil Sülfooksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EMP	Emden Meyerof Parnas Yolağı
ERIC	Enterobakteriyal Tekrarlayan Genler Arası Bölgeler
InhA	İnhibitör A Metalloproteaz
KKS	Koloni Kayıpları Sendromu
KOB	Koloni Oluşturan Birim
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MYÖ	Milyon Yıl Önce
Nal	Nalidiksik Asit
NRPS	Ribozomal Olmayan Peptid Sentetaz
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Potansiyel Hidrojen
PKS	Poliketit Sentetaz
PM	Peritrofik Matriks
PO	Fenol oksidaz
Rep-PCR	Repetitive PCR
Rpm	Dakikada Dönüş Sayısı
SDS	Steril Distile Su
SSF	Steril Serum Fizyolojik

1. GİRİŞ

Bal arıları Filum: Arthropoda, Sınıf: Insecta, Takım: Hymenoptera, Familya: Apidae'de yer almaktadır. Dünya üzerinde var oldukları Kretase Dönemi'nden (145-66 MYÖ) beri çiçekli bitkilerle birlikte evrim geçirmiş ve tozlaşmaya sağladıkları katkı ile ekosistem açısından oldukça önemli bir yere sahip olmuşlardır [1]. Bal arıları (*Apis mellifera* L.) günümüzde de tükettiğimiz besinlerin polinasyonunda büyük rol oynamaktadır [2]. Bu sebeple gelişmiş ülkelerin arıcılıktaki önceliği arı ürünlerinin eldesinden çok, bitkilerde polinasyonun artırılmasıyla ürün verimliliğine katkı sağlamaktır [3]. Ülkemizde ise arıcılık, bal ve diğer arı ürünlerinin üretimiyle ön plana çıkmaktadır. Türkiye'de arıcılık sektörü her geçen yıl büyümekte ve ülke ekonomisine olan katkısı artmaktadır. Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği'nden elde edilen son verilere göre Türkiye'deki arıcı sayısı 80.675 ve kovan sayısı 812.836'dır. Ülkemiz arıcılık kapasitesi ve potansiyeli ile dünyada 2. sırada yer almaktadır [4, 5].

Arıcılık sektörünün verimliliğini etkileyen en önemli sorun arı hastalıkları ve koloni kayıplarıdır. Koloni kayıplarının nedenleri farklı olmakla birlikte 2006 yılında gündeme gelen Koloni Kayıpları Sendromu (CCD/KKS) ile toplu arı ölümleri görülmeye başlanmıştır. KKS beklenmeyen bir anda koloniden geriye yalnızca kraliçe, yavru ve çok az miktarda ergin arının kalması durumudur [3, 6]. Bunun dışında pestisitler, zararlılar, uygulanan yanlış arıcılık teknikleri, kolonideki direnç düşüklüğü, arı hastalığı etkenleri gibi koloninin yaşamını olumsuz etkileyen durumlar tek başlarına ya da birlikte sinerji oluşturarak toplu koloni kayıplarına sebep olmaktadır [3, 6-8].

Arı hastalıkları, koloni kayıplarına yol açan etkenlerden birisi olmasının yanında arıcılıkta sürdürülebilirliği de tehdit eden en önemli unsurdur. Bu yüzden arı hastalıklarıyla mücadele bilimsel ve teknik açıdan üzerinde en fazla çalışılan konudur. Arı hastalıkları viral, bakteriyel, fungal ve paraziter kaynaklı olabilmektedir [9-11].

Bal arıları sosyal yaşayan böcekler olmaları ve kovandaki birey sayısının 40.000 ile 80.000 arasında olması nedeniyle, enfeksiyonel hastalıkların kovan içerisindeki yayılımı hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir [10, 12]. Enfeksiyonel hastalıkların içerisinde ise en hızlı yayılan grup bakteriyel kaynaklı hastalıklardır. Fungal etkenlerin sebep olduğu

hastalıklar ise direkt olarak dış ortam koşullarına (sıcaklık, nem, kovan havalandırması vb.) bağlı olduğundan yayılım hızları bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlara göre daha yavaştır. Viral kaynaklı hastalıkların yayılım hızının bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlardan daha yavaş olmasının sebebi ise virüslerin zorunlu hücre içi parazitler olmasıyla canlı yaşamın bulunmadığı dış ortamlarda kendini gösterememesidir. Ancak bakterilerin patojenitesine bağlı olarak serbest yaşayabilmeleri ve spor form gibi dayanıklı formlar oluşturmaları, mücadele yöntemlerini daha da zorlaştırmaktadır. Ayrıca bakteriyel arı hastalıkları kolonide larvaları etkilemesi sebebiyle koloninin geleceğini de tehdit etmektedir. Bu nedenle bakteriyel kaynaklı arı hastalıklarıyla mücadele yöntemleri son derece önemlidir. Bakteriyel enfeksiyon sonucu oluşan arı hastalıkları; Adi Yavru Çürüklüğü, Avrupa Yavru Çürüklüğü ve Amerikan Yavru Çürüklüğüdür [13-16].

Adi Yavru Çürüklüğü (AdYÇ) etkeni kovan içinde bulunan fırsatçı saprofit bakterilerdir. Kovan içindeki ortam koşulları larvalar için olumsuz hale geldiğinde, saprofit bakteriler fırsatçı patojen olarak larvaları enfekte etmektedir. Bu ortam koşulları; genellikle bahar aylarında gece gündüz sıcaklık farkının artmasıyla yavrulu petek gözler üzerinde kuluçka yaparak larvaları sıcak tutacak ergin arıların çekilmesi ve larvaların açıkta kalmasına bağlıdır. AdYÇ ile mücadele; kolonideki ergin arı sayısının artırılmasıyla, çerçevelerin sıkıştırılarak bir yönde toplanmasıyla, kovan içinde ve arıcılık ekipmanlarında hijyene dikkat edilmesiyle, koloninin beslenmesindeki eksiklerin giderilmesiyle gerçekleştirilir [14-17].

Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ) etkeni Gram (+) ve sporsuz bir bakteri olan *Melissococcus plutonius*'dir. *M. plutonius*, larva dokusu üzerinde herhangi bir patojenite göstermemekte fakat larvaların bulunduğu petek gözündeki zengin besin içeriğine ortak olmaktadır. Bu durum larvaların bir süre sonra yetersiz besin sebebiyle ölmesine sebep olur. Ortamdaki besin tükendiğinde *M. plutonius* da yok olmaktadır. Bu durum hastalığın yayılmasını zorlaştıran ve mücadeleyi kolaylaştıran bir etkidir. Kovan içi direncin yüksek olması amacıyla kovana besin takviyesi yapılması (polenli kek, polenli çerçeve vb.) ve ergin arıların sayıca yeterli seviyede olmasıyla AvYÇ tedavi edilebilmektedir [13-18].

Tez çalışmasının konusunu oluşturan Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) etkeni, Gram (+) sporlu bir bakteri olan *Paenibacillus larvae*'dir. Sporlu bir bakteri olması sebebiyle, mücadelesi en zor yavru çürüklüğü çeşididir. Bir larvanın *P. larvae* ile enfekte olması için 10 sporun yeterli olduğu raporlanmıştır [19]. *P. larvae* sporları larvaların üzerinde vejetatif forma dönüşerek hızla çoğalmaya başlar. Bakteri larva dokusuyla beslenir. Larvaların ölümü gerçekleştikten sonra *P. larvae* spor forma dönüşür ve yeni bir larvanın enfeksiyonuna kadar spor formu dormant halde kalır. *P. larvae* ergin arıları enfekte edememektedir. Ancak ergin arılar kovan içerisinde yavru arıların bakımı, petek gözlerinin temizliği gibi görevleri gerçekleştirirken tüylerine yapışan *P. larvae* sporları ile kontamine olmaktadır. Bu kontaminasyon ergin arıları mekanik vektör haline getirir ve AYÇ'nin koloni içinde, koloniler arasında ve çevrede yayılmasını sağlar [10, 20, 21]. *P. larvae* sporları 35 yıl süreyle balda, arıcılık ekipmanlarında ve çevrede canlılığını koruyabilmektedir [22, 23]. Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığının klinik belirtilerinin ortaya çıkışı diğer yavru çürüklüklerinde olduğu gibi larvaların ölmesi ve ardından çürümesiyle gerçekleşmektedir. *P. larvae* sporlarının uzun yıllar canlılığını koruyabilmesi ve klinik belirtilerin larvaların ölümünden sonra ortaya çıkması Amerikan Yavru Çürüklüğüyle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. *P. larvae*'nin vejetatif ve spor formlarına karşı etkinliği kanıtlanmış bir tedavi yöntemi hali hazırda bulunmamaktadır. Literatürde *P. larvae*'ye karşı pek çok farklı mücadele yöntemi ve etken madde; in vitro, in vivo ve arazi çalışmalarında denenmiştir. Bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerine yapılmıştır. Ancak klinik belirtilerin ortaya çıktığı evrede, *P. larvae*'nin vejetatif formlarının çoğunluğu spor forma dönüştüğünden araştırılan mücadele yöntemleri uygulanabilir olmamaktadır. Bu yüzden AYÇ'de kabul edilen mücadele yöntemi, hastalığın gerçekleştiği kovanların ve 6 km çapındaki alanın karantina altına alındıktan sonra tüm içeriğiyle birlikte yakılmasıdır [24, 25]. Fakat bu mücadele yöntemi arıcılık sektörü için ekonomik açıdan oldukça zorlayıcıdır. Yakılan kovanlar için herhangi bir tazminat uygulaması olmaması sahada büyük sıkıntılar oluşturmaktadır. AYÇ, bakteriyel kaynaklı arı hastalıkları arasında mücadelesi en zor olan ve etkili bir mücadele yönteminin geliştirilmesi için üzerinde en fazla çalışma yapılan konulardan biridir [19, 26].

Arıcılık sektöründe, hakkında en fazla çalışma yapılan bir diğer arı hastalığı ise *Varroa destructor*'dur. *V. destructor* arılarda ektoparazittir ve Filum: Arthropoda, Sınıf:

Arachnida, Takım: Mesostigmata, Familya: Varroidae'de yer almaktadır [27]. *V. destructor* bal arılarının kitinize dokusuna gnathosomaları yardımıyla penetre olarak hemolenf ile beslendiği düşünülürken, 2018 yılında yapılan bir çalışmayla *V. destructor*'un hemolenf yerine bal arılarında immün sistem elemanlarının senteziyle görevli olan yağ dokusuyla beslendiğini rapor etmiştir [28]. *V. destructor* ile enfekte olan bal arıları hem immün sistemin baskılamasıyla hem de kitinize dokuda oluşan lezyonlar ile sekonder enfeksiyonlara açık hale gelmektedir [29]. *V. destructor*'un koloni içinde yayılımı hızlıdır. Bunun en büyük sebebi *V. destructor*'un yaşam döngüsünün bal arısının yaşam döngüsünü birebir takip etmesidir. *V. destructor* üreme ve larval dönemini bal arısının da larval dönemi sırasında petek gözlerde geçirmekte; ergin döneminde ise ergin bal arıları üzerinde bulunmaktadır [27-29]. İki canlının da Arthropoda filumunda yer alması sebebiyle, kullanılacak mücadele yönteminin *V. destructor*'u etkilerken *A. mellifera*'ya zarar vermemesi gerekmektedir. Bu açıdan doğru mücadele yöntemini seçmek teknik arıcılıkta en kritik noktadır. *V. destructor* ile mücadelede düşük toksisite, yüksek etki ve arı ürünlerinde kalıntı bırakmaması gibi parametrelere dikkat edilmesi gerekir [27, 30, 31]. *V. destructor* tedavisinde biyolojik ve fiziksel yöntemler, kimyasal ve organik ilaçlar kullanılmaktadır. Organik asitler (oksalik asit, formik asit, laktik asit, asetik asit); çabuk buharlaşması, ergin arı ve larvalarda toksik etkisinin düşük olması, *V. destructor*'a karşı %94'e varan etki oranlarıyla tercih edilmektedirler. Organik asitler hava sıcaklığı 15 °C altındayken, buhar halinde ya da damlatma şeklinde kovan içerisine etkin şekilde uygulanmaktadır [16, 30-32].

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amacı *V. destructor* mücadelesinde etkili olan ve sıkça tercih edilen organik asitlerin (oksalik, formik, laktik ve asetik asit) aynı zamanda arıcılık sektöründe ciddi sorunlara sebep olan *P. larvae* (vejetatif, sporo-vejetatif ve spor formları) üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Yapılan literatür araştırmasında şu ana kadar böyle bir çalışmaya rastlanmamış olup tez çalışması ile literatüre katkı sağlanması planlanmıştır.

Çalışma boyunca aşağıdaki sorulara yanıtlar aranmıştır;

- Organik asitler, Gram (+) ve sporlu bir bakteri olan *P. larvae*'nin vejetatif, sporo-vejetatif veya spor formuna karşı bakteriyostatik ya da bakterisit herhangi bir antibakteriyel etkisi mevcut mudur?

Eğer etkili ise,

- Hali hazırda *V. destructor*'a karşı organik asitlerle yapılmakta olan mücadeleyle arılıklarda *P. larvae* 'ye karşı mücadele de sağlanmakta mıdır?
- Organik asitlerin *P. larvae*'ye karşı etkinlik süresi ne kadardır?
- Organik asitler hangi konsantrasyonda *P. larvae* 'ye karşı etkilidir?
- *P. larvae* enfeksiyon yoğunluğu organik asitlerin etkinliğini değiştirebilir mi?

2. GENEL BİLGİLER

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (Office International des Epizooties, OIE) tarafından bildirilmesi zorunlu hayvan hastalıkları arasında yer almaktadır [33]. Hastalık etkeni olan *Paenibacillus larvae*'nin konağı bal arısı larvalarıdır. Mikrobiyolojik açıdan değerlendirildiğinde etken bakteri enfeksiyonu konak özgüllüğüne dayanmaktadır. Keşfedildiği 1900'lü yıllardan bu yana üzerinde yapılan araştırmalar devam etmektedir. Gram (+) sporlu bir bakteri olması, çok çeşitli sekonder metabolitler üretmesi, patojenite mekanizmalarında henüz açıklığa kavuşturulmamış birçok yönünün bulunması *P. larvae*'ye sadece arı sağlığı açısından değil mikrobiyolojik olarak da önemli bir noktaya taşımaktadır [19].

2.1. Keşfedilmesi ve Sınıflandırılması

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) etkeni ilk olarak 1906 yılında George F. White tarafından izole edilmiş ve *Bacillus larvae* olarak isimlendirilmiştir. Hastalık ilk kez Amerika'da görüldüğü için Amerikan Yavru Çürüklüğü adını almıştır. AYÇ'de gözlemlenen klinik belirtilerin farklılığı sebebiyle, 1950 yılında Katzelson AYÇ görülen bir kolonideki yavrulu petekten izole ettiği bakteriyi farklı bir tür olarak tanımlamış ve *Bacillus pulvifaciens* olarak isimlendirmiştir. Ayrıca gözlemlendiği klinik belirtilere bakarak hastalığa “tozlu göz hastalığı” anlamına gelen “powdery scale disease” adını vermiştir. AYÇ'nin tanımlanmasındaki bu karmaşıklık filogenik tür tanımlamaları yapılan kadar devam etmiştir [10, 20, 26].

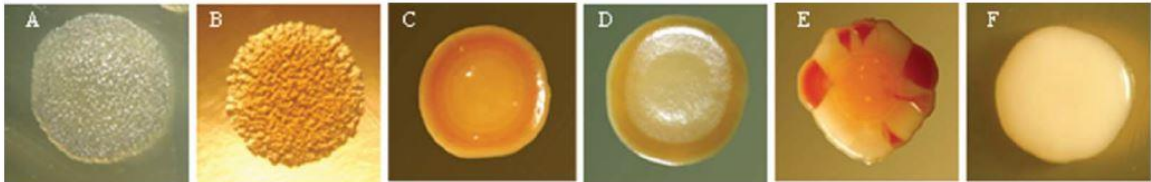
Filogenik tür tanımlamalarıyla birlikte *Bacillus* cinsi içindeki türler yeniden düzenlenmiştir. Yapılan filogenik çalışmalar doğrultusunda *Bacillus* cinsinden ayrılan türler basil benzeri anlamına da gelen *Paenibacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılarak; *B. larvae* ve *B. pulvifaciens* türleri de bu cinse dahil edilmiştir [26, 34]. *Paenibacillus* sınıfına dahil edilmeleriyle; *P. larvae* ve *P. pulvifaciens* olarak adlandırılmaya başlanan iki tür üzerinde yapılan moleküler çalışmalar, türlerin yüksek benzerlik göstermesi sebebiyle iki alt tür olduklarını rapor etmiştir. Buna göre *P. larvae* sub. *larvae* ve *P. larvae* sub. *pulvifaciens* olarak isimlendirilmeleriyle *P. pulvifaciens*'in aslında ayrı bir tür olmadığı, *P. larvae*'nin bir alt türü olduğu bildirilmiştir [26, 34, 35]. İlerleyen çalışmalarda ise daha ayrıntılı yapılan klasik (koloni morfolojisi, spor yapısı, elektron mikroskopu taramaları)

ve modern (Pulse-field jel elektroforezi, protein profillemesi, tekrarlayan element PCR) analizler ile *P. larvae*'nin iki alt türü olmadığı tespit edilmiştir [10, 35]. Böylelikle filogenik çalışmaların başlangıcındaki tür isimlendirme arayışı birbirini izleyen birçok çalışma sayesinde sonlandırılmıştır. Günümüzde *P. larvae* tek bir tür olarak tanımlanmakta ve literatürde AYÇ hastalığı etkeni olarak rapor edilmektedir [36].

P. larvae tür tanımının kesinleşmesiyle birlikte genomik işaretleme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda repetitive-PCR (rep-PCR) yöntemi ve tekrarlayan gen bölgelerini işaretlemek amacıyla “enterobacterial repetitive intergenic consensus” (Enterobakteriyal tekrarlayan genler arası bölgeler, ERIC) sekansları kullanılmıştır. Genomik işaretlemelerde 4 farklı genotip üzerinde durulmuş ve genotipler ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV olarak adlandırılmıştır [20, 37]. 2020 yılında Beims ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla, baldan ERIC V genotipi de izole edilerek genotiplere dahil edilmiştir. Tespit edilen genotipler arasında koloni morfolojisi ve virülans gibi parametrelerde farklılıklar bulunduğu rapor edilmiştir [10, 35, 38]. Söz konusu morfolojik ve virülans farkları ilgili başlıklar altında detaylandırılmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, ERIC I ve ERIC II genotiplerinin arazi koşullarında diğer genotiplere göre daha sık izole edildiği tespit edilmiştir [10, 39, 40].

2.2. *P. larvae* Morfolojisi ve Fizyolojisi

P. larvae, Gram (+) ve sporlu bir bakteridir. Streptobasil yapısında, poliritiş flagellaya sahip ve ortalama 0.5 µm genişliğinde, 1.5-6 µm uzunluğundadır [35]. Koloni morfolojileri çok çeşitlidir ve aynı genotipte bile çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.1.). Söz konusu çeşitlilik *P. larvae*'nin streptobasil yapısına ve gram özelliğine etki etmemektedir [35, 38]. *P. larvae*'nin vejetatif formu Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. *P. larvae*'nin koloni morfolojileri [38]. ERIC I: A-B, ERIC II: C-F.



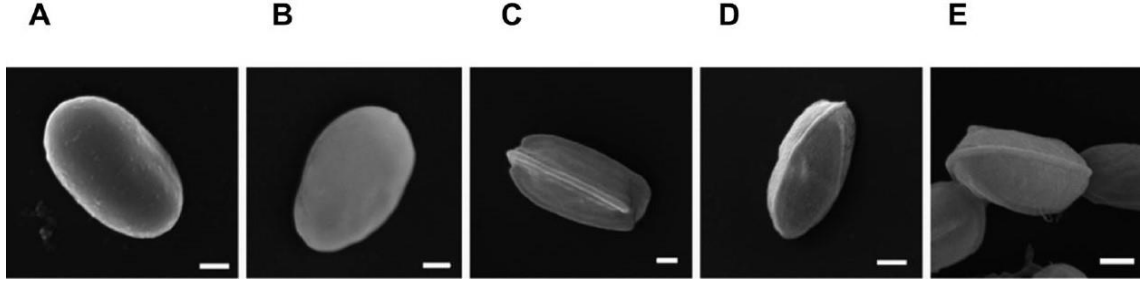
Şekil 2.2. *P. larvae*'nin vejetatif formu (Billur Küçüközmen)

P. larvae fakültatif anaerobiktir [39]. Oksijenli ortamda ürediğinde Katalaz negatif olmasına rağmen, oksijenin yarattığı oksitadif etkinin giderilmesinde peroksiredoksin, alkil hidroperoksit redüktaz, tioredoksin ve tioredoksin peroksidaz enzimlerini kullanmaktadır [41]. Ayrıca oksijenli solunum yapan canlılarda görüldüğü gibi nitrati alternatif elektron tutucu olarak kullanmaktadır [39].

P. larvae, larvada enfeksiyona sebep olmadan önce larvanın arı sütü ve bal karışımından oluşan besinine ortak olmaktadır. Şeker metabolizmasında Embden Meyerof Parnas (EMP) ve oksidatif pentoz-fosfat yollarıyla metabolize etmektedir. *P. larvae* enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında hemolenfe ulaştığında burada yüksek miktarda bulunan trehalozu da metabolize etmektedir [38, 39, 42]. Proteinler ise hidrolize uğratılarak yıkılmakta ve bakteri metabolizmasında kullanılan aminoasit senteziyle, aminoasitler sentezlenmektedir [43].

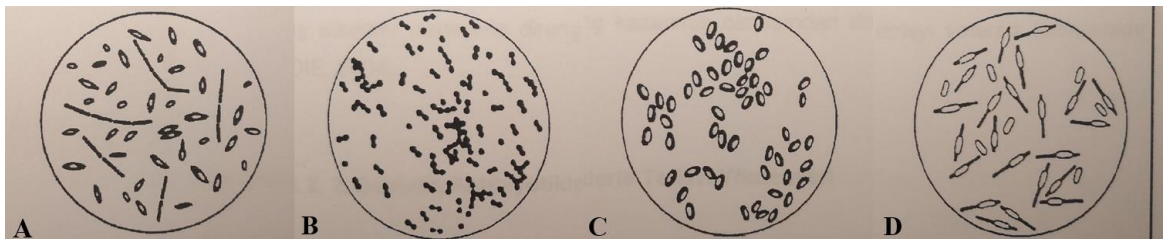
P. larvae sporları sentral yerleşim göstermektedir. Diğer bakteri sporlarında olduğu gibi sıcaklığa, kimyasallara ve diğer çevresel etkenlere karşı oldukça dayanıklıdır [23, 35]. Sporlar çok uzun yıllar süresince canlılıklarını koruyabilmektedir [35, 44]. *P. larvae*'nin

spor morfolojileri genotipler arasında farklılıklar (Şekil 2.3) göstermektedir [36]. Genotiplerin spor yapıları arasında gözlenen morfolojik farklılıkların *P. larvae*'nin yaşam döngüsüne herhangi bir etkisinin olup olmadığı henüz araştırılmamıştır.



Şekil 2.3. *P. larvae* sporlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri. A) ERIC I, B) ERIC II, C) ERIC III, D) ERIC IV, E) ERIC V [36].

P. larvae enfeksiyonu süresince, larvanın bulunduğu ortama bağlı olarak sekonder enfeksiyon yaratabilecek birçok mikroorganizma da bulunmaktadır. Bu durum laboratuvar ortamında *P. larvae*'nin morfolojik tanımlanması yapılması sırasında karışık kültür elde edilmesine sebep olmaktadır. Elde edilen karışık kültürde; *Enterococcus faecalis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus* türleri sıklıkla bulunmaktadır [45]. Mikrobiyolojik yöntemlerle yapılan izolasyon ve identifikasyon işlemlerinde bu türler arasında görülen spor ya da vejetatif koloni morfolojisindeki farklılıklardan yararlanılmaktadır. Bakterilere ait bu morfolojik farklılıklar Şekil 2.4.'de verilmiştir [45].



Şekil 2.4. *P. larvae*'nin Mikrobiyolojik yöntemlerle yapılan izolasyon işlemlerinde izole edilebilecek türlerin spor ya da vejetatif koloni morfolojisi farklılıkları; **A)** *P. larvae* vejetatif ve sentral sporlanma, **B)** *E. faecalis* vejetatif morfolojisi, **C)** *B. laterosporus* terminal spor yapısı, **D)** *B. alvei* terminal spor yapısı [45].

Farklı bakterilerin bulunduğu karışık kültür ortamında *P. larvae*'nin enfektif formu spor formudur. Spor form larvalarda enfeksiyon meydana getirmektedir. Ergin arılar sporlarla

enfekte olmamakta, yalnızca kolonide mekanik vektör rolünü üstlenerek hastalığın yayılımını gerçekleştirmektedir [19, 46]. Ergin arıların enfekte olmamasının temel sebebi, arıların tam başkalaşım geçiren (holometabol) canlılar olmasıdır. Tam başkalaşım sürecinde sindirim sisteminde gerçekleşen fizyolojik ve immünolojik farklılıklar, ergin arılarda *P. larvae* sporlarının germinasyonu için uygun bir ortam sağlamamaktadır [47]. *P. larvae* sporlarının germinasyonunun gerçekleştiği sindirim sisteminde larvalar ve ergin arılar arasında görülen 3 fark larvalarda germinasyonu sağlamaktadır. İlk fark, bal arılarında orta bağırsak epitelini sararak koruyucu bir yapı oluşturan peritrofik matriksin (PM), erginleşme süresince kalınlaşmasıdır [47]. İkinci fark, larvaların beslenme şeklinin (arı sütü baskın), gelişimin ilerlemesiyle birlikte ergin bal arılarında (bal ve polen) değişmesidir. Bu besin değişimi, öncelikle larvanın pH=6.8 olan değer in ergin arılarda pH=5.6-6.3'e kadar düşmesine neden olmaktadır [22, 48]. Aynı zamanda gerçekleşen besin değişimi *P. larvae*'nin germinasyonunu tetikleyen L tirozince zengin arı sütünden, germinasyonu inhibe eden, indol ve fenol bileşiklerce zengin bal ve polene geçmesiyle; ergin arıların *P. larvae* ile enfekte olması engellenmiş olmaktadır [22, 47]. Bu durum *P. larvae*'nin spor yüzeyinde bulunan ve germinasyon faktörlerinin (L-tirozin ve ürik asit) bağlandığı reseptörlere, indol ve fenol bileşiklerin bağlanmasıyla gerçekleşmektedir [44]. *P. larvae*'nin germinasyonunda etkili olan, larva ve ergin arıların sindirim sisteminde görülen üçüncü fark ise, larvalarda bir bütün olan sindirim kanalının erginleşmeyle birlikte orta ve arka bağırsak olarak ayrılmasıdır [22, 44]. Gerçekleşen bu ayrımla birlikte, larvaların bütün halde bulunan sindirim kanalında *P. larvae*'nin germinasyonu için bir arada bulunması gereken L-tirozin ve ürik asit birbirinden ayrılmaktadır [44]. Larvalarda erginleşmeye bağlı sindirim sisteminde oluşan farklılıkların yanında immün sistemde gerçekleşen değişimler de ergin arıların *P. larvae*'ye karşı dirençli olmasını sağlayan başka bir etkidir. İmmün sistemde görülen değişimlerin başında, özellikle böceklerin bağışıklık mekanizmalarında en önemli enzimlerden biri olan fenoloksidaz (PO) aktitesindeki değişimdir. PO sentezi, larvaların *P. larvae* enfeksiyonuna karşı en hassas olduğu 24-48. saat aralığında gerçekleşmemekte ve larval gelişimin 3. gününden itibaren sentezi başlamaktadır [49, 50]. Bunun yanında larvaların erginleşmesiyle birlikte, immün sistemde bulunan antimikrobiyal peptitlerin (AMP) çeşitleri ve miktarında artış gerçekleşmektedir [51].

Bal arılarının holometabol canlılar olmasıyla birlikte larvalar ile ergin bireyler arasında görülen fizyolojik ve immünolojik farkların bir araya gelmesiyle, larvalar *P. larvae*

sporlarına karşı hassasiyet gösterirken ergin arılar ise *P. larvae* sporlarına karşı dirençli hale gelmektedir. Bu durum ergin arıları asemptomatik taşıyıcılar olarak kolonide yer almalarına neden olmaktadır [20, 52].

Larva ve ergin arı arasında *P. larvae* enfeksiyon oluşumundaki farkların yanı sıra larvalarda oluşan enfeksiyonun mekanizmasında *P. larvae*'nin genotipleri arasında da farklar bulunmaktadır (konu 2.1.4. *P. larvae* Enfeksiyon Oluşturma Mekanizması başlığında detaylandırılmıştır). Bu farklar mortalite sürelerine de etki etmektedir. *P. larvae*'nin en virülant ERIC III, ERIC IV ve ERIC V genotipleri larvayı 3 günde öldürmektedir. Bu 3 günlük sürede petek gözler kapanmadan ölen larvaların işçi arılar tarafından fark edilmesi ve kovandan uzaklaştırılması hızlı olmaktadır [36, 37]. Kovandan hızla uzaklaştırılan larvalarda spor formunda bulunan *P. larvae* yoğunluğu, mortalitenin daha yavaş gerçekleştiği ve arazi şartlarından daha sık izole edilen ERIC I ve ERIC II genotiplerindeki *P. larvae* sporlarına kıyasla yoğunluğu daha azdır [19, 36]. Mortalitenin daha yavaş gerçekleştiği ve bu sürede daha yoğun spor form oluşturan ERIC I ve ERIC II genotiplerinin larvayı öldürme süreleri sırasıyla 12 ve 7 gündür. Bu süreçte larvaların mortalitesi kapalı petek gözler içinde gerçekleşmiş olması dolayısıyla, işçi arıların ölen larvaları fark etmesi virülant genotiplerin neden olduğu mortaliteye göre geç olmaktadır [19, 36]. Bu gecikme *P. larvae*'nin spor formlarının petek gözler içinde artışına sebep olarak işçi arıların tüylerine bulaşan spor sayısını arttıracaktır [38, 53]. Bu yüzden *P. larvae*'nin kovan içindeki virülansı ile bireysel virülansı arasında ters korelasyon vardır [53]. Ayrıca ERIC III, ERIC IV ve ERIC V genotiplerinin hipervirülant olmasıyla çok kısa bir süre içinde koloni çöküşüne sebep olmaktadır. Bu yüzden bu hipervirülant genotipler geniş çevrelere yayılım gösteremezler ve arazi koşullarında görülme prevalansları düşüktür. Arazi koşullarından yaygın şekilde izole edilen ERIC I ve ERIC II genotiplerinin, enfeksiyon sürecinin uzun olması, ergin arıların daha yoğun *P. larvae* sporuyla temasına sebep olmaktadır. Bu durum ERIC I ve ERIC II genotiplerinin prevalansının artmasını sağlamaktadır [19, 25, 54].

2.3. *P. larvae*'nin Virülans Faktörleri

Patojen mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturma mekanizmasının anlaşılması profilaktik tedavi ve tedavi yöntemleri geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Enfeksiyon oluşumuna katkı sağlayan veya direkt virülans faktörü olan pek çok protein, enzim ve

sekonder metabolit sentezlenmektedir [54, 55]. Hem patojenlerin gen haritalarının çıkarılması hem de cinsler, suşlar, izolatlar ve genotipler arasında yapılan karşılaştırmalı genomik çalışmalar sentezlenen veya sentezlenme ihtimali bulunan moleküllerin enfeksiyon oluşumundaki görevleri hakkında önemli bilgiler vermektedir [55, 56]. Özellikle *P. larvae* gibi spesifik bir konağı bulunan patojenin, enfeksiyon oluşturma sırasında sentezlenen bileşiklerin yapısının, etki mekanizmasının ve üretildiği durumların anlaşılması bilimsel çalışmalara yön verilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bilimsel çalışmalarda kullanılan in vitro ve in vivo yöntemler arasındaki farklılıklar mevcuttur [41, 55, 56]. Yapılan çalışmalarda protein, enzim ve sekonder metabolitlerin sentezlendiği gen bölgeleri tespit edilmiş ve in vitro olarak üretimleri gözlenmiş olsa da in vivo koşullarda üretiminin olmayabileceği de gösterilmiştir. Bu açıdan yapılacak olan çalışmalar sadece genetik analizler ve in vitro çalışmalarla bırakılmamalıdır.

P. larvae'nin ürettiği tüm moleküller veya bu moleküllerin sentezlendiği gen bölgeleri özellikle *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinsleriyle homoloji göstermektedir. Bu yüzden *P. larvae*'nin sentezlediği moleküllerin yapısı ve sentezlendikleri gen bölgeleri üzerine karşılaştırmalı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *P. larvae*'nin ürettiği protein, enzim ve sekonder metabolitlerle ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalar henüz yeni olup, virülans mekanizmaları, quorum algılama (quorum sensing), genotipler arasındaki farklılıklar, enfeksiyon oluşturma mekanizmaları, karşılaştırmalı genom analizleri arazi şartlarında en çok izole edilen ERIC I ve ERIC II genotipleri üzerine yoğunlaşarak devam etmektedir [19, 36, 54, 55].

2.3.1. *P. larvae* Tarafından Sentezlenen Yüzey Proteini

2.3.1.1. S Tabakası Yüzey Proteini “SplA”:

S tabakası proteinleri, bakteri hücre yüzeyini tamamen kaplayan, alt birimlerden oluşan, düzlemsel, suda çözünmeyen kristal yapıdaki proteinlerdir [41, 57]. Bu proteinler pek çok türde bulunmaktadır ve işlevleri türlere hatta suşlara göre değişkenlik göstermektedir [43]. Yapılan in vivo çalışmalarda, bakteri büyüme fazının tüm evrelerinde hücre yüzeyini tamamen kapladığı rapor edilmektedir [57]. S tabakasının görevi bakterileri konağın savunma mekanizmasından ve çevresel faktörlerden korumaktır [57]. Ayrıca *Bacillus* ve *Lactobacillus* cinslerinde konak hücre yüzeyinin tanınması ve patojenin

hücreye adhezyonunda görev almakta, böylece önemli bir virülans faktörü olmaktadır [41, 57].

P. larvae ile yapılan çalışmalarda S tabakası yüzey proteini olan SplA, ERIC II ve ERIC V genotiplerinde tespit edilmiştir. ERIC I genotipinde SplA proteinini sentezleyen gen bölgesinde pencere kayması mutasyonu görülmektedir. ERIC III ve ERIC IV’de ise ayrıntılı bir çalışma yapılmamış olup yalnızca SplA veya başka bir S tabakası yüzey proteininin sentezlenmediği bilinmektedir [36, 54]. ERIC II ile yapılan çalışmalarda sentezlenen SplA’nın *Bacillus* cinsinde sentezlenen S tabakası ile homoloji gösterdiği bildirilmiştir [54, 57]. *P. larvae*’de SplA’nın bakterideki işlevi ve virülansa olan katkısının anlaşılması amacıyla, SplA proteinin üretildiği gen grubunun susturulduğu mutant suş ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Mutant suş ile yapılan çalışmalarda larva mortalitesinde önemli oranda düşüşler meydana gelmiştir. SplA proteini, larvanın orta bağırsak epitel hücrelerine *P. larvae*’nin penetrasyonunu sağlamaktadır. Bu yüzden virülansta kilit bir noktada bulunduğu kabul edilmektedir [54, 57]. Ek olarak mutant suşta koloni oluşumu ve hücre morfolojisinde farklılıklara sebep olmasıyla SplA’nın yalnızca virülansta değil hücre bütünlüğü açısından da önemli olduğu düşünülmektedir [54]. Her ne kadar SplA’nın mortalite oranlarının düşüşüyle ilgili olduğu düşünülse de Beims ve arkadaşlarının yaptığı karşılaştırmalı genotip çalışmalarda mortalite oranlarıyla arasındaki bu korelasyonun mortalite hızıyla ilgisi olmadığı kanıtlanmıştır [36].

S tabakası yüzey proteinlerinin yapısı, görevleri ve çalışma mekanizmasıyla ilgili bilgi eksikleri günümüzde de bulunmaktadır. *P. larvae*’nin SplA üretmeyen mutantlarının S tabakası proteinleri çalışmaları açısından model organizma olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir [54].

2.3.2. *P. larvae* Tarafından Sentezlenen Enzimler

2.3.2.1. Kitinaz “PICBP49”

Peritrofik matriks (PM) böceklerde orta bağırsak epitelini saran, kitin ve glikoprotein yapıdan oluşan bir bariyerdir. Bu bariyerin görevi bal arılarını mekanik bariyer oluşturarak, ksenabiyotiklerden (ilaç ve zehir gib), aşındırıcı gıda maddelerinden ve patojenlerden korumaktır [58]. Bal arısı laralarında PM’in larval dönemin en erken

evrelerinde (yumurta atıldıktan 8 saat sonra) bile varlığı gösterilmiştir. Larval gelişimle birlikte PM'in kalınlığı artmaktadır [19, 58].

Sindirim sistemini enfekte eden entomopatojenlerin öncelikle PM'i degrade etmesi gerekmektedir. Patojen mikroorganizmalar bu bariyerin degradasyonunu sentezledikleri kitinaz ve proteazlarla gerçekleştirmektedirler [19, 55]. *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinslerinde çok çeşitli kitinaz enzimleri sentezlenmektedir. *P. larvae*'de kitinaz sentezi için sınırlı gen bölgesi bulunmaktadır [58, 59]. Bu gen bölgesinden sentezlenen PICBP49 adlı kitinaz *P. larvae*'nin tüm genotiplerinde ortak olarak sentezlenmektedir [36]. PICBP49 enziminin salgılanmasının engellendiği mutant suşlarla yapılan çalışmalarda PM'in zarar görmediği ortaya çıkmıştır [58, 59]. Bu durum PICBP49'un *P. larvae*'nin enfeksiyon oluşturma mekanizmasındaki kritik moleküllerden bir tanesi olduğunu kanıtlamaktadır. Böylelikle kitinaz inhibitörlerinin *P. larvae* mücadelesinde kullanılabileceği bilgisi de elde edilmiştir [59].

2.3.2.2. Proteaz

Proteazlar mikroorganizmalarda proteinlerin degradasyonundan sorumlu olan ve önemli virülans faktörlerinden biri olarak tanımlanan enzimlerdir. Proteazlar *P. larvae*'nin virülansında etkisi olduğu düşünülen ve üzerine çalışmalar yapılan ilk moleküllerdir. *P. larvae*'de sentezlenen proteazlar, katalitik mekanizması metal içeren metalloproteazlardır [60]. *P. larvae*'de metalloproteaz sentezinin gerçekleşeceği 100'den fazla gen bölgesi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda kollajenaz aktiviteye sahip ve immün yanıtı baskılamasıyla bilinen metalloproteazlar öne çıkmaktadır. Kollajenaz aktiviteye sahip metalloproteazlar (CoIA), PM'i ve hücreler arası bağlantıları tahrip etmede görev almaktadır [61]. Ayrıca vejetatif çoğalma sırasında CoIA sentezinin arttığı ve sporulasyon sırasında sentezin azalarak üretilen CoIA'nın spor üzerine veriliyor olması da virülansda önemli bir faktör olduğunu göstermektedir [35, 62]. İmmün sistemi baskılayıcı özelliğe sahip immün inhibitör A metalloproteazlar (InhA) ise, larvalarda bağışıklık sisteminde görevli olan antimikrobiyal peptitleri (AMP) degrade ederek, larvarın verdiği immün yanıtı baskılamaktadır [35, 61]. CoIA ve InhA sentezini gerçekleştiren gen bölgeleri ERIC II, ERIC III ve ERIC IV'de bulunmakta fakat ERIC I'de gözlenmemektedir [61]. ERIC V genotipinde CoIA ve InhA ile ilgili henüz bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca metalloproteazların bir başka etkinliği de larva ölümü

gerçekleştikten sonra diğer enzimler ve sekonder metabolitlerle birlikte larva degradesyonunu gerçekleştirmektedir [63].

2.3.2.3. Enolaz

Enolazlar glikolitik yolda yer alan sitosolik enzimlerdir. *Bacillus* cinsindeki mikroorganizmalarla yapılan araştırmalarda, glikolitik yolda rol almalarının yanında hücre yüzeyinden sentezlendiklerinde konak hücrede toksik etki yarattıkları bildirilmiştir. Bu özelliğin keşfedilmesiyle birlikte, enolazların aynı zamanda virülans faktörü oldukları ortaya çıkmıştır [61, 64]. *P. larvae*'nin bütün genotiplerinde enolaz sentezi gerçekleşmektedir fakat ERIC V genotipinde herhangi bir inceleme henüz yapılmamıştır [61]. *P. larvae* ile yapılan in vivo çalışmalarda spor yüzeyinde yoğun miktarda üretilen enolazların enfeksiyon oluşumu sırasında da sentezlendiği kanıtlanmıştır. Böylece *P. larvae*'de de enolaz enziminin önemli bir virülans faktörü olduğu bildirilmiştir [50]. Enolazların arılar için toksik ve immünojenik olduğu rapor edilmektedir. Yapılan toksisite çalışmalarında minimum doz olarak kullanılan 5 mikrogramın bile toksik ettiği ortaya çıkmıştır [64]. Proteinlerin parçalanmasında da görev aldığı bilinen enolaz enziminin proteolitik aktiveyi tetiklediği rapor edilmektedir. In vivo çalışmalarda enolazların larvada tepkisel olarak abaeccin sentezini arttırdığı gözlenmiştir [50, 64].

2.3.3. *P. larvae* Tarafından Sentezlenen Sekonder Metabolitler

P. larvae'de sekonder metabolitler genellikle Ribozomal Olmayan Peptid Sentezaz (Non-ribosomal peptide synthetase- NRPS) ve Poliketid Sentezaz (Polyketide Synthetase- PKS) adı verilen multienzimler tarafından sentezlenmektedir [55, 65]. NRPS ve PKS enzimleri trimodüler gen kümelerine sahiptirler. Söz konusu gen kümeleri diğer bakterilerde bulunan NRPS ve PKS gen kümeleriyle düşük benzerlik göstermesi dolayısıyla birçok keşfedilmemiş farklı sekonder metabolitler üretebileceği ihtimalini de beraberinde getirmektedir [36, 54, 55]. NRPS ve PKS multienzimleri *P. larvae*'nin tüm genotiplerinde bulunmaktadır [36].

P. larvae'de salgılanan sekonder metabolitleri antimikrobiyal moleküller ve toksinler olmak üzere iki grupta inceleyebiliriz.

2.3.3.1. Antimikrobiyal Moleküller;

2.3.3.1.1. Bacillibactin

Bacillibactin Gr (+) bakterilerde, özellikle *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinslerinde sentezi yaygın olarak görülen, siderofor özellik taşıyan sekonder metabolittir [55, 65]. Siderofor özellik, bakteriler için sınırlayıcı mikronütrient olan ve doğada oksitlenmediği için ferrik (Fe^{+3}) formdaki demirin hücre içine alınmasını sağlayan bileşiklere ait özelliktir [65]. Üretilen siderofor bileşikler hücre dışına salınarak demirin çözünmesini gerçekleştirir. Ardından çözünen demir bakteri hücrelerine aktif taşıma yoluyla alınır [66]. Ergin arılarda demirin hücre içine alınması 2. ve 4. larval dönemden itibaren sentezlenmeye başlanan transferrin sayesinde başladığından böyle bir problemle karşılaşılmamaktadır [65]. Larvanın *P. larvae* ile enfeksiyon sürecinde ise bacillibactin *P. larvae*'nin demirden yararlanımını sağlayan başlıca sekonder metabolittir. *P. larvae*'nin tüm genotiplerinde siderofor bileşik olarak NRPS multienziminden bacillibactin sentezlenmektedir [36, 55]. Larva öldükten sonra bacillibactin maksimuma ulaşmaktadır [19, 55]. Bacillibactin ile yapılan in vitro çalışmalarda, *P. larvae*'de bacillibactin sentezinin gerçekleşmemesi diğer bileşiklere kıyasla bacillibactinin daha geç keşfedilmesine sebep olmuştur [65]. Başka bir çalışmada ise bacillibactin sentezinin engellendiği mutant suşlar kullanılmış ve enfeksiyonun ilerleyişinde, larvaların mortalite sürelerinde veya oranlarında bir değişim olmadığını gösterilmiştir [19, 55, 65]. Bu yüzden çalışmalarda bacillibactinin bir virülans faktörü olmadığı fakat *P. larvae*'nin gelişimi açısından önemli bir noktada bulunduğu vurgulanmaktadır [65].

2.3.3.1.2. Paenilarvin

Paenilarvin itürin lipopeptitleri ailesinde yer alan sekonder bir metabolittir. İtürin ailesi lipopeptitlerinin sitotoksik ve antifungal etkinlikleri yüksek, antibakteriyel etkinlikleri ise çok düşüktür veya yoktur [55]. Paenilarvin yalnızca *P. larvae*'de sentezlenen sekonder bir metabolit olup; Paenilarvin A, Paenilarvin B ve Paenilarvin C olmak üzere 3 farklı türü bulunmaktadır. Bunlar arasında Paenilarvin A ve Paenilarvin B daha sıklıkla izole edilmektedir [63]. *P. larvae*'nin tüm genotiplerinde paenilarvinin sentezleneceği gen bölgeleri bulunsa da, yalnızca ERIC II genotipinde paenilarvin sentezi gerçekleşmektedir [36, 55, 63, 65].

Paenilarvin gösterdiği antifungal etkiyle *P. larvae*'nin kovan ve larva mikrobiyotasında yer alan fungal aktivite ile rekabetinde avantaj sağlamaktadır. Bu etkisinin yanında paenilarvin, diğer tüm antibiyotiklerde olduğu gibi inhibitör olmayan konsantrasyonlarda sentezlediğinde bakterilerde; quorum algılama (quorum sensing), transkripsiyon, translasyon, ekzoproteinlerin transportu, stres tepkisi, biofilm oluşumu, virülans faktörlerinin salgılanması gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesini sağlamaktadır [63]. Paenilarvinin bilinen bir diğer özelliği de sitotoksik olmasıdır. Bu amaçla larvalar üzerinde paenilarvinin toksik etkisi çalışılmıştır. Paenilarvin A'ya maruz bırakılan larvalarda kontrol grubuna göre %25 daha fazla mortalite gözleendiği ve paenilarvin B'ye maruz bırakılan larvalarda ise kontrol grubuna göre %35 daha fazla mortalite gösterdiği bildirilmiştir [55].

2.3.3.1.3. Sevadycin

Sevadycin tripeptit yapısında, *P. larvae*'de genetik, moleküler ve fonksiyonel olarak tanımlanan ilk antibiyotiktir [59, 67]. Sevadycin bir antibiyotik yapısında olmasına rağmen antimikrobiyal etkinliğinin düşük olduğu ve mikrobiyotayla olan rekabette etkili rol almadığı bildirilmiştir [55, 68]. Yapılan çalışmalarda sevadycinin antibiyotik özelliğinden daha çok virülans faktörlerinin sentezlenmesinde ve metabolik değişimlerde düzenleyici olarak görev aldığı ön görülmektedir [55]. Sevadycin ERIC II genotipinde sentezlenmesine rağmen ERIC I gen bölgesinde gerçekleşen transpozonla susturulması sebebiyle sentezlenmediği görülmektedir [36]. Sevadycinin ERIC I'de sentezlenmemesine karşın ERIC II'de sentezlenmesi sebebiyle, iki genotipin enfeksiyon hızlarındaki farkı oluşturan etkenlerden biri olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. Fakat Beims ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada, enfeksiyonun en hızlı gerçekleştiği ERIC III ve ERIC IV genotiplerinde sevadycin sentezinin gerçekleştiği gen bölgeleri bulunamamıştır. Bu yüzden sevadycin ile enfeksiyon hızı arasında bir bağlantı olmadığı sonucuna varılmıştır [36].

2.3.3.1.4. Paenilamicin

Paenilamicin düzlemsel, katyonik aminopoliol peptit antibiyotik yapısındadır. Diğer sekonder metabolitlerden farklı olarak NRPS ve PKS mutlienzimlerinin gen bölgelerinin hibridinden sentezlenen bir metabolittir [69]. Paenilamicin A1, Paenilamicin A2, Panilamicin B1 ve Paenilamicin B2 olmak üzere 4 farklı türevi bulunmaktadır [55]. *P.*

larvae'nin tüm genotiplerinde paenilamicin sentezini gerçekleştirecek gen bölgeleri bulunmaktadır [36]. Paenilamicin çalışmaları arazi koşullarından en sık izole edilen ERIC I ve ERIC II genotipleriyle yapılmıştır. Antibakteriyel, antifungal ve sitotoksik etkisi bulunmaktadır. Özellikle antibakteriyel etkinliği oldukça yüksektir ve genel olarak Gram (+) bakterilere karşı etkilidir. Gerçekleştirilen antimikrobiyal çalışmalar doğrultusunda paenilamicin, enfeksiyonun ilk aşamasında *P. larvae*'nin mikrobiyotayla olan rekabetini sağlamaktadır [55, 67, 69]. Arı ve kovan mikrobiyotasında bulunan bakterilere (*Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*) ve funguslara (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Fusarium oxysporum*) karşı etkinliği kanıtlanmıştır [34, 67]. Örneğin, *P. alvei* ve paenilamicin sentezinin engellendiği mutant *P. larvae* suşu ile ko-enfekte edilen larvalarla yapılan çalışmada, *P. alvei*'nin %62 oranında hayatta kaldığı rapor edilmiştir [55]. Paenilamicinin antimikrobiyal etkisine ek olarak sitotoksik etkisinin olduğu da düşünülmektedir. Sitotoksik etkinin araştırılması amacıyla Lepidoptera takımının hücre hattıyla çalışmalar yapılmıştır. Arı larvalarıyla yapılan çalışmalarda ise in vitroda sitotoksik etki gözlenirken in vivo çalışmalarda aynı etki gözlenmemiştir [67]. Ancak *P. larvae*'nin paenilamicin sentezinin engellendiği mutantlarla yapılan çalışmada larvaların mortalite sürelerinde önemli farklar meydana gelmiştir. Mutant suşlarla enfekte edilen larvaların mortalite süresi 12 günken, paenilamicin sentezi gerçekleştiren suşun mortalite süresinin 8 gün olduğu rapor edilmiştir. Ancak, mutant suşların larvalarda germinasyonunda, çoğalmasında ve enfeksiyon oluşumunda herhangi bir fark gözlenmemiştir [67, 69].

Paenilamicin sentezinde görevli olan gen kümesine Pam adı verilmektedir ve bu gen kümesinde paenilamicine farklı özellikler kazandıran pek çok gen bulunmaktadır. Bu genler arasından pamZ geni, bir bakteriye antibiyotik direnç kazandıracak N-asetilasyon işleminin gerçekleşmesinde görevli olan N-asetiltransferaz enziminin sentezlenmesinde görevlidir [55, 69]. N-asetilasyon işlemiyle, *P. larvae*'den salgılandıktan sonra tekrar *P. larvae*'ye alınan paenilamicin inhibe edilmektedir. Bu gen gösterdiği aktiviteyle *P. larvae*'ye kendine direnç (self-resistance) özelliği kazandırmaktadır. Oluşan kendine direnç adaptasyona bağlı olmayan bir özelliktir ve bakteriyi kendi antimikrobiyal metabolitinden korumasıyla larva mikrobiyotasıyla olan rekabetinde büyük avantaj sağlamaktadır [69].

2.3.3.2. Toksinler

Toksinler, bakterilerin konak hücreyi enfekte etmek için kullandıkları önemli virülans faktörlerinden biridir. *P. larvae*'nin sentezlediği toksinler AB toksin familyasına aittir. AB toksinleri ekzotoksinlerdir, A ve B adı verilen iki alt birimden oluşmaktadır. Alt birimler birbirine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. B alt ünitesi konak hücrenin reseptörüne bağlanırken, A alt ünitesi enzimatik aktivite göstererek hücrede toksik etkinin oluşmasını sağlamaktadır [19]. Toksinler gösterdikleri enzimatik aktiviteye göre de alt gruplara ayrılmaktadır. Bu enzimatik aktivitelerden biri, NAD⁺'dan türetilen ADP-ribozun hücre içi alıcı moleküllere kovalent konjugasyonudur. ADP ribosilasyonu mono-ADP-riboztransferaz enzimiyle gerçekleşmekte ve konak hücrede işlev kaybına sebep olmaktadır. Bu şekilde işlev gösteren AB alt grubu toksinlerine mono-ADP-riboztransferaz toksini (ART) adı verilmektedir. ART toksinleri konak hücrede apoptozu tetiklemektedir [19, 55]. *P. larvae* tarafından üretilen toksinler, ART toksini şeklinde işlev göstermektedir [70]. Toksinler *P. larvae*'nin enfeksiyon aşamasında epitel hücrelerin enfekte edilmesi, ardından hemosöle geçişi sırasında oldukça önemli bir noktada bulunmaktadır. *P. larvae* toksinleri, arazi koşullarından en sık izole edilen ERIC I ve ERIC II genotiplerinde çalışılmıştır. Genotipler arasında farklı toksinlerin üretildiği fakat tüm genotiplerde toksin üretiminin olduğu da vurgulanmaktadır [36]. Genotipler üzerinde yapılan ayrıntılı çalışmalarla toksin sentezinin gerçekleşebileceği pek çok gen bölgesinin bulunduğu fakat henüz sentezlenmeyen toksinler bulunduğu bildirilmiştir [39]. Aşağıda *P. larvae*'nin moleküler olarak tanımlanan ve fonksiyonel işlevi tanımlanmış toksinlerinden bahsedilmiştir.

2.3.3.2.1. Plx1

Plx1 AB toksin ailesi, ART toksini alt grubunda yer almakta ve 975 amino asitten oluşmaktadır. Yapılan genomik araştırmalarda faj kökenli bir toksin olduğu bildirilmiştir [55, 56]. Plx1 toksini Lepidoptera takımında, Pieridae, familyasında yer alan kelebeklerde üretilen pierisin toksiniyle homoloji göstermektedir. Plx1 toksini ERIC I, ERIC III ve ERIC IV genotiplerinde sentezlenmektedir [36, 71]. ERIC I'in virülansındaki önemli toksinlerden biridir ve etkinliği kanıtlanmıştır. Toksinin kimyasal yapısı incelendiğinde konak hücrede DNA'yı hedefleyebileceği gösterilmekte fakat deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [54]. Plx1'in B alt ünitesinin görevi karbonhidratı bağlayarak larvanın orta bağırsak epitelindeki glikoprotein ve glikolipitleri tahrip ederek toksinin

hücreye girişini sağlamaktadır. Plx1 toksinin enfeksiyon sırasında çalışma mekanizmasının detaylı analizleri için in vivo ve in vitro çalışmalar devam etmektedir [19, 56].

2.3.3.2.2. Plx2

Plx2 AB toksin ailesi ART toksinleri alt grubunda yer almaktadır. Aynı zamanda *P. larvae*'ye ait başka bir toksin olan C3 toksinlerinin benzerleri olarak da tanımlanmaktadır [56]. Farklı gen bölgeleri tarafından kodlanan 2 alt birimden (Plx2A ve Plx2B) oluşmaktadır. Plx2A alt birimi katalik olarak aktiftir. Plx2B alt birimi ise Plx2A'nın konak hücreye bağlayarak toksinin hücre içine alınmasını sağlamaktadır [54, 72](ebeling 2019 c3larv, ebeling 2021). Plx2A toksin özelliğini hücrenin sitokinezden sorumlu aktin modellemesinde kullanılan RhoA (küçük GTPaz proteini) birimleri üzerinde göstermektedir. RhoA'nın hücredeki etkinliklerine bakılarak Plx2'nin 2 şekilde toksik etki gösterebileceği tahmin edilmektedir. Bu etkilerden ilki hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alan intraselüler sisteme etki edip hücre iskeletinin depolimerizasyona uğratmasıyla konak hücrenin hücre bütünlüğüne zarar vermesidir. Bu etki *P. larvae* ile enfekte olan orta bağırsak epitel hücrelerinde görülen bir durumdur [19, 56, 70]. İkinci etki ise; Plx2'nin RhoA birimlerine zarar vererek larval immün yanıtı baskılamasıdır [54]. Yapılan in vivo çalışmalarda Plx2'nin alt birimlerinin sentezlendiği gen bölgelerinin ayrı ayrı ve birlikte susturulduğu mutantlarla yapılan çalışmada mortalite oranlarında azalmalar gözlenmiştir. Ayrıca Plx2B alt ünitesinin sentezinin engellenmesi Plx2A'nın sentezlenmesini de engellemiştir. Ancak Plx2 toksinin sentezlenmesinin engellenmesiyle meydana gelen mortalite oranlarında azalmalar görülse de mortalite engellenememiştir. Bu yüzden Plx2'nin enfeksiyonun gerçekleşmesinde kilit rol oynamamasına rağmen virülans bir faktör olduğu düşünülmektedir [19, 56, 70].

P. larvae'nin tüm genotiplerinde Plx2'nin sentezini gerçekleştirecek gen bölgeleri bulunmaktadır [36].

2.3.3.2.3. Plx3, Plx4 ve Plx5

P. larvae genotipleri üzerinde yapılan genomik çalışmalarda Plx3, Plx4 ve Plx5 sentezini gerçekleştirecek gen lokusları tespit edilmiştir. Plx3'ün Plx1 ile, Plx4 ve Plx5'in ise Plx2

ile homoloji gösterdiği bildirilmiştir. Fakat henüz in vitro veya in vivo deneylerde bu toksinlerin sentezlendiği gözlenmemiştir [54].

2.3.2.2.4. C3larvin

C3larvin tek zincirli, AB toksinleri ailesinde ART toksinleri alt grubunda yer almaktadır. Yapısal olarak Plx2 toksiniyle benzerlik göstermektedir. *P. larvae*'de tanımlanan ve karakterizasyonu gerçekleştirilen ilk toksindir. Alt birimleri farklı gen bölgeleri tarafından kodlanan 2 alt birimden (C3larvinA ve C3larvinB) oluşmaktadır [54, 70]. C3larvinin moleküler yapısı incelendiğinde toksinlerde hücreye girişin sağlandığı N-terminal ucunun sekansının bulunmadığı rapor edilmiştir. Bu durum C3larvinin virülant olarak aktivitesi konusunda soru işaretleri oluşmasına sebep olmuştur [72]. *P. larvae*'nin tüm genotiplerinde C3larvin sentezi gerçekleşmektedir. Ancak bazı in vivo çalışmalarda genotipe bağlı olmaksızın sentezin gerçekleşmediği durumlar meydana gelmiştir [54]. Bu sebeple, C3larvinin sentezinin hangi durumlarda tetiklendiği henüz keşfedilememiştir. C3larvinin iki alt biriminin sırasıyla sentezinin susturulduğu mutantlarda C3larvin A'nın mortalitede etkili olmadığı fakat C3larvinB'nin larva mortalitelerinde azalışa sebep olduğu gösterilmektedir [54, 70].

2.4. *P. larvae*'nin Enfeksiyon Oluşturma Mekanizması

P. larvae bal arılarının larval dönemdeki olgunluğuna bağlı olarak enfeksiyon oluşturmaktadır [10]. Larvaların *P. larvae*'ye karşı en hassas oldukları dönem, yumurta atıldıktan sonra gelişimlerinin ilk 24-48. saat aralığını temsil eden birincil larva evresidir. Bu evrede yalnızca 10 tane *P. larvae* sporunun bile enfeksiyon oluşturabildiği gözlenmektedir [35, 52]. Larvanın geçirdiği metamorfozla birlikte sindirim sisteminde meydana gelen değişimlerle enfeksiyon oluşturabilecek minimum spor miktarı artmaktadır [52, 73]. Larvaların *P. larvae* ile 14. Günden sonra enfekte olma olasılığı en düşük seviyededir. 14. gün itibarıyla meydana gelen metamorfoz hazırlıkları ve ergin arılarda metamorfozun tamamlanmasıyla birlikte enfeksiyon oluşumu engellenmektedir [35].

Enfeksiyon süreci vektör ergin arıların *P. larvae* sporlarını larvalara aktarmasıyla başlamaktadır. Germinasyonu için uygun koşullara ulaşan *P. larvae*, enfeksiyon oluşturmaya başlamadan önce kommensal bir bakteri gibi davranarak ortamda bulunan

zengin besinsel içeriğe ortak olmaktadır [35, 52, 74]. Aynı zamanda orta bağırsak lümenine kolonize olabilmek için kovan ve larva mikrobiyotasında bulunan diğer mikroorganizmalarla rekabete girmektedir [19, 25, 67]. *P. larvae* bu rekabeti paenilamicin, sevadicin (ERIC II), bacillibactin, paenilarvin (ERIC II) ve itürinler gibi sekonder metabolitler ile gerçekleştirmektedir [25, 39]. Ortamda baskın mikroorganizma konumuna geçen *P. larvae* kritik eşiğe ulaşana kadar orta bağırsak lümeninde hızla çoğalmaya devam eder. Ardından *P. larvae*, larvanın hemosölüne ulaşabilmek için önce PM'e saldırır [25, 39, 52]. PM degradasyonunda PICBP49 kitinaz (tüm genotiplerde ortak) ve CoIA (ERIC I hariç tüm genotipler) enzimi salgılanmaktadır. PM'in degradasyonunun ardından ERIC I ve ERIC II'nin orta bağırsak epiteline invazyonunun farklı şekillerde olduğu ve ardından hemosöle geçişin paraselüler yol ile gerçekleştiği rapor edilmektedir [19]. Her iki genotipte de orta bağırsak epiteline gerçekleştirilen atakta ortak olarak C3larvin toksini ve paenilamicin görev almaktadır [60, 70]. ERIC I'in orta bağırsak epiteline invazyonu ve ardından hemosöle geçişi, kendine özgü salgıladığı Plx1, Plx2 toksinleri ve metalloproteaz enzimleriyle gerçekleşmektedir [19]. ERIC II'de ise invazyonu esas olarak SplA yüzey proteini gerçekleştirmektedir [57]. SplA proteinine ek olarak paenilarvin de orta bağırsak hücre epiteline toksik etki göstererek invazyonu kolaylaştırmaktadır [74]. Larvalarda mortalite *P. larvae*'nin hemosöle geçtiği anda görülmektedir [25, 39]. Ölüm ve çürümenin başlamasıyla *P. larvae*'de bacillibactin sentezi başlamaktadır. Bacillibactin, larvanın çürümesine katkıda bulunmakta, ayrıca çürümeyi gerçekleştiren saprofitlerle rekabeti sağlamak ve larvada bulunan demirin *P. larvae*'ye alınmasında görev almaktadır [54]. *P. larvae*'nin yeniden spor forma dönüşmesi, larvanın ölmesiyle birlikte hızlanmaya başlamaktadır. Yapılan çalışmalarla enfeksiyonun tüm aşamalarında *P. larvae*'nin hem spor hem vejetatif formunun görüldüğü ancak hastalığın bulunduğu evreye göre formların yoğunluğunun değiştiği rapor edilmektedir [19, 52, 75].

P. larvae ile enfekte olan larvalarda enfeksiyon mekanizmasına karşı oluşturulan immün tepki hemen etkisini göstermektedir. Enfekte olan larvalar toll reseptörlerini, antimikrobiyal peptit üretimini ve lizozim salgılamasını tetikleyen genleri aktive etmektedir. Abaecin, Hymenoptacin gibi önemli AMP sentezlerinde artışlar da gözlenmektedir [51]. Fakat *P. larvae* tarafından sentezlenen proteaz türevlerinin AMP'yi inhibe etmektedir [61, 76]. İmmün sistemin bu kadar aktive olması larvanın enerji tüketiminin de artmasına sebep olmaktadır. Bu durum larvanın *P. larvae* ile mücadelesine

olumsuz etki etmektedir [51]. Dolayısıyla *P. larvae* ile enfekte olan larvaların hastalığı atlatabildiği henüz rapor edilmemiştir [49, 77]. Bu durum *P. larvae*'nin larvanın immün sistemine karşı geliştirdiği başarıyı göstermekte ve *P. larvae* ile olan mücadelede larvaya desteğin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

2.5. *P. larvae* Enfeksiyonunda Ortaya Çıkan Klinik Belirtiler

Klinik belirtiler larvaların ölümünün ardından çürümesiyle birlikte ortaya çıkmaktadır. AYÇ ile enfekte olan kolonilerde larvalar ortalama 8 gün içerisinde ölmektedir. Bu zaman aralığında petek gözler kapanmakta ve ölüm genellikle petek gözler kapandığında gerçekleşmektedir [26]. Larvalar öldüğünde petek gözlerin kapalı olması, hastalığın geç tespit edilmesine sebep olmaktadır. Kapalı petek gözlerde ölen larvaların çürümesine bağlı olarak ortaya çıkan kötü koku, arıcılar tarafından fark edilen en tipik belirtidir [37]. Yavrulu petekler kontrol edildiğinde; düzensiz, koyulaşmış ve ergin arıların kapalı petek gözlerini işaretlediği bir petek yüzeyi ile karşılaşmaktadır. Bu işaret ergin arılar tarafından petek gözün yüzeyine bir çentik-delik bırakılarak konulmaktadır [78]. Larvalar kapalı petek gözler içerisinde çürüdüğünde yapışkanimsi ve koyu kahverengi hale dönüşmektedir. Petek göze bir kibrit çöpü ya da kürdan batırıldığında çürüyen larvanın sünenek uzaması diğer bir belirtidir [78]. Ancak klinik belirti olarak gözlemlenen kötü koku ve larvadaki sünenme-uzama tamamen saprofit bakterilerin gerçekleştirdiği reaksiyon sonucunda oluşan çürümeyle ilişkilidir. Gözlemlenen çürümenin her 3 yavru çürüklüğünde de hastalık etkeni bakterilerle bağlantısı bulunmadığından yavru çürüklüklerinin tüm çeşitlerinde klinik belirtiler aynıdır. Geçmiş yıllarda rapor edilen çürüme kokusu farklılığı, larvanın ölüm zamanına bağlı olarak petek gözlerin açık/kapalı olması, çürüyen larvada görülen uzamanın boyu ya da petek görünümdeki (kuruluk) farklılıklar gibi kriterler geçerliliklerini yitirmiştir [19]. Bunun için yavru çürüklüğü etkeninin tespiti amacıyla mutlaka laboratuvar analizlerinin yapılması gerekmektedir [15, 38, 79, 80].

Klinik belirtilerin ortaya çıkması ile koloni içindeki spor yoğunluğu arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Koloni direnci yüksek olan ve spor yoğunluğu düşük olan kolonilerde AYÇ klinik belirti göstermeden senelerce varlığını sürdürebilmektedir [81, 82].

2.6. *P. larvae*'nin Yayılım Şekilleri

Bal arıları gibi sosyal yaşam sürdüren ve koloni halinde yaşayan böceklerde patojenlerin yayılması horizontal (aynı nesildeki bireyler arasında) ve vertikal (gelecek nesildeki bireylere aktarım) yayılımla; koloni içi ve koloniler arasında gerçekleşmektedir [46, 80, 83]. AYC'de en sık görülen yayılım şekli ergin arıların mekanik vektör rolünü üstlendiği horizontal yayılımdır [82].

Koloni içindeki horizontal yayılım, ergin arıların işaretlenmiş petek gözlerden çürümüş larvaları kovan dışına atmak için çıkarması sırasında tüylerinin *P. larvae* sporlarıyla kontamine olmasıyla başlamaktadır. Ardından petek gözleri temizlemesi ve diğer larvaları beslemesi sırasında larvalara; tımar davranışıyla da diğer ergin arılara sporları bulaştırmasıyla gerçekleşmektedir [34]. Ayrıca koloninin hijyenik davranış duyarlılığı hastalığın yayılımını hızlandırmaktadır. Çünkü hijyenik davranışa bağlı olarak işaretlenen gözlerden larvaların temizlenmesi faaliyeti arttıkça sporlarla kontaminasyon oranı da artış göstermektedir [53, 82].

Horizontal yayılımın koloniler arasındaki şekli ise sporları taşıyan ergin arıların; yağmacılık ve kovan şaşırma (drifting) davranışı ile başka kolonilere gitmesi, tarlacı arıların çiçek üzerinde birbirleriyle temasta bulunması, kontamine olmuş arıcılık ekipmanlarının kullanılması ve yanlış arıcılık uygulamalarıyla gerçekleşmektedir. Koloniler arasındaki *P. larvae* spor aktarımının en yoğun şekilde 1 km'lik alanda olduğu rapor edilmektedir [21, 46, 79, 80]. *P. larvae* spor yayılımında kovan şaşırma davranışı ve tarlacı arıların çiçek üzerindeki temasları etkinliği en az olan yayılım yoludur [84]. Hastalığın yayılmasında bir diğer önemli etken ise arıcılık uygulamalarıdır. Hijyenik arıcılık kurallarına uyulmaması, kovanlar arasında çerçeve değişimi yapılması, önceden hastalığın görüldüğü kovanlardan elde edilen balın başka kovanlara besleme balı olarak verilmesi gibi uygulamalar arıcılar aracılığıyla *P. larvae* sporlarının yayılmasını sağlamaktadır [35, 46, 79]. Hastalığın ülkeler içinde ve ülkeler arası yayılımı ise bal ve arı ticaretiyle gerçekleşmektedir. Özellikle son yıllarda yaygınlaşan paket arıcılıkta sadece AYC'de vektör rolünü üstlenen ergin arıların kullanılması hastalığın fark edilmeksizin yayılımını sağlamaktadır [79, 85]. Bal ithalat ve ihracatında özellikle kontamine olmuş balların kullanılmaya devam edilmesi hastalık açısından çevresel bir kaynak görevini görmektedir [35, 79, 86].

Koloniler arasında vertikal yayılım ise oğul verme yoluyla gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda oğul vermenin vertikal bir yayılım şekli mi yoksa hastalığın tedavisinde bir yaklaşım mı olduğu üzerine çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir [46, 83]. Fries ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada henüz klinik belirti göstermeyen fakat ergin arılarda düşük miktarda (arı başına 20 spor) *P. larvae* sporlarına rastlanan kolonilerin, oğul verdiği oğul kolonideki spor sayısının 2 ay içerisinde ergin arılarda azaldığı ayrıca 13 ay boyunca yavrulu peteklerde hastalığın görülmediği ortaya çıkmıştır. Yine aynı çalışmada klinik belirti görülen, ergin arılarda yoğun miktarda (arı başına 6.000) *P. larvae* sporu bulunduran ve oğul veren kolonilerde ise başta spor yoğunluğunun azaldığı fakat 13 hafta içinde *P. larvae* spor sayısında yeniden artış gözlemlendiği ve yavrulu peteklerde enfeksiyonun gelişmeye başladığı gözlenmiştir [83]. Ayrıca oğul vermeye benzer bir yöntem olarak geliştirilen silkme metodunda da kolonilerdeki spor yoğunluğunun azaldığı ve iyileşme görüldüğü rapor edilmiştir [85, 87]. Bu çelişkili konu hala araştırılmaya devam edilmekte ve oğul vermenin vertikal bir yayılım şekli mi yoksa hastalığın tedavisinde bir yaklaşım mı olduğu üzerine çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.

P. larvae'nin yayılım şekillerini anlamak hastalıkla mücadelede ve etkin bir tedavi yönteminin geliştirilebilmesi açısından son derece önemlidir.

2.7. *P. larvae*'ye Karşı Geliştirilen Mücadele Yöntemleri

Mücadelesi en zor bakteriyel enfeksiyon etkenlerden biri olan *P. larvae*'nin sebep olduğu AYÇ hastalığı arıcılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. *P. larvae* ile mücadelede pek çok zorlayıcı parametre bulunmaktadır. Sahada *P. larvae* ile mücadeleyi zorlayıcı ve geciktirici birçok etken bulunmaktadır. *P. larvae*'nin spor formu olan bir bakteri olması, ergin arıların taşıyıcı ve asemptomatik olması, enfeksiyonun arıcılar tarafından geç fark edilmesi, hastalığın çoğunlukla kapalı petek gözlerde ilerlemesi hastalıkla mücadelenin geç başlamasına ve etkisinin azalmasına sebep olmaktadır [19, 25, 26]. Ayrıca uygulanacak mücadele yönteminin arılarda toksik etki oluşturmaması ve arı ürünlerinde kalıntı bırakmamasının yanında arıcılar tarafından kolay uygulanabilir ve ekonomik olması da gerekmektedir. *P. larvae*'ye karşı denenmiş

pek çok mücadele yöntemi olsa da henüz etkin bir mücadele yöntemi keşfedilememiştir [26, 54, 75].

Şimdiye dek *P. larvae*'ye karşı geliştirilen mücadele yöntemleri; mekanik yöntemler, antibiyotikler, doğal içerikli ürünler, biyokontrol başlıkları altında incelenebilir.

2.7.1. *P. larvae* ile Mücadelede Mekanik Yöntemler

2.7.1.1. Yakma Yöntemi (Eradikasyon)

Yakma yöntemi, *P. larvae* ile enfekte olduğu kesinleşmiş kovanların bütün içeriğiyle birlikte yakılarak ardından gömülmesi işlemidir [87]. Kovanları bütün içeriğiyle birlikte yakılması, bir mücadele yönteminden çok, *P. larvae*'nin eradikasyon yoluyla imha edilmesi ve böylelikle hastalığın yayılmasının önüne geçilmesidir. Günümüzde Türkiye'nin de dahil olduğu pek çok ülkede yakma yönteminin, *P. larvae* ile enfekte olduğu kesinleşen kovanlara yasal olarak uygulanması zorunlu bir yöntemdir. Bu yöntem arıcılar açısından ekonomik olarak oldukça zorlayıcıdır. Çünkü yakma yönteminin arıcılarda oluşturacağı ekonomik zarar için herhangi bir tazminat uygulaması bulunmamaktadır [24, 33, 88]. Ayrıca arının kutsallığı gibi kültürel ve sosyolojik faktörlerde yakma yönteminin uygulanmasını sınırlamaktadır.

2.7.1.2. Silkme Yöntemi

Silkme yöntemi, *P. larvae* ile enfekte olan kolonilerde, yalnızca kraliçe ve ergin arıların yeni, temizlenmiş bir kovana aktarılmasıyla gerçekleşmektedir. Eski kovan, yavrulu ve ballı petekler de dahil olacak şekilde yakılarak imha edilmektedir [85, 87]. Silkme yöntemi uygulanırken dikkat edilen bir diğer unsur, arıcılık ekipmanlarının hijyenidir. Bu sayede enfeksiyonun aynı kovana veya kovanlar arasında bulaşımı engellenerek yöntemin etkinliği arttırılmaktadır [85, 89, 90]. Silkme yöntemi, *P. larvae* ile diğer mücadele yöntemleri arasında koloniye antibiyotik, bitkisel ekstrakt gibi etken bir madde uygulaması olmaksızın gerçekleştirilmesiyle öne çıkmaktadır. Koloniye herhangi bir etken madde uygulanmaması ortaya çıkabilecek antimikrobiyal direnç, bal arılarında toksisite ve arı ürünlerinde kalıntı gibi problemlerin önüne geçmiş olacaktır [89]. Antibiyotiklerin *P. larvae*'ye karşı etkinlik oranının silkme yönteminin etkinlik oranıyla kıyaslandığı bir çalışmada, silkme yönteminin etkinlik oranının antibiyotiklerin etkinlik

oranıyla aynı çıkması *P. larvae* ile mücadelede antibiyotik kullanımının gerekliliğinin sorgulanmasına sebep olmuştur [90]. Silkme yönteminin etkinliğinin test edildiği diğer çalışmalarda ise, *P. larvae* sporlarının mekanik vektör olarak yayılımını gerçekleştiren ergin arılarda varlığının düşük oranlarda bile olsa devam etmesiyle silkme yönteminin güvenilirliği hakkında şüphelere yol açmıştır. Bu şüphelerin giderilmesi amacıyla 5 yıl süresince yapılan başka bir çalışmada; klinik belirti gösteren kovanların yakılması, klinik belirti göstermeyen ve spor yoğunluğu yüksek olan kolonilere silkme yönteminin uygulanması, arıcılık ekipmanlarında hijyene dikkat edilmesi gibi parametreler dikkate alınarak silkme yönteminin etkinliği test edilmiştir [87]. Çalışma sonucunda ergin arılarda *P. larvae* spor yoğunluğu %74 oranından %4 oranına düşüş göstermiş, buna ek olarak çalışmanın son döneminde klinik semptom gösteren kovan bulunmadığı rapor edilmiştir [87]. Silkme yönteminin bu çalışmayla birlikte klinik belirti göstermeyen fakat spor yoğunluğu fazla olan kolonilerde profilaktik tedavi olarak da uygulanabileceği değerlendirilmiştir.

Silkme yönteminin uygulama süresince hiçbir kimyasal madde veya ilaç kullanılmadan gerçekleştirilmesi; toksik etki oluşturmaması, arı ürünlerinde kalıntı probleminin yaşanmayacak olması gibi açılardan oldukça avantajı bulunmaktadır [85, 87]. Fakat klinik semptom gösteren kolonilerde uzun periyotta etkinliğinin bilinmemesi bu yöntemin uygulanması açısından dezavantajdır. Silkme yöntemi ancak klinik belirti göstermeyen kovanların erken tespit edilmesiyle önleyici bir tedavi olarak değerlendirilebilir.

2.7.2. *P. larvae* ile Mücadelede Kemoterapötik Yöntemler

Antibiyotikler, *P. larvae* ile mücadelede kullanılan en etkin kemoterapötik maddelerdir. Antibiyotikler, bakterilerin vejetatif formu üzerinde gösterdikleri antimikrobiyal etkiyle bakteriyel hastalıklarla mücadelede ilk akla gelen yöntemdir. AYÇ hastalığının bakteriyel kaynaklı bir enfeksiyon olduğu keşfedildiğinde, AYÇ ile mücadelede tercih edilen ilk yöntem olmuştur. *P. larvae*'nin antibiyotiklerle tedavisinde başta oksitetrasiklin (oxytetracyclin, OTC) olmak üzere, sülfanomidler, tylosin ve lincomysin gibi pek çok farklı antibiyotik kullanılmıştır [91-94]. Kullanılan bu antibiyotikler kolonilerde *P. larvae*'nin vejetatif formunun neden olduğu klinik belirtileri ortadan kaldırmıştır. Bu durum ilk aşamada kolonilerde *P. larvae* ile başarılı bir şekilde mücadele edildiği

izlenimini yaratmıştır. Fakat tedavi edilen kolonilerde hastalığın sonraki sezonlarda nüks ettiği gözlenmiştir. Bunun sebebi antibiyotiklerin, hastalığın kolonideki yayılımı sağlayan *P. larvae* sporlarına etki etmemesidir. Böylece antibiyotik kullanımıyla kolonideki *P. larvae* maskelenmekte ve sporlarıyla varlığını sürdürmektedir [10, 94-96]. *P. larvae*'nin kolonide nüks etmesi durumunda tekrarlayan antibiyotik kullanımları, bakterinin antibiyotik direnç geliştirmesine de sebep olmaktadır [87, 97, 98]. Gelişen antibiyotik dirençle birlikte etken maddesi farklı antibiyotikler ve antibiyotiklere alternatif olabilecek yöntemler araştırılmaya başlanmıştır [90, 99-101]. Antibiyotiklere alternatif yöntemlerde kullanılan etken maddeler (bitkisel ekstraktlar, arı ürünleri vb.) ile antibiyotiklerin etkinlik oranlarının kıyaslandığı in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalarda antibiyotiklerin etkinlikleri kıyaslandıkları etken maddelerin etkinliğinden düşük çıkmıştır [90, 102]. Bu sonuca ek olarak, hızlı gelişen antibiyotik direncinin yanında, hastalığın nüks etmesi, larvalarda ve ergin arılarda antibiyotiklerin toksik etki oluşturması, arı ürünlerinde yüksek oranda kalıntı bırakması, larva ve ergin arılarda mikrobiyotanın tahrip olması gibi nedenlerle antibiyotik kullanımı günümüzde Avrupa Birliği ve ülkemizde dahil olduğu pek çok ülkede yasaklanmıştır [24, 26, 87, 94]. Antibiyotik kullanımının yasak olmadığı Amerika ve Kanada gibi ülkelerde ise kullanımı son derece azalmıştır [26, 96]. Bu sebeplerle etken maddesi farklı antibiyotikler veya antibiyotiklere alternatif olabilecek doğal ürünler üzerine yapılan çalışmalar hızla artmaktadır.

2.7.3. *P. larvae* ile Mücadelede Doğal İçerikli Ürünler

2.7.3.1. Bitkisel Yağ ve Ekstraktlar

Bitkisel yağ ve ekstraktlar (BYE), elde edildikleri bitki türlerine bağlı olarak, içerdikleri basit ve kompleks bileşiklerle (fenoller, terpenler, hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler vb.) antimikrobiyal etkileri yüksek doğal içeriklerdir [88, 103]. Çok çeşitli bitki türlerinden elde edilen farklı BYE'lerin, *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki antibakteriyel etkisi in vitro ve in vivo çalışmalarla test edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda BYE'lerin *P. larvae*'ye karşı antibakteriyel etkinliği kanıtlanmıştır [88, 101, 104-108]. Gerçekleşen yüksek antibakteriyel etkinliğe sebep olan bileşikler araştırılırken, fenollerin (karvakrol, timol, ögenol vb.) ve alheditlerin (sitril, sitranellal vb) antibakteriyel etkinlikte önemli rol oynadıkları bulunsa da, esas etkinliğin BYE'lerin içeriğindeki bileşiklerin birbiriyle oluşturdukları sinerjiden kaynaklandığı

düşünülmektedir [88, 101, 103]. *P. larvae*'nin vejetatif formuna karşı görülen yüksek antibakteriyel etkinlik, *P. larvae*'nin spor formuna karşı gözlenmemiştir [88, 109-111]. BYE'lerin bitkisel kaynaklı olması, *P. larvae* ile olan mücadelede 2 avantaj sağlamaktadır. Bunlardan ilki, ergin arı ve larvalara toksik etkileri çok düşüktür veya yoktur. İkinci avantaj ise arı ürünlerinde kalıntı bırakmamalarıdır [26, 88, 101, 112]. Ancak BYE'lerin arı ürünlerinde kalıntı oluşturmalarında, arı ürünlerinin kalitesine olan etkisi çalışma konusudur. Ek olarak, *P. larvae* ile mücadelede BYE'lerin arılıklarda etkin bir şekilde kullanılması için; kullanım şekli, dozu ve direnç gelişimi çalışmaları da devam etmektedir [26, 88, 101, 111].

2.7.3.2. Arı Ürünleri

Arı ürünleri, arılar tarafından salgılanan ya da çiçek ve bitkilerden toplanan materyallerin ham madde olarak kullanılmasıyla arılar tarafından üretilmektedir. Arıların kendi salgılarıyla ürettikleri arı ürünleri; arı sütü ve bal mumudur. Bitkilerden elde ettikleri nektar, polen ve reçinemsî salgıyı topladıktan sonra kendi salgılarıyla karıştırarak ürettikleri arı ürünleri de; bal, polen, arı ekmeği, propolistir [113]. Arı ürünleri bitkisel olmalarının yanı sıra, arıların kendi enzimleriyle birleşmeleri nedeniyle de içerik açısından oldukça komplekstir ve antimikrobiyal, antikarsinojenik, antioksidan gibi pek çok özelliği içinde barındırmaktadır [1, 113]. Mikroorganizmaların geliştirdiği yüksek antibiyotik direncin son yıllarda artmasıyla, arı ürünlerinin özellikle propolis başta olmak üzere antimikrobiyal etkinlikleri enfeksiyonel hastalıklara karşı alternatif tedavi yöntemi arayışında ön plana çıkmaktadır [114, 115]. Dolayısıyla enfeksiyonel arı hastalıklarında da etkin bir mücadele yolu olarak arı ürünlerinin kullanılabilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır [116]. Arı hastalıklarıyla mücadelede arı ürünleri kullanılmasının, arılarda görülebilecek toksik etki ihtimalinin düşük olması, arı ürünlerinde kalıntı bırakmaması ve uygulama sırasında kolonilerde herhangi bir irritasyon sorununun görülmeyecek olması gibi avantajları bulunmaktadır. Son yıllarda arı ürünlerinden koloni savunmasında öne çıkan propolis gösterdiği yüksek antimikrobiyal etkiyle *P. larvae* ile mücadelede kullanılabilmesi düşünülmektedir [117]. Propolise ek olarak, arı sütünün larvaların ana besin maddesi olması ve içeriğinde yüksek antimikrobiyal etkinlik gösteren bileşikler bulundurmasıyla *P. larvae* ile mücadelede kullanılabilen diğer bir arı ürünü olduğu ön görülmektedir [47, 97, 118].

2.7.3.2.1. Propolis

Propolis, bitki gövdesinde bulunan yarıklardan, yaprak diplerinden, tomurcuklardan salgılanan ve yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip reçinemi maddelerin arılar tarafından toplanıp kendi salgılarıyla bir araya getirilerek ürettikleri bir arı ürünüdür [113]. Bu arı ürünü kovan içinde bulunan çatlakların kapatılması, kraliçe arının yumurtalamasından önce petek gözlerinin temizlenmesi, kovana giren yabancı maddelerin etrafının kaplanması gibi kovan içi hijyenin sağlanması amacıyla arılar tarafından üretilmektedir. Koloni içindeki kullanım amacına paralel olarak, propolis geniş spekturumda ve yüksek antimikrobiyal etkiye sahip bir arı ürünüdür [119]. Öne çıkan antimikrobiyal etkisiyle arı hastalıklarında, özellikle etkili bir tedavi yöntemi henüz bulunmayan *P. larvae*'yle mücadelede kullanılabileceği yönünde çalışmalar gerçekleştirilmektedir [116, 120]. Yapılan ilk çalışmalarda, farklı bölgelerden elde edilen propolislerin in vitro çalışmalar ile *P. larvae*'nin vejetatif formuna olan antibakteriyel etkinlikleri test edilmiş ve tüm propolislerin değişen oranlarda etkinlik oluşturduğu rapor edilmiştir [88, 97, 121, 122]. Propolisler arasında görülen antimikrobiyal etkinlik farkının toplandıkları bölgelerin farkının ise toplandığı bölgelerdeki vejetasyon farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yüzden propolisin içeriği ile antimikrobiyal etkinliği arasında korelasyon oluşturmaya yönelik yapılan çalışmalarda herhangi bir standardizasyona gidilememektedir [121]. Tüm propolislerde değişik oranlarda da olsa ortak olarak bulunan ve antimikrobiyal etkinliği sağladığı düşünülen bileşikler (fenoller, flavanoidler, esterler) izole edilerek *P. larvae*'ye karşı antimikrobiyal etkinlikleri test edilmiştir [100, 116]. Yapılan çalışmalarda propolis içeriğinden elde edilen bileşenlerin propolis kadar yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermediği ortaya çıkmıştır. Bu durum propolisin antimikrobiyal etkisinin aslında içerdiği tüm bileşiklerin birbiriyle sinerjik etkiye girmesiyle oluştuğunu ortaya çıkartmaktadır [100, 116, 120, 121, 123]. Propolisin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki etkinliğinin test edilmesinin yanında arazi koşullarında koloniler üzerindeki etkinliği de test edilmiştir. Klinik belirti gözlenmeyen fakat balda klinik belirtiyeye sebep olacak oranda *P. larvae* sporu içeren kolonilerdeki ergin arılar, hazırlanan propolisli şekerli şurup ile beslemenin ardından hiçbir zaman klinik semptom göstermemiş ve baldaki *P. larvae* spor oranında önemli düşüşlerin meydana geldiği gösterilmiştir [122]. Ayrıca kolonide propolis toplama davranışının indüklendiği kolonilerin *P. larvae*'ye karşı hassasiyetinin azaldığı da bildirilmiştir [97].

2.7.3.2.2. Arı Sütü

Arı sütü, 1-3 günlük işçi arıların hipofarenjiyal bezlerinden salgılanan ve yumurtalama gerçekleştikten sonra ilk 3 gün boyunca tüm larvaların, 3. günün ardından sadece kraliçe arı larvalarının beslendiği salgıdır [113, 124]. Arı sütü de diğer arı ürünleri gibi oldukça kompleks içeriğe sahiptir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör etkilerine ek olarak antimikrobiyal etkinliği de yüksek bir arı ürünüdür. Larvaların *P. larvae*'ye karşı en hassas olduğu 24-48 saatleri aralığında petek gözlerde larvaların beslenmesi amacıyla arı sütü yoğunluğu fazladır [124]. Arı sütünün *P. larvae* mücadelesindeki etkinliğinin saptanması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda arı sütünün larvaların *P. larvae*'ye en hassas olduğu dönemde yoğunluğunun fazla olması göz önünde bulundurulmuştur. Arı sütüyle yapılan in vitro çalışmalarda *P. larvae*'nin vejetatif formuna karşı etkili olup spor formuna karşı etkisinin olmadığı rapor edilmiştir [125, 126]. Arı sütünün, *P. larvae*'nin vejetatif formuna karşı var olan antibakteriyel etkinliğinin içeriğinde bulunan AMP'lerden (royalisin, defensin1, jellein) kaynaklandığı, ancak bu AMP'lerin *P. larvae*'nin spor formuna karşı etkisiz olduğu gösterilmiştir [118, 124, 126]. Arı sütünün içeriğinde bulunan AMP'lere ek olarak, *trans*-10-hidroksi-dekanoik asidin (kraliçe arı asidi, 10-HDA) gibi bileşenlerin petek gözün pH değerini asidik yönde değiştirmesiyle *P. larvae*'ye karşı antibakteriyel etkiyi arttırdığı gösterilmiştir [47]. Günümüzde arı sütünün içindeki antibakteriyel bileşiklerin tanımlaması ve bu bileşiklerin *P. larvae*'nin vejetatif ve spor formlarına karşı antibakteriyel etkinliği ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.7.4. *P. larvae* ile Mücadelede Biyokontrol

2.7.4.1. Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotik mikroorganizmalar buldukları konakla mutualist yaşamaktadır [127]. Konak, probiyotik mikroorganizmaya besin ve barınma sağlarken, probiyotikler ise konağa sindiremediği besinleri sindirme ve çeşitli mekanizmalarla patojenlerle mücadelede destek sağlamaktadır. Bu mekanizmalar; konağın immün sistemini uyararak patojenlere verilen tepkiyi hızlandırma, probiyotiklerin sentezlediği sekonder metabolitler ile patojenleri inhibe etme, probiyotiklerin yer tutucu olarak görev almasıyla patojenlerin kolonize olmasını önlemesidir [127, 128]. Probiyotik mikroorganizmalar erken larval evreyle birlikte bal arılarıyla yaşamaya başlamakta ve arı hastalıklarıyla mücadele açısından önemli bir noktada yer almaktadırlar [26, 128]. *P. larvae* ile

mücadelede probiyotiklerin etkileri, *Lactobacillus* cinsi ile araştırılmaktadır. Gerçekleştirilen in vitro çalışmalardan alınan pozitif sonuçlarla birlikte probiyotik mikroorganizmaların arazi koşullarında *P. larvae*'ye etkinliği çalışılmıştır [88, 129-131]. Arazi koşullarında probiyotik mikroorganizmaların *P. larvae* ile mücadelesinde etkinliğinin bulunmadığı gözlenmiştir [132]. Bu durumun temel sebebinin, probiyotik mikroorganizmaların koloniye diğer etken maddelerin uygulama yoluyla aynı olan derişik şekerli şurup içinde verilmesi olarak düşünülmüştür. Koloniye verilen derişik şekerli şurubun yarattığı osmotik stres, probiyotik mikroorganizmaların inhibisyonuna sebep olmuştur [132]. Bu problemin giderilmesi amacıyla probiyotik mikroorganizmaların, arı keki benzeri polen yoğunluklu bir içerikle birlikte koloniye verildiği çalışma gerçekleştirilmiş ve *P. larvae* ile mücadele olumlu sonuç alındığı bildirilmiştir [133]. Görülen yüksek antibakteriyel etkinin mekanizması incelenmiş ve bal arılarında bulunan probiyotiklerin *P. larvae* ile olan etkileşiminde, 3 temel mekanizmanın bulunduğu saptanmıştır. Bu mekanizmalardan birincisi probiyotiklerin larvaların bağırsaklarında kolonize olarak yer tutucu rolleriyle *P. larvae*'nin bağırsak dokusuna penetrasyonunu engellemektedir [128]. İkinci mekanizma, larvaların immün sisteminin probiyotik mikroorganizmalar ile uyarılarak *P. larvae* ile mücadelede etkin rolü bulunan defensin gibi AMP'lerin üretiminin artırılmasıdır [128, 133]. Üçüncü mekanizma ise, probiyotiklerin sentezlediği sekonder metabolitlerin *P. larvae* üzerinde yüksek antimikrobiyal etki göstermesidir [133-135].

Probiyotik mikroorganizmaların *P. larvae* mücadelesinde kullanılmasında; kolonilere uygulama şeklinin geliştirilmesi, uzun periyotlarda probiyotik mikroorganizma kullanımının koloniye olan etkisinin araştırılması, arıcılar için kolay ulaşılabilir ve ekonomik olması gibi parametreler açısından geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

2.7.4.2. Faj Terapileri

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bakteriyofajlar son yıllarda antibiyotik direncin de artmasıyla bakteriyel kaynaklı hastalıkların tedavisinde, biyokontrol aracı olarak kullanılmaktadırlar. Bakterinin konağına karşı direnç oluşturmamasına rağmen kendisini enfekte eden faja karşı direnç gösterememesi ve etkili fajın bakteride patojenite gösterdiği halde enfeksiyonun oluştuğu canlıda toksik etki

yaratmaması gibi nedenlerle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde fajlar tercih sebebi olmaktadır [136-139]. Bakteriyofajlar, enfekte ettikleri bakteride gösterdikleri etkiye göre litik veya lizojenik (ılımlı) olmak üzere iki ayrı grupta incelenmektedir. Litik fajlar bakterinin hücre duvarında bulunan bileşenlere bağlanarak enfeksiyonu gerçekleştirir ve bakteride hızla çoğalırlar. Bu hızlı proliferasyonun ardından bakteri hücresi fajlar tarafından lizise uğratılır ve yeni bakteri hücrelerinin enfekte edilmesiyle döngü hızlı bir şekilde devam etmektedir. Lizojenik bakteriyofajlar, bakterilerin DNA'larına entegre olarak kendilerini çoğaltan ve ancak belli bir dış kaynağın (ultraviyole ışınları, mutajen vb.) etkisiyle bakteriyi lizise uğratan bakteriyofajlardır [138, 140]. *P. larvae*'de tanımlanan bakterifajlar lizojenik bakteriyofajlardır [138]. Tanımlanan pek çok lizojenik bakteriyofajın bulunmasıyla, *P. larvae* ile mücadeledeki etkinliği çalışılmaktadır [138, 141]. Yapılan in vitro çalışmalarda *P. larvae* bakteriyofajlarının *P. larvae*'yi lizise uğratabildiği gösterilse de in vivo çalışmalarda etkinliğinin düşük olduğu gösterilmiştir [136, 138, 142]. In vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda, bakteriyofajların ayrıca endolizin enzimi sentezlediği ve bu enzimin *P. larvae*'yi inhibe edici özellikte olduğu bildirilmiştir [111]. Endolizinlerin saflaştırılarak *P. larvae* ile mücadelede kullanılması yönündeki araştırmalar devam etmektedir [143]. Bakteriyofajlar ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmaların yanında arazi koşullarında da çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Arazi koşullarında yapılan çalışmalarda ise çeşitli *P. larvae* bakteriyofajlarından hazırlanan şekerli şurup *P. larvae* spor yoğunluğunu ve klinik belirti gösterme ihtimalinin yüksek olduğu kolonilere verilmiştir. Çalışmaların sonucunda enfeksiyon yoğunluğunda ciddi bir fark gözlenmemiş olsa da deney gruplarında klinik belirti ortaya çıkmazken, kontrol gruplarında klinik semptom gösteren kolonilere rastlanmıştır. Bu durumun sebebi kolonilerde klinik belirtilere sebep olan *P. larvae*'nin vejetatif formlarının bakteriyofajlar tarafından inhibe edilmiş olmasıdır. Bu yönüyle bakteriyofajların *P. larvae* ile mücadelede proflaktik bir tedavi olarak uygulanabileceği düşünülmektedir [142, 144-146]. Bakteriyofajların arazi koşullarında uygulanabilirliğinin geliştirilmesi yönündeki çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca *P. larvae* bakteriyofajlarının lizojenik bakteriyofajlar olmasından dolayı, bakteriyofajlar ve *P. larvae* arasındaki ko-evrimin ilişkisinin yönüyle ilgili çalışmalar sürmektedir [145-148].

2.7.5. *P. larvae* ile Mücadelede Nanopartiküllerin Kullanılması

Nanopartiküller, 1-100 nanometre boyutunda, kimyasal olarak aktif, oldukça büyük bir yüzey alanına sahip ve biyoaktif etkinlikleri yüksek olan maddelerdir [149]. Son yıllarda hastalıklara karşı uygulanan etken maddelerin uygun nanopartiküller ile kaplanarak tedavi uygulanması, patojenlere karşı etkinliğin artırılması ve tedavinin uygulandığı canlıda toksik etkiyi azaltmasıyla öne çıkan bir mücadele yöntemi olmaktadır. Nanopartiküllerin bu özellikleriyle arıcılık alanında *P. larvae* mücadelesinde kullanılan etken maddelerle yaşanan problemlerin giderilebilmesine ilişkin çalışmalar gerçekleştirilmektedir [112, 149, 150]. *P. larvae* ile mücadelede bitkisel yağ ve ekstraktların etkinliği nanopartiküller ile kaplanarak test edilmiştir. Çalışmaların sonucunda antibakteriyel etkinliğin artmasının yanında, yüksek dozlarda bile toksik etkinin düşük olduğu gösterilmiştir [112, 149, 150]. Bitkisel yağ ve ekstraktların nanopartiküller ile denenmesine ek olarak yüksek antibakteriyel etkiye sahip gliserol monorülat molekülü nanopartiküller ile kaplanarak *P. larvae*'ye olan etkisi araştırılmıştır. Nanopartiküllerle uygulanan gliserol monorülatın *P. larvae*'nin vejetatif formunu inhibe etmesinin yanında spor formunda da inhibisyon etkisi bildirilmiştir. Ek olarak gliserol monorülat saf haliyle arıda toksik etki oluşturmuş fakat nanopartiküller ile uygulandığında arılarda toksik etkinin oluşmadığı gözlenmiştir. Nanopartiküllerin toksik etkisi fazla ancak tedavi etkisi yüksek maddelerin uygulanmasındaki toksisiteyi azaltması yönünde etkisi bulunmaktadır [112]. Nanopartiküllerin koloniler üzerindeki etkinliği ve arazide uygulanabilirliği yönündeki çalışmalar devam etmektedir.

2.8. Organik Asitler ve Arıcılıkta Kullanım Alanları

Organik asitler, kimyasal yapıları karbon iskeletinden (R-COOH) oluşan, zayıf asit etkinliği gösteren organik bileşiklerdir. Canlıların bünyesinde temel bileşen olarak (amino asitler, yağ asitleri, oksalik asit) yer almalarının yanı sıra metabolik olayların sonucunda (laktik asit, asetik asit) veya savunma (formik asit) gibi amaçlarla da üretilmektedirler [151, 152]. Organik asitler, canlılarda metabolize edildiğinde karbondioksit ve suya indirgenmektedir. Bu yüzden, canlı sistemlerde veya gıda ürünlerinde kalıntı problemine sebep olmamaktadır. Organik asitler aynı zamanda yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Bu açıdan gıda koruma ve büyükbaş hayvan yemlerinde antibiyotiklere alternatif olarak tercih edilmektedir. Organik asitler gıda ve büyükbaş hayvancılığındaki kullanım alanlarının dışında arıcılık sektöründe ekonomik

olarak büyük kayıplara sebep olan *Varroa destructor* ile mücadelede aktif olarak kullanılmaktadır [151-154].

Arıcılıkta ekonomik olarak büyük kayıplar sebep olan *V. destructor*, bal arılarını tüm gelişim evrelerinde (larva, pupa, ergin) kitinize dokuya penetre olarak arıların yağ dokusundan beslenen bir ektoparazittir. *V. destructor*, arılarda immün sistem elemanlarının sentezlendiği yağ dokudan beslenmesinin yanında, arıların kitinize dokusunda oluşturduğu lezyonlarla da bireyleri sekonder enfeksiyona açık hale getirmektedir. Bal arılarının yaşam döngüsüyle *V. destructor*'un yaşam döngüsü birbirine paralel ilerlemekte ve koloni içinde *V. destructor*'un sayısı hızla artış göstermektedir. Bu durum ergin arılara verdiği zararlar başta arı ürünlerinin kalitesi ve miktarını olumsuz şekilde etkilemekte, ardından büyük koloni kayıplarına sebep olmaktadır [29, 151, 154]. Bu sebeple *V. destructor* ile mücadele arıcılık sektöründe oldukça önemli bir yer kaplamaktadır. *V. destructor* ile mücadelede kullanılacak yöntemlerin; *V. destructor*'u etkilerken *A. mellifera*'ya zarar vermemesi, arı ürünlerinde kalıntı bırakmaması, kolay ve ulaşılabilir bir yöntem tercih edilmesi, arılarda toksik etki oluşturmaması gibi noktalar dikkate alınmalıdır [155, 156]. Mücadele yöntemi olarak biyolojik ve fiziksel yöntemler, kimyasal ve organik ilaçlar kullanılmaktadır. Organik asitler (oksalik asit, formik asit, laktik asit, asetik asit) *V. destructor* ile mücadelede düşük sıcaklıklarda uygulanmaları (15°C ve altında) sebebiyle sonbahar ve kışın tercih edilmektedirler. Ayrıca organik asitlerin; çabuk buharlaşması, ergin arı ve larvalarda toksik etkisinin düşük olması, *V. destructor*'a karşı %94'e varan etkili olması gibi sebeplerle de organik asitler *V. destructor* ile mücadelede tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Organik asitler, buhar halinde ya da damlatma şeklinde kovan içerisine etkin şekilde uygulanmaktadır [31, 152, 154, 156].

Gerçekleştirilen tez çalışmasında arılarda büyük zararlara sebep olan *V. destructor* ile mücadele etkili ve aktif kullanılan bir yöntem olan organik asitlerin, arılarda büyük zararlara sebep olan AYÇ etkeni *P. larvae*'ye olan etkinliği araştırılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. *P. larve* İzolatlarının Canlandırılması ve Safliklarının Kontrol Edilmesi

Hacettepe Üniversitesi Arı Sağlığı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *P. larvae* ATCC 25747 suşu ve 16 izolatın (06/04, 06/14, 06/21, 07/04, 34/35, 36/01, 37/02, 41/06, 47/01, 52/15, 67/16, 69/01, 74/02, 76/12, 78/13, 81/64) canlandırılması yapılmıştır. Gram boyama ve genetik işaretlerinin biyokimyasal testle kontrolü sağlanmış ve tüm aşamalarda etkin sonuç veren izolat tez deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Kültür koleksiyonundaki 16 izolatın canlandırılması amacıyla 0,75 g/L Nalidiksik asit (Nal) içeren Brain-Heart Infusion (BHI, Acumedia Manufacturers, 8 g/L) sıvı besi yerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Kùltürler 37°C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonucunda üreme görùlen petrilere koloni morfolojileri incelenmiş ve koloniler gram boyama ile boyanarak bakteri morfolojileri gözlemlenmiştir.

Yapılan morfolojik incelemelerin ardından üreme gözlenen izolatlara *P. larvae*'nin katalaz (-) özelliği taşınması dolayısıyla katalaz testi uygulanmıştır.

Katalaz testi; aerobik mikroorganizmalarda ara ürün olarak hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene hidrolize edilip edilmediğini; dolayısıyla katalaz enziminin varlığını gösteren biyokimyasal bir testtir. Katalaz testi, *P. larvae* ATCC 25747 suşuna ve üreme gözlenen tüm izolatlara uygulanmıştır. Kùltürlerden alınan örnek, öze yardımıyla lam üzerine konularak 1 damla su ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonun üzerine %0,3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) lama damlatılmıştır. Katalaz (+) mikroorganizmalarda tepkimenin sonucunda oksijenin açığa çıkmasına bağlı olarak köpürme gözlenmektedir. Katalaz (-) mikroorganizmalarda ise, H_2O_2 hidrolize edilemeyeceğinden, oksijen açığa çıkmayacak ve herhangi bir köpürme gerçekleşmeyecektir.

3.2. 16S rRNA PCR Analizleriyle Tür Tayini

Hacettepe Üniversitesi Arı Sağlığı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda, *P. larvae* olması muhtemel izolatların ön seçimi yapıldıktan sonra tür tayininin kesinleştirilmesi amacıyla 16S rRNA PCR analizi aşağıda anlatılan protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

16S rRNA PCR Protokolü;

- Ön seçimi yapılan *P. larvae* izolatlarının DNA izolasyonu EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kitinin içinde yer alan kullanım kılavuzunda bakteriler için hazırlanan protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kit ile elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.
- 16S rRNA PCR işlemi için örnekler Çizelge 3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve 27F–1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır.
- Primer dizileri olarak; 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PCR örneklerinin hazırlanması

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaktif Konsantrasyon
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5mM
dNTP mix	20 mM	0,2mM
F. Primer	10 µM	0,3 µM
R. Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polimeraz (Solis Biodyne FIREPol® DNA Polymerase)	5 U/µM	2U
Kalıp DNA	3 µl	
Son hacim PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır		

- PCR hazırlanan örneklerle aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

Başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika

40 döngü; 95°C'de 45 saniye denatürasyon, 57°C'de 45 saniye, primerlerin DNA'ya bağlanması (annealing), 72°C'de 60 saniye uzama (extension), 72°C'de 5 dakika son uzama (final extension). Sıcaklığın 4°C'ye düşürülmesiyle PCR sonlandırılmıştır.

- PCR (Takara thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır.

3.3. Organik Asitlerin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında kullanılan organik asitler hali hazırda arıcılıkta *V. destructor* mücadelesinde kullanılmakta olan organik asitlerden seçilmiştir. Bu sebeple kullanım konsantrasyonları da sahadaki kullanım şekliyle aynı olacak biçimde hazırlanmıştır. Konsantrasyon yoğunluğunda dilüsyon solüsyonu olarak steril distile su (SDS) kullanılmıştır.

Kullanılan organik asitler ve konsantrasyonları;

Oksalik asit (C₂H₂O₄, Merck) %3,5 (w/v)

Formik asit (CH₂O₂, LabChem) %60 (v/v)

Laktik asit (C₃H₆O₃, LabChem) %15 (v/v)

Asetik asit (CH₃COOH, LabChem) %50 (v/v)

3.4. *P. larvae*'nin Vejetatif, Sporovejetatif ve Spor Formlarının Hazırlanması

P. larvae'nin vejetatif formunun eldesi için tür tayini klasik ve moleküler yöntemlerle kesinleştirilerek seçilmiş izolat (Pl 06/04) ve *P. larvae* ATCC 2574 suşunun; 0,75 g/L Nalidiksik asit (Nal) içeren BHI (Acumedia Manufacturers, 8 g/L) sıvı besi yerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından izolat 37 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırılmıştır.

3.4.1. *P. larvae*'nin Sporovejetatif Form Eldesine Dair Metot Geliştirme

P. larvae'nin sporovejetatif formunun gözleendiği parametrelerin literatürde bulunmaması sebebiyle tez çalışması kapsamında metot geliştirilmiştir. Bu amaçla *P. larvae*'nin

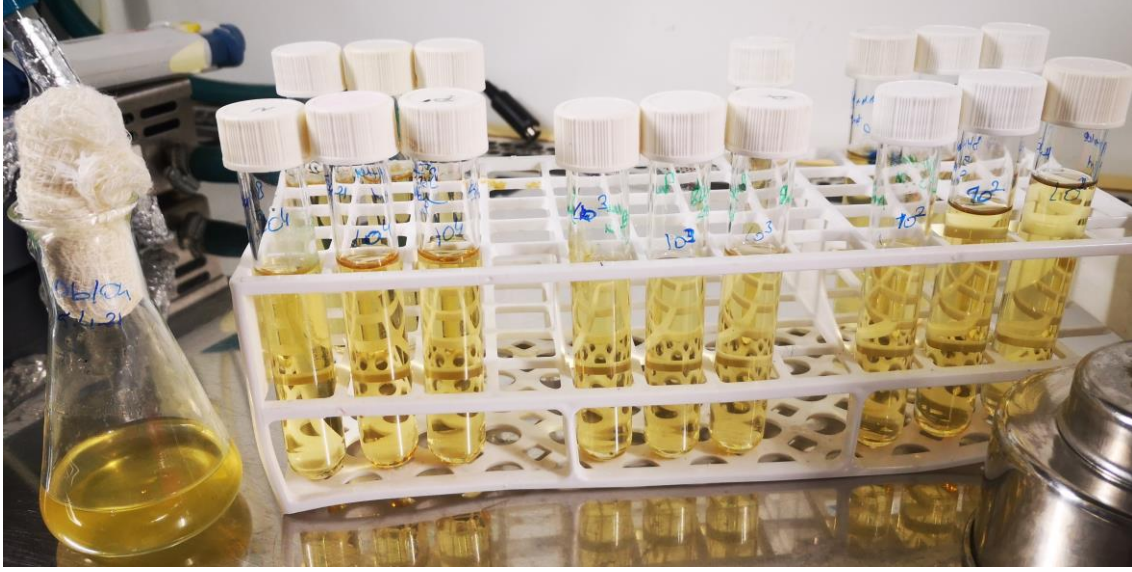
vegetatif form eldesi için izlenen metot aynı şekilde uygulanmış, ardından *P. larvae*'nin vegetatif formunu içeren kültür farklı sıcaklık koşullarında tutulmasıyla sporulasyon süreci indüklenmiştir. Bu sıcaklıklar, laboratuvar şartları ve aralıklarda gözlenen doğal koşullar göz önünde bulundurularak; -18 °C, +4°C, +25°C ve +35°C olarak belirlenmiştir. Hazırlanan kültürlerden 1-3 saatlik aralıklarla periyodik olarak gram boyama yapılarak sporlaşma sürecinin başlangıç ve bitiş sürelerinin tespiti yapılmıştır. Söz konusu işlemlerde, -18°C'de 60. dakikada, 4°C'de 24. saatte, 25°C'de 50. saatte, 35°C'de 84. saatte sporovejetatif form oluşumu gözlenmiştir. Deney koşullarının gerçekleştirileceği 25°C'de sporovejetatif formun stabilliğinin korunabilmesi için bir ileri aşamaya geçilerek, kültür koruma metodolojisinde bakteri metabolizmasını yavaşlattığı bilinen ve stoklamada kullanılan gliserin total hacim %15 olacak şekilde kültüre eklenmiştir [157]. Ardından 1-3 saatlik periyotlarda gram boyama ile yapılan kontroller sonucunda sporlaşma sürecinin devam ettiği gözlenmiştir. Sporulasyon tez kapsamında yapılacak deneylerin inkübasyon süresinden (7 gün) daha kısa sürede tamamlanmıştır. Dolayısıyla sporovejetatif formun stabil olarak tutulamaması sebebiyle deney metodolojisi vegetatif ve spor formlar kullanıcak şekilde yeniden düzenlenmiştir.

P. larvae'nin spor formunun eldesi amacıyla öncelikle vegetatif formların üretilmesinin ardından sporulasyon indüklenmesi için kültürler farklı sıcaklık koşullarında (-18 °C, +4°C, +25°C ve +35°C) bekletilmiştir. Hazırlanan kültürlerden periyodik olarak 1-3 saatlik aralıklarda gram boyama yapılarak sporlaşmanın gerçekleştiği zaman aralığı belirlenmiştir. *P. larvae*'nin spor formu, -18°C'de 70. dakikada, 4°C'de 26-27. Saat aralığında, 25°C'de 74. Saatte ve 35°C'de 1 haftada gözlenmiştir. Deneyden elde edilen sonuçlara göre, *P. larvae*'nin spor formunun en kısa sürede oluştuğu -18 °C'de 70 dakika yöntemi tez çalışmaları kapsamında tercih edilmiştir.

3.5. *P. larvae* Üretimi ve Bakteri Sayımı

Deneylerde kullanılmak üzere üretimi yapılan sıvı kültürlerdeki bakteri yoğunluğu 1×10^8 KOB (koloni oluşturan birim, Mc Farland 0.5) olarak belirlenmiştir. Organik asit solüsyonlarının bakteri üremesindeki inhibisyon oranını belirlemek amacıyla plak dökme metodu uygulanmıştır. Plak dökme metodundaki bakteri sayımının rahat yapılabilmesi amacıyla 1×10^8 KOB içeren sıvı kültür; 1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB yoğunluklarına gelecek şekilde dilüye edilmiştir. Bu işlem aynı zamanda sahada farklı

enfeksiyon oranlarında organik asitlerin etkinliğinin saptanabilmesi amacıyla kullanılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 1×10^8 KOB olan kültürün, 1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB yoğunluklarına dilüsyonu (Billur Küçüközmen).

3.6. Organik Asitlerle *P. larvae* İzolatlarının Muamelesi

P. larvae'nin spor ve vejetatif formlarını içeren tüm deney gruplarından alınan 5 mL sıvı kültür ile 5 mL, 2,5 mL ve 1,25 mL organik asit karıştırılarak muamele edilmiştir. Organik asitlerin *P. larvae* ile muamele süresi kovanlardaki uygulama ve etki süresi göz önünde bulundurularak 1 gün, 3 gün ve 7 gün olarak tanımlanmıştır. Negatif kontrol olarak *P. larvae*'nin vejetatif ve spor formları hiçbir işleme tabii tutulmamış ve pozitif kontrol olarak etiketlenmiştir. Pozitif koltröl grubunda ise sitotoksik etkisi bilinen %100'lük dimetilsülfooksit (DMSO, Labchem, CAS Number: 67-68-5) kültürlerle 5 mL eklenmiş deney gruplarıyla aynı süre muamele edilmiştir. Deney aralık koşullarını simüle ettiğinden deney setinde yer alan tüm test grupları muamele sürelerinde 25°C'de tutulmuştur (Şekil 3.2.).

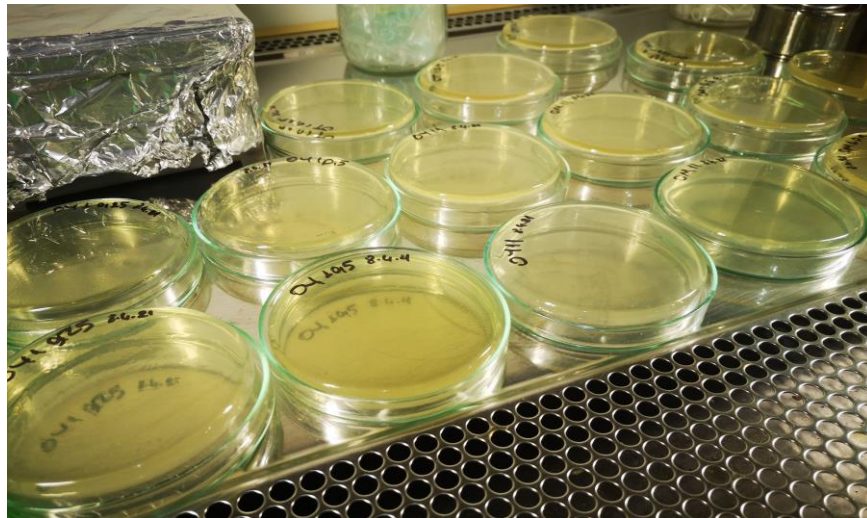


Şekil 3.2. *P. larvae*'nin değişen yoğunluktaki 1×10^4 KOB (mavi rak), 1×10^3 KOB (pembe rak) ve 1×10^2 KOB (sarı rak) kültürlerinin organik asitlerle muamelesi (Billur Küçüközmen).

3.7. Organik Asitlerin Etkinliğinin Dökme Plak Metoduyla Test Edilmesi

3.7.1. *P. larvae*'nin Vejetatif Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre Sayımı

Organik asitle muamele edilen deney ve kontrol gruplarından alınan 1 mL'lik örnekler 20 mL 0,75 g/L Nalidiksik asit (Nal) içeren BHI Agar (Acumedia Manufacturers, 38 g/L) besiyerine eklenerek dökme plak metodu uygulanmıştır. Ardından deney seti 37°C 'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırılmıştır. Deneyler çift tekrarlı ve kontrol gruplarını da içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Dökme Plak gerçekleştirilen deney grubu (Billur Küçüközmen).

3.7.2. *P. larvae*'nin Spor Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre Sayımı

Tüm deney ve kontrol gruplarına *P. larvae*'nin vejetatif formuna uygulanan dökme plak metodu *P. larvae*'nin spor formuna da aynı şekilde uygulanmıştır. Ancak bu uygulamanın ardından hiçbir plakta (pozitif kontrol grupları hariç) üreme görülmemesi nedeniyle ek uygulamalar ve metodolojiler denenmiştir.

3.7.2.1. *P. larvae*'nin Spor Formuna Dökme Plak Yöntemi Öncesi Yıkama Metodu Geliştirilmesi

P. larvae'nin spor formlarına uygulanan dökme plak metodunda deney gruplarında üreme görülmemesi üzerine ortamda bulunan organik asit varlığının spor formun devamlılığını sağladığı düşünülerek, inkübasyon öncesi yıkama yapılması ön görülmüştür. Yapılan literatür taramasında bu konuyla ilgili hiçbir bilgiye rastlanmadığından farklı yıkama metotları geliştirilerek optimizasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sırasında yıkama sayısı (1 yıkamadan 5 yıkamaya) ve yıkama işlemlerinde uygulanan santrifüj koşulları (12000 rpm'de 15 dk ve 4500 rpm'de 10 dk) tüm deney setlerinde ve kontrol grubunda denenmiştir. Yıkama işlemleri steril serum fizyolojik (SSF) ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yıkama prosedürleri birbirleriyle karşılaştırılarak en uygun yıkama prosedürü optimize edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kontrol grupları baz alınarak en etkili yıkama yönteminin 4500 rpm'de 10 dk'lık santrifüj koşullarında 5 kez yıkamanın olduğu belirlenmiştir. *P. larvae*'nin spor formuna dökme plak metodu uygulanmadan önce yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemlerinin ardından deney ve kontrol gruplarından alınan 1 mL'lik örnek 20 mL 0,75 g/L Nalidiksik asit (Nal) içeren BHI Agar (Acumedia Manufacturers, 38 g/L) besiyerine eklenerek dökme plak metodu uygulanmıştır. Deney seti 37°C'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırılmıştır. Deneyler çift tekrarlı ve kontrol gruplarını da içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7.2.2. *P. larvae* Spor Formunun Vejetatif Forma Dönüşümüne (canlılık testi) Dair Metot Geliştirme

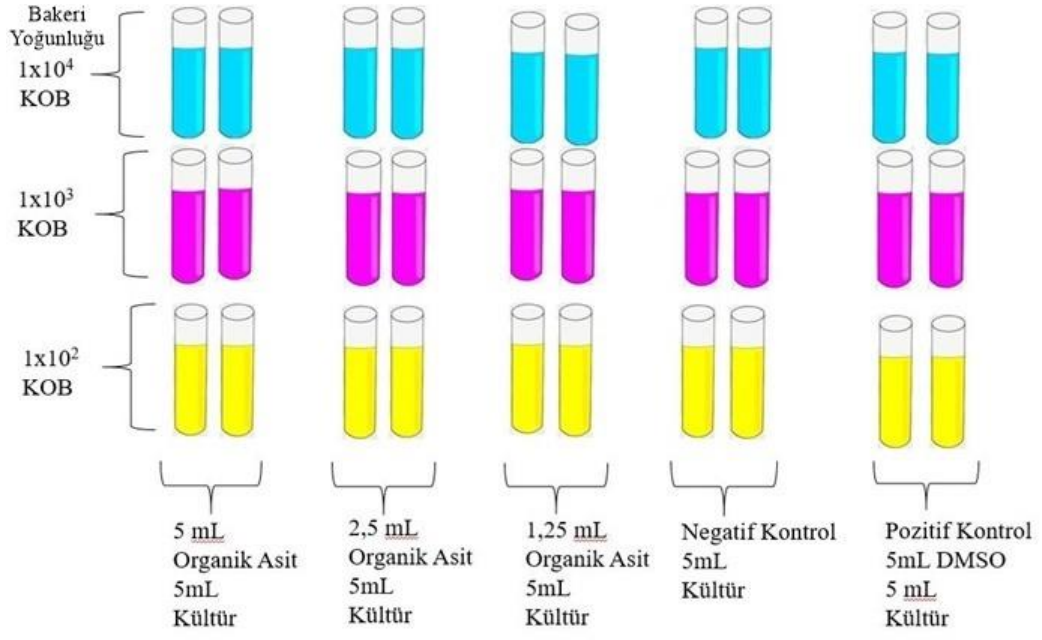
Yıkama işlemlerinin gerçekleştirilmesine rağmen *P. larvae*'nin spor formunun katı besiyerinde üreme göstermemesi üzerine, vejetatif forma geri dönüşümün katı besi yerinde daha zor olacağı düşünülerek deney setinin sıvı besi yeri kullanılarak tekrar oluşturması ön görülmüştür. Böylelikle organik asitlerin muhtemel antimikrobiyal etkisi

spor canlılığının kontrolüyle sağlanmış olacaktır. Tüm deney gruplarına yıkama işlemlerinin uygulanmasının ardından 1 mL kültür 20 mL 0,75 g/L Nalidiksik asit (Nal) içeren BHI (Acumedia Manufacturers, 38 g/L) sıvı besiyerine eklenmiştir. Ardından tüm deney seti 37°C’de günlük periyotlarla üreme etkinliği kontrol edilecek şekilde inkübasyon kaldırılmıştır (Şekil 3.4.).

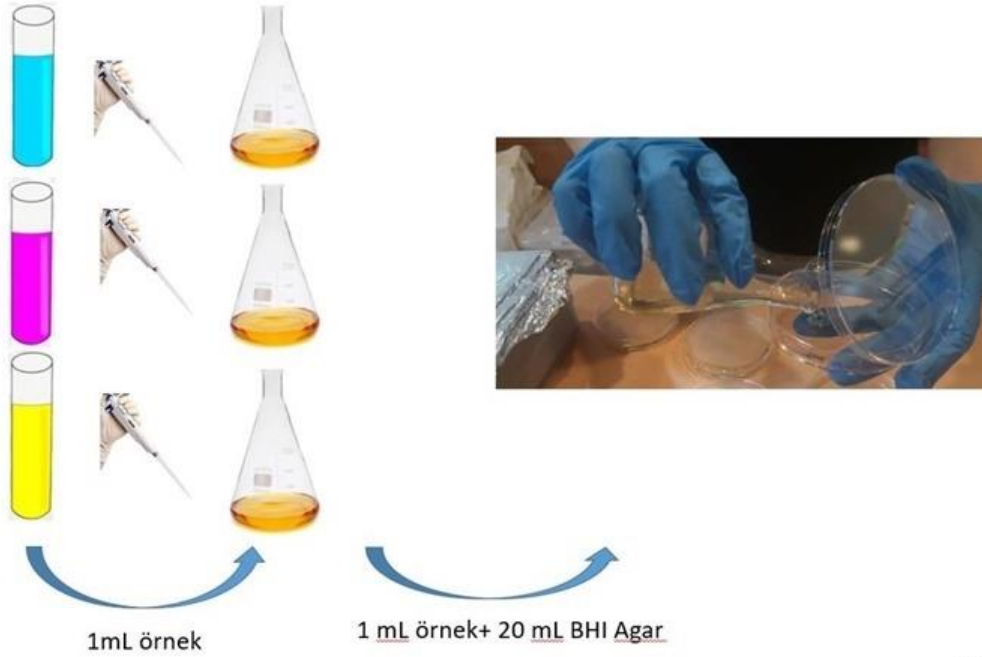


Şekil 3.4. Farklı yoğunluklarda hazırlanan *P. larvae*'nin spor formlarıyla değişen oranlarda organik asitlerle muamele edilen örneklerin yıkama prosedürünün ardından sıvı besiyerine aktarımı (Billur Küçüközmen).

Gerçekleştirilen tez deneylerinin grafiksel özeti Şekil 3.5.’de özetlenmiş ve deneylerde kullanılan etiketlemelerin açıklaması Çizelge 3.2.’de gösterilmiştir.



A



B

Şekil 3.5. Tez deneylerinin grafiksel özeti; her bir organik asit ve muamele süresi için aynı metot kullanılmıştır. A) Deney setleri, B) Deney gruplarından dökme plak metoduyla organik asitlerin antimikrobiyal etkinliklerinin test edilmesi.

Çizelge 3.2. Tez deneylerinde kullanılan etkilemeler (Örneğin OM15 etiketli test plağı; Oksalik asitin, *P. larvae* 'nin 1×10^4 KOB ile 1 gün 5 mL dozda muamele edilmesi anlamına gelmektedir.

Organik Asitler	Bakteri Yoğunluğu (KOB)	Muamele Süresi	Organik Asitin Dozu
O: Oksalik asit	M: 1×10^4	1: 1 gün	5: 5 mL
F: Formik asit	P: 1×10^3	3: 3 gün	2,5: 2,5 mL
AS: Asetik asit	S: 1×10^2	7: 7 gün	1,25: 1,25 mL
L: Laktik asit			

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. *P. larve* İzolatlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

Hacettepe Üniversitesi Arı Sağlığı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan; *P. larvae* ATCC 25747 suşu ve 06/04, 06/14, 06/21, 07/04, 34/35, 36/01, 37/02, 41/06, 47/01, 52/15, 67/16, 69/01, 74/02, 76/12, 78/13, 81/64 izolatlarının morfolojik incelemeleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kültür koleksiyonunda bulunan izolatların özellikleri.

İzolat Kodu	Üreme	Bakteri Morfolojisi	Katalaz Testi
<i>P. larvae</i> ATCC 25747	+	Gr (+) Streptobasil	-
06/04	+	Gr (+) Streptobasil	-
06/14	-	-	-
06/21	+	Gr (+) Streptobasil Gr (+) kok	-
07/04	+	Maya	+
34/35	-	-	-
36/01	+	Gr (+) koklar	+
37/02	+	Maya	+
41/06	-	-	-
47/01	+	Gr (+) basil	-
52/15	+	Maya	+
67/16	+	Gr (+) streptobasil	-
69/01	-	-	-
74/02	+	Gr (+)streptobasil Gr (+) kok	-
76/12	+	Maya	+
78/13	+	Gr (-) kok	+
81/64	-	-	-

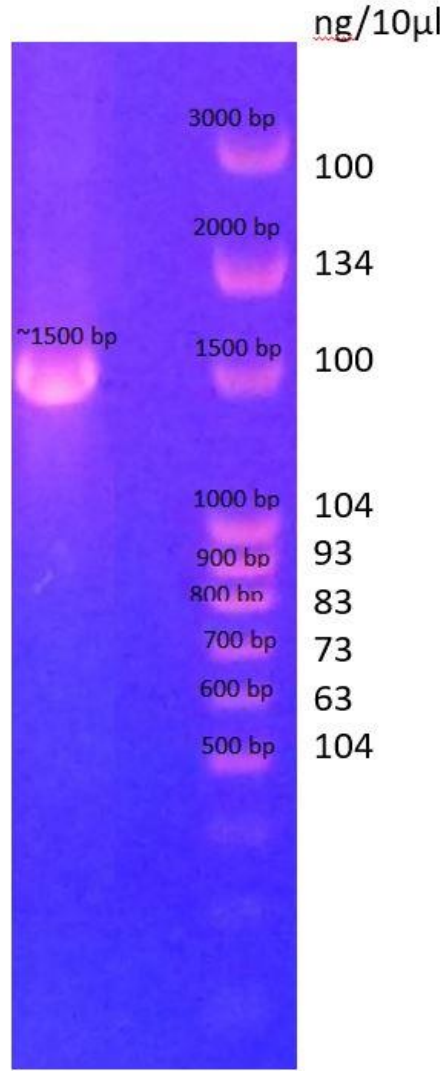
Hacettepe Üniversitesi Arı Sağlığı Laboratuvarı kültür koleksiyonundan, üreme görülen kültürlerden yapılan gram boyama ve genetik işaretlerin biyokimyasal testle kontrolünün sonucunda *P. larvae* olması muhtemel izolatlar; 06/04, 67/16 olarak belirlenmiştir.

4.2. 16S rRNA PCR ile Tür Tayini Sonuçları

P. larvae olması muhtemel saf kültür halinde tespit edilen 06/04 ve 67/16 numaralı bakteri kültürleri 16S rRNA PCR analizleriyle *P. larvae* oldukları kesinleştirilmiş ve 06/04 numaralı izolatla tez deneyleri gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Yapılan PCR analizlerinin sonucu NCBI kütüphanesi ile analiz edilmiş ve 06/04 numaralı izolat;

```
AAAGTCTGACGGAACAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGGAGTGA
CGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG
GCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGTTTCGCACT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTT
CTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGT
TTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
TGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTG
ACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGA
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGG
CACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTAACAATGGTTCGGT
AC
```

dizilimine sahiptir ve %99.89 benzerlik oranıyla *P. larvae* olarak tanımlanmıştır.



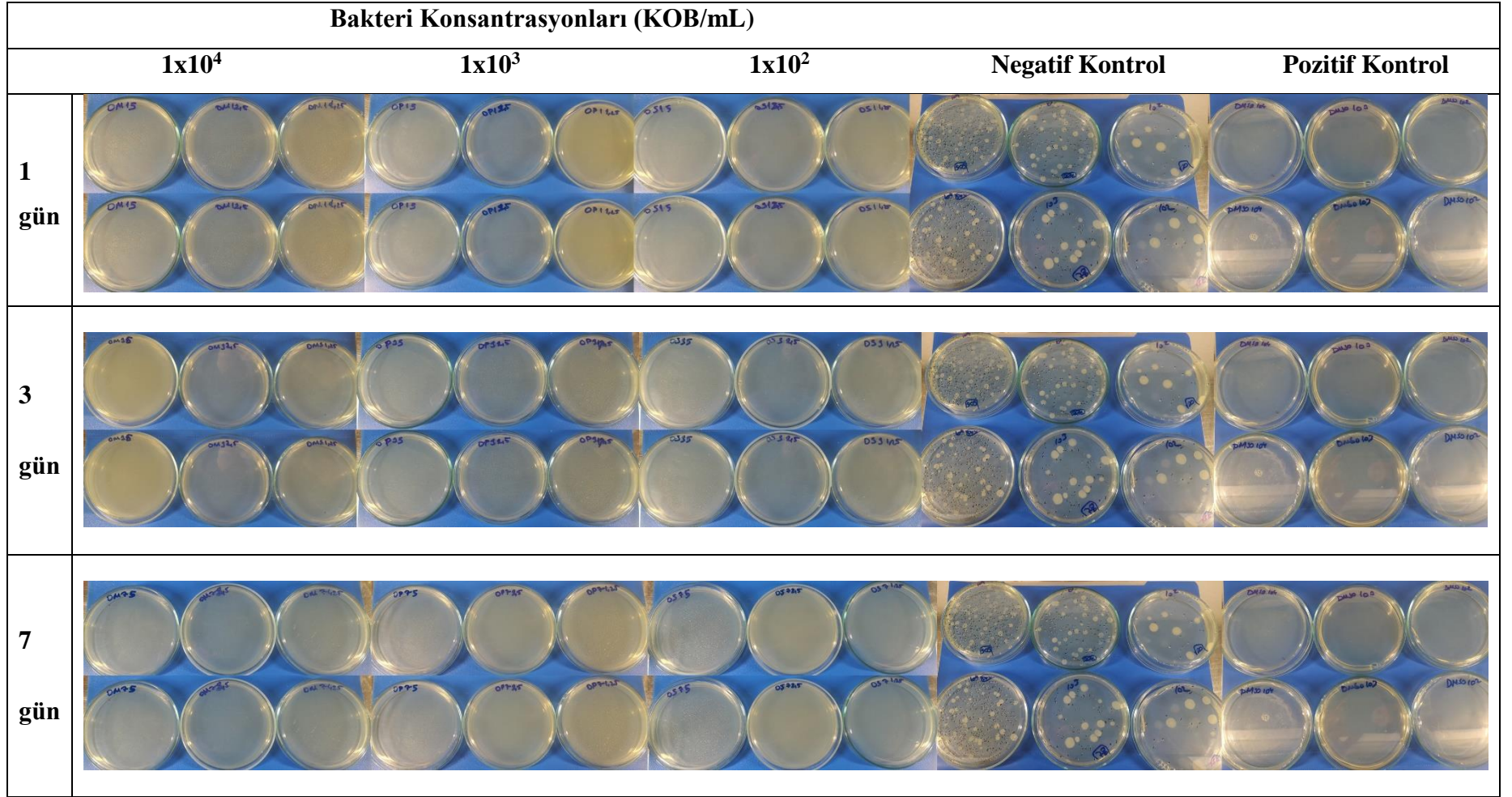
Şekil 4.1. 06/04 kodlu izolatin agaroz jel görüntüsü (Billur Küçüközmen).

4.3. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Etkinlik Test Sonuçları

4.3.1. *P. larvae*'nin Vejetatif Formunda Antimikrobiyal Etkinlik Test Sonuçları

4.3.1.1. Oksalik Asit

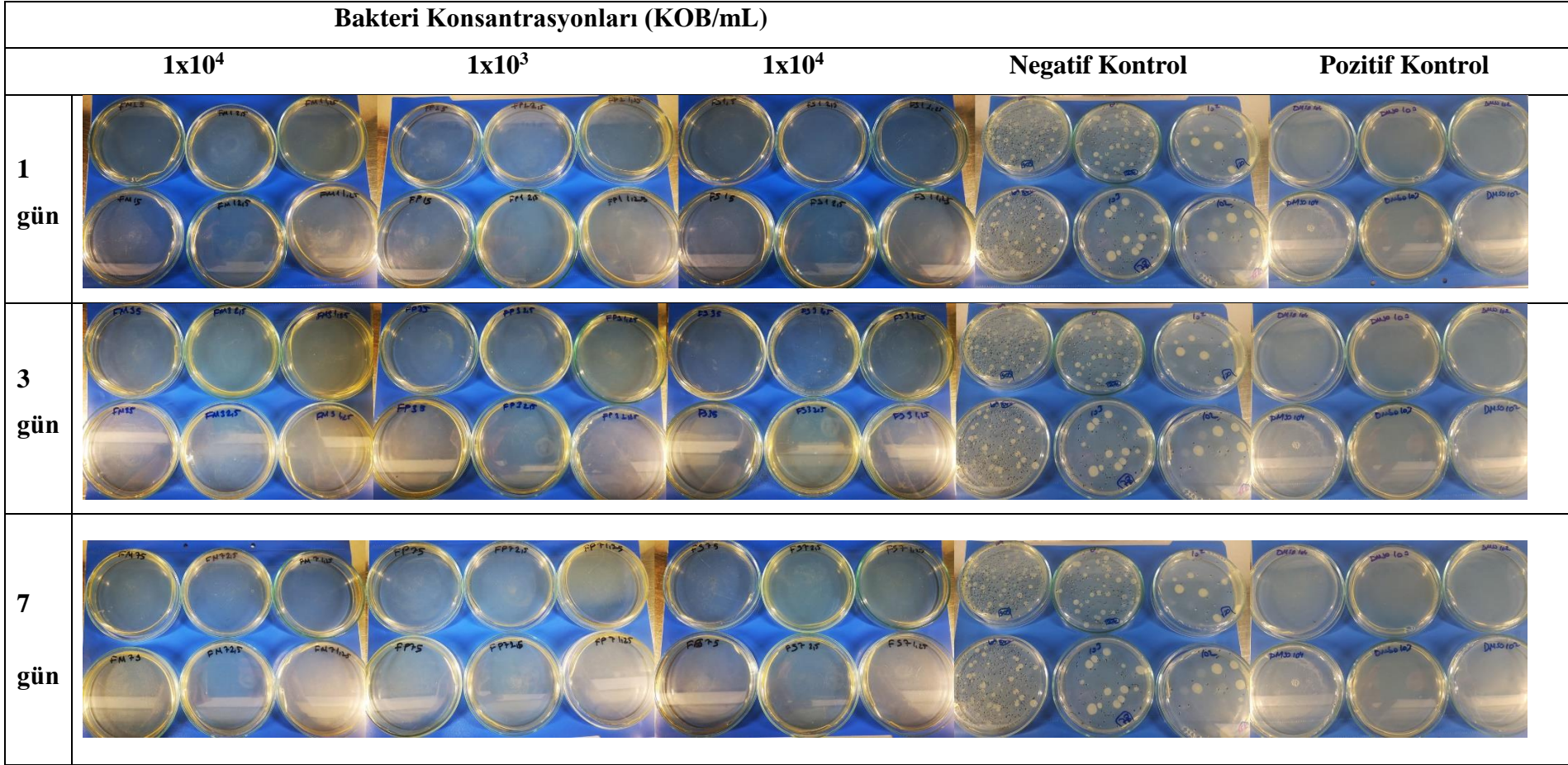
Hazırlanan deney setine ait tüm deney gruplarında oksalik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün) *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerinde %100 bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Oksalik asitin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).

4.3.1.2. Formik Asit

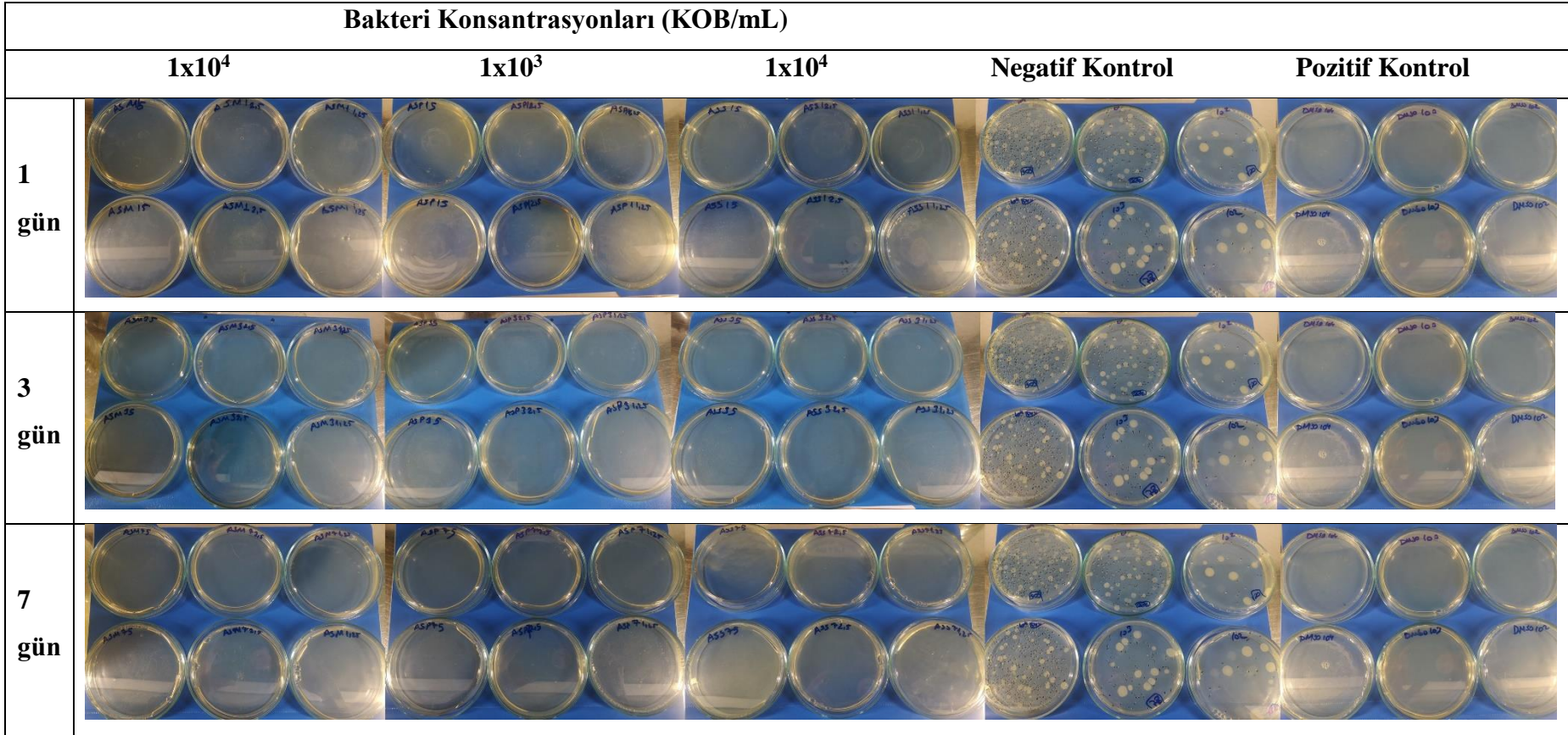
Hazırlanan deney setine ait tüm deney gruplarında formik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün) *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerinde %100 bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil. 4.3.).



Şekil 4.3. Formik asitin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).

4.3.1.3. Asetik Asit

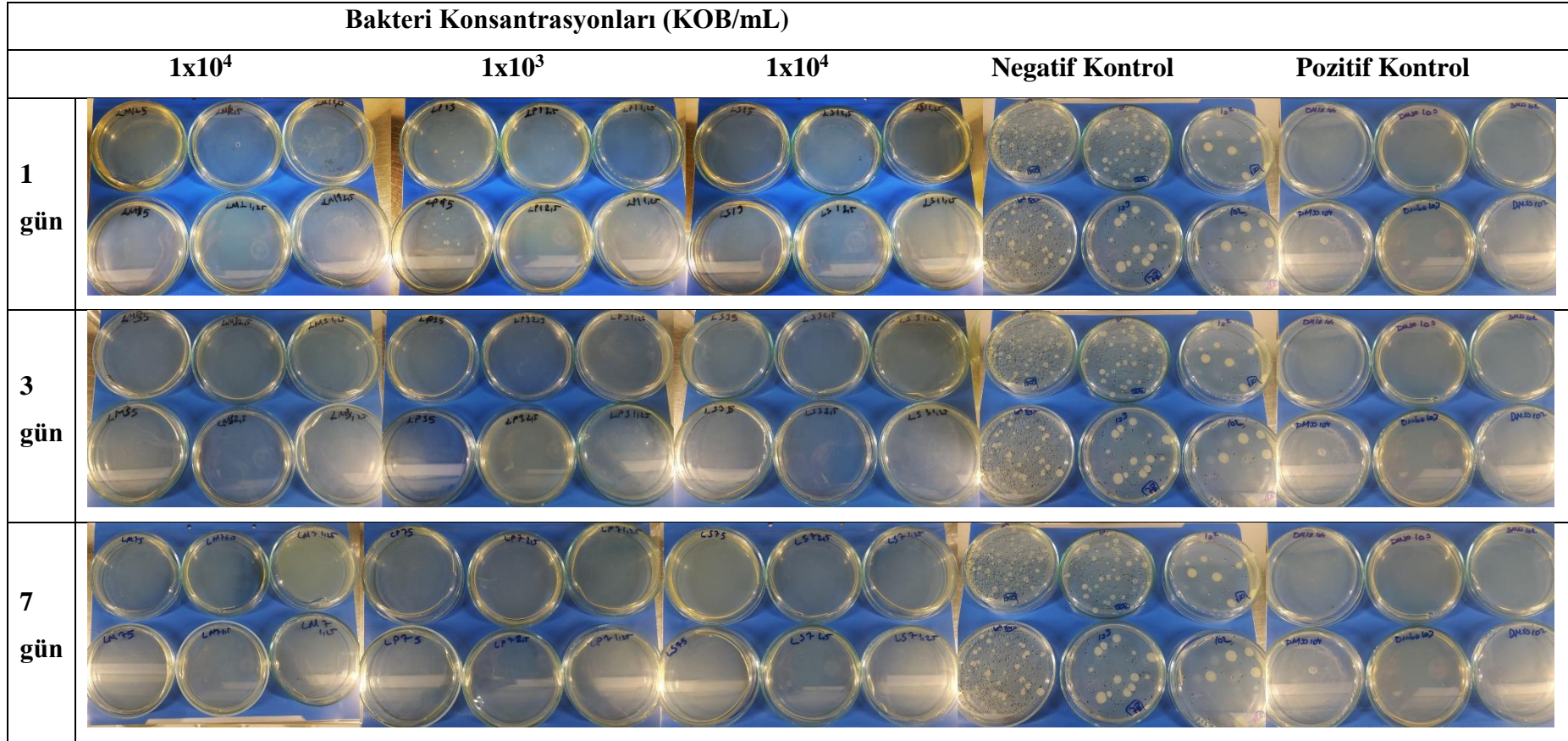
Hazırlanan deney setine ait tüm deney gruplarında asetik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün) *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerinde %100 bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Asetik asitin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).

4.3.1.4. Laktik Asit

Hazırlanan deney setine ait tüm deney gruplarında laktik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün) *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerinde %100 bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Laktik asitin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerindeki bakterisidal etkinliği (Billur Küçüközmen).

P. larvae'nin vejetatif formunda gerçekleştirilen antimikrobiyal etkinlik testlerinde negatif kontrol gruplarındaki dökme plak yöntemiyle sayılan KOB sayıları Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Deneylede pozitif kontrol olarak kullanılan ve bakterisidal etkisi bilinen DMSO'da *P. larvae* üremesi gözlenmemiştir.

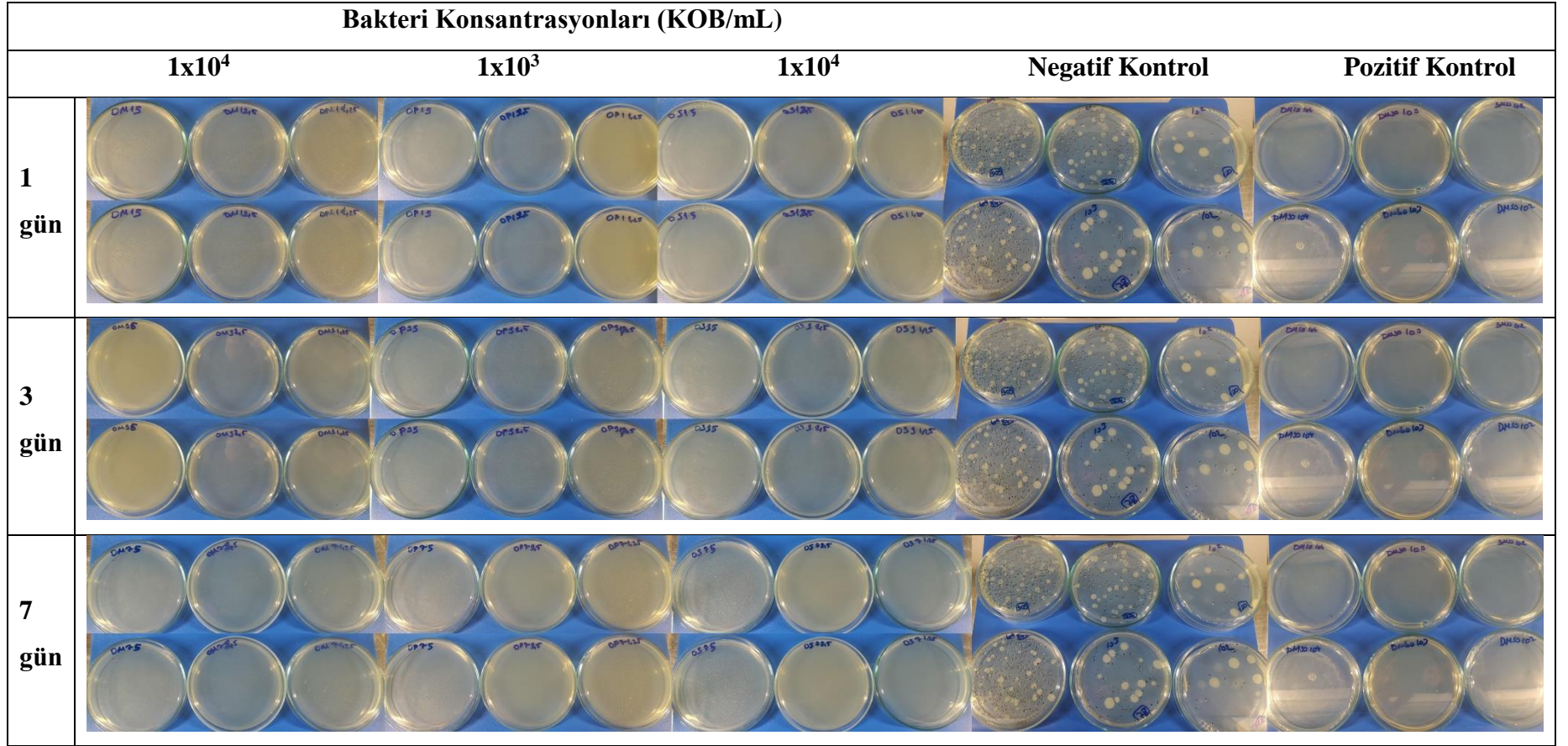
Çizelge 4.2. *P. larvae*'nin vejetatif formlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda negatif kontrol grubu sonuçları.

Sulandırma Faktörü	Hücre Sayımı (KOB)					
	<i>P. larvae</i> 06/04			<i>P. larvae</i> ATCC 25747		
	1. petri	2. petri	Ortalama	1. petri	2. petri	Ortalama
10^4	9505	9544	9524	9800	9440	9620
10^3	2860	2780	2820	3010	2760	2885
10^2	200	320	260	380	240	310

4.3.2. *P. larvae*'nin Spor Formunda Dökme Plak Metoduyla Hücre Sayım Sonuçları

4.3.2.1. Oksalik Asit

Deney setlerine ait tüm gruplar oksalik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün süreyle) *P. larvae*'nin spor formu üzerine uygulanmasının ardından üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.6).



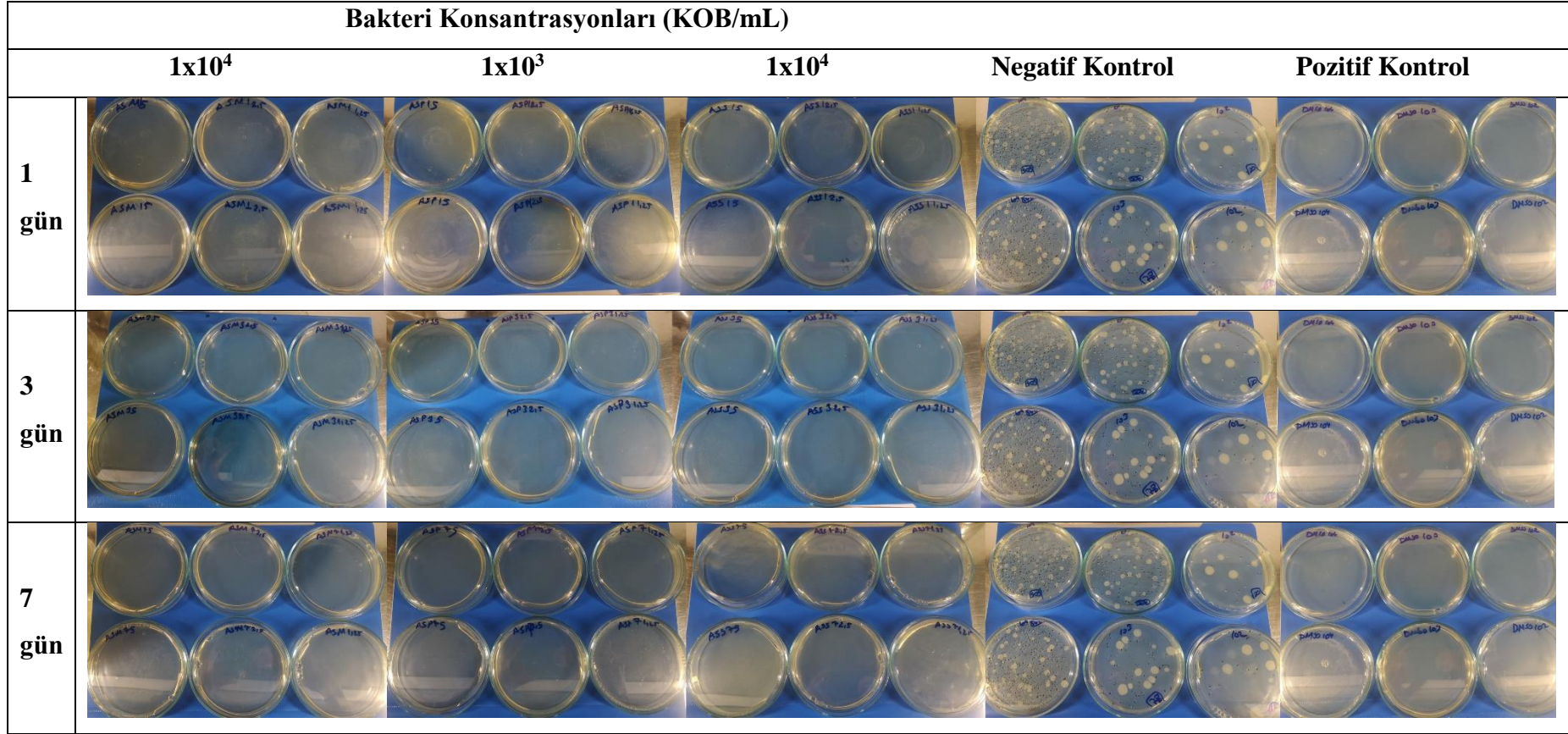
Şekil 4.6. Oksalik asitin *P. larvae*'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).

4.3.2.2. Formik Asit

Deney setlerine ait tüm gruplar formik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün süreyle) *P. larvae*'nin spor formu üzerine uygulanmasının ardından üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.7.).

4.3.2.3. Asetik Asit

Deney setlerine ait tüm gruplar asetik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün süreyle) *P. larvae*'nin spor formu üzerine uygulanmasının ardından üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Asetik asitin *P. larvae*'nin spor formuna uygulanması sonucunda üreme gözlenmeyen deney grupları (Billur Küçüközmen).

4.3.2.4. Laktik Asit

Deney setlerine ait tüm gruplar laktik asitin farklı dozlarının (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) farklı muamele sürelerinde (1 gün, 3 gün, 7 gün süreyle) *P. larvae*'nin spor formu üzerine uygulanmasının ardından üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.9.).

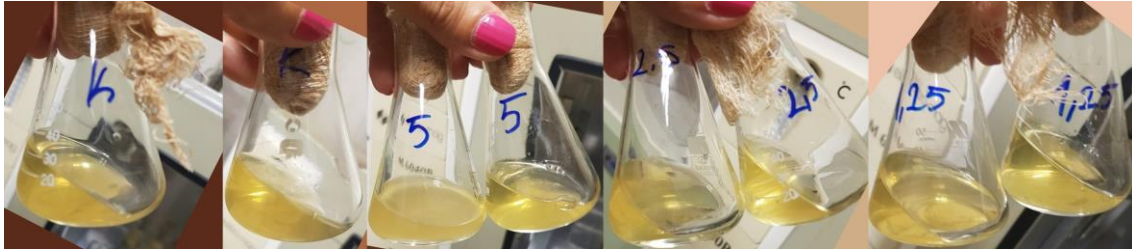
P. larvae'nin spor formunda gerçekleştirilen antimikrobiyal etkinlik testlerinde negatif kontrol gruplarındaki dökme plak yöntemiyle sayılan KOB sayıları Çizelge 4.3.'de gösterilmektedir. Deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılan ve bakterisidal etkisi bilinen DMSO'da *P. larvae* üremesi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. *P. larvae*'nin spor formlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda negatif kontrol grubu sonuçları.

Sulandırma Faktörü	Hücre Sayımı (KOB)					
	<i>P. larvae</i> 06/04			<i>P. larvae</i> ATCC 25747		
	1. petri	2. petri	Ortalama	1. petri	2. petri	Ortalama
10^4	5703	5726	5714	6000	5800	5900
10^3	1144	1112	1128	1500	2760	1350
10^2	120	192	156	200	150	175

4.3.3. *P. larvae* Spor Formunun Vejetatif Formuna Dönüşümüne (Canlılık Testi) Dair Metot sonuçları

P. larvae'nin spor formunun vejetatif forma dönüşümü sıvı ortamda 5 mL, 2,5 mL ve 1,25 mL organik asit içeren kültürlerde ve kontrol gruplarında inkübasyonun 5. gününde gerçekleşmiştir. Dolayısıyla deney grupları ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Deneye ait grup Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Organik asitlerle yapılan *P. larvae* spor formunun vejetatife dönüşümü deneylerinde inkübasyonun 5. günü (Oksalik asit grubu).

Organik asitler arıcılık sektöründe *V. destructor* ile mücadelede gösterdiği yüksek etkinlikle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Organik asitlerin tercih edilme sebepleri arılarda toksik etkilerinin düşük olması ve arı ürünlerinde kalıntı bırakmamalarıdır [30, 31, 156]. Aynı zamanda yapılan pek çok çalışmayla kanıtlanan antimikrobiyal etkinlikleri oldukça yüksektir. Organik asitlerin kullanımı antimikrobiyal etkinliklerinin yüksek olması sebebiyle pek çok sektörde (gıda koruma ve hayvancılık gibi) kullanımları yaygındır [151, 152, 158]. Tez çalışmasıyla birlikte söz konusu antimikrobiyal etkinlik arıcılık sektöründe büyük sorunlara sebep olan AYÇ hastalığı etkeni *P. larvae* üzerinde de test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar organik asitlerin *P. larvae* üzerinde antimikrobiyal bir aktiviteye sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Bu sonuç şimdiye dek organik asitlerin antimikrobiyal etkinliğine dair farklı alanlarda yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir [159-161]. Böylelikle organik asitlerin *P. larvae* 'ye karşı gösterdiği antimikrobiyal etkinlik ilk kez bu tez çalışmasıyla birlikte denenmiştir. Organik asitler (oksalik asit, formik asit, asetik asit ve laktik asit) *P. larvae* üzerinde farklı doz ve muamele sürelerinde test edilmiştir. Test edilen farklı doz (5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL) ve muamele süreleri (1 gün, 3 gün, 7 gün), hali hazırda arıcılıkta *V. destructor* ile mücadelede kullanılan teknikler (4 mL, 1 gün) baz alınarak belirlenmiştir [30, 31]. Kullanılan doz ve muamele süreleri arıcılık sektöründe kullanılan mevcut uygulamayı içine alacak şekilde çeşitlendirilmiştir. Deneylerin sonucunda organik asitlerin en düşük doz olan 1,25 mL'de bile *P. larvae* 'nin vejetatif formu üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen bu sonuç *V. destructor* için kullanılan dozun (4 mL) *P. larvae* 'nin vejetatif formunun üzerinde kesin etki yaratacağını göstermektedir. Şimdiye dek yapılan çalışmalarda *P. larvae* 'nin vejetatif formu üzerinde organik asitlere benzer şekilde birçok farklı antimikrobiyal ajanın (bitkisel ekstraktlar, arı ürünleri vb.) etkili olduğu da gösterilmiştir [47, 88, 97, 112]. *P. larvae* 'nin vejetatif formuna karşı yapılan bu çalışmalar, enfeksiyonun başlangıcında etkili bir yöntem olarak kullanılabilir. Organik asitlerin *P. larvae* 'nin vejetatif formuna antimikrobiyal etkinliğinin test edildiği bu tez çalışmasıyla, diğer çalışmalarda gösterildiği gibi antimikrobiyal etki söz konusudur. Böylelikle *P. larvae* 'nin vejetatif formuna organik asitlerin bakterisidal etkinliğinin bulunması literatüre yeni bir katkı sunmaktadır.

Deney sonuçları doğrultusunda etki dozunun belirlenmesinin ardından etki süresi de tespit edilmeye çalışılmıştır. Organik asitlerinin etki sürelerinin belirlenmesinde arıcılıkta *V. destructor* ile mücadele sırasındaki 1 günlük muamele süresi de dikkate alınarak ve

muamele süreleri; 1 gün, 3 gün ve 7 gün olarak belirlenmiştir. Tüm deney gruplarında en kısa muamele süresi olan 1 günde bakterisidal etki başlamış ve diğer muamele sürelerinde bu etki devam etmiştir. Diğer yandan *P. larvae* üzerinde yapılan diğer antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında böyle bir etki süresi parametresinin kullanılmadığı göze çarpmaktadır. Tüm çalışmalarda in vitroda klasik antimikrobiyal testlerin (antibiyoqram ve MIC testleri gibi) uygulandığı görülmektedir [88, 102, 104, 110, 116]. Halbuki antimikrobiyal maddelerin etki sürelerinin test edilmesi, *P. larvae* üzerine yapılacak antimikrobiyal çalışmalardan elde edilecek sonuçların sahada kullanımı ile karşılaştırılabilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Organik asitlerin *P. larvae* üzerindeki antimikrobiyal etkisi bu tez çalışmasıyla kanıtlanmış olmasına rağmen sahada *P. larvae* enfeksiyon yoğunluklarının farklı düzeylerde olabileceği sorusu akla gelmiştir. Bu hipotezden yola çıkarak farklı enfeksiyon yoğunluklarının yapay olarak yaratılması amacıyla; 1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB yoğunluklarında *P. larvae* kültürleri hazırlanmıştır. Ardından diğer değişkenler de (doz ve muamele süresi) dahil olacak şekilde deney setleri kurularak organik asitlerin farklı bakteri yoğunluklarındaki etkinliği de test edilmiştir. Deneylede kullanılan bakteri yoğunlukları test metodu olarak tercih edilen dökme plak yönteminde koloni sayımını da kolaylaştıracak şekilde seçilmiştir. Tez çalışmalarında en yüksek bakteri yoğunluğu olarak tercih edilen 1×10^4 KOB bakteri yoğunluğunda, organik asitlerin en düşük dozunda ve en az muamele süresinde (1 gün) dahi etkinlik göstermiştir. Öte yandan *P. larvae* 'ye karşı farklı antimikrobiyal maddelerin etkinliklerinin denendiği çalışmalarda, bakteri yoğunlukları sabit tutulmuştur. Bu yoğunluklar antimikrobiyal etkinlik testlerinde kullanılan standarda uygun olarak; 1×10^8 KOB (disk difüzyon metodu) ve 1×10^5 KOB (MIC metodu) yoğunluklarında tercih edilmiştir [97, 103, 116, 124]. Halbuki bal arısı larvalarını *P. larvae* 'ye en hassas olduğu dönem yumurta atıldıktan sonra ilk 24-48 saat aralığıdır ve sadece 10 adet *P. larvae* 'nin sporun larvayı enfekte edebildiği de bildirilmektedir [26, 52]. Bu durum değerlendirildiğinde larvalarda *P. larvae* 'nin vejetatif formunun en yoğun olduğu 48 saatlik dilimde üremenin hiçbir zaman 1×10^8 yoğunluğuna ulaşmacağı da göz önüne alınarak yapılan tez çalışmasında 1×10^4 KOB, 1×10^3 KOB ve 1×10^2 KOB yoğunlukları tercih edilmiş ve organik asitlerin *P. larvae* 'nin vejetatif formu üzerine etkili olduğu açıkça görülmüştür.

P. larvae'nin vejetatif formunun enfeksiyonun ilerlemesini sağladığı halde enfeksiyona neden olan ve yayılımını sağlayan formu spor formudur. Ayrıca, *P. larvae* sporlarının çok uzun süreler boyunca ergin arılarda ve çevrede canlılığını koruması *P. larvae* ile mücadeleyi zorlaştıran etkenlerden biridir. Bu nedenle *P. larvae*'nin spor formuna karşı inhibisyon etki gösteren maddeler üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan nanopartiküller ve bakteriyofajlar, *P. larvae*'nin spor formuna karşı inhibisyon etki göstermiştir. Kimyasal ya da organik antimikrobiyal maddeler ile yapılan çalışmalarda henüz *P. larvae*'nin spor formuna karşı bir antimikrobiyal etki gözlenmemiştir [112, 138, 149, 150]. Bu çalışma kapsamında da organik asitlerin *P. larvae*'nin spor formu üzerine antimikrobiyal etkileri saptanmaya çalışılmıştır. Ancak spor yoğunluklarında, hiçbir doz ve muamele süresinde negatif kontrol grubu dışında üreme gözlenmemiştir. Negatif kontrol grubunda gözlenen üreme deney mekanizmasının çalıştığı dolayısıyla canlı sporların vejetatif forma dönerek ürediğinin en büyük kanıtıdır. Deney gruplarında üreme görülmemesi organik asitlerin *P. larvae* açısından olumsuz koşul oluşturarak bakterilerin sporulasyon sürecini hızlandırdığı ve *P. larvae*'nin spor formunda kalmasını indüklediğini düşündürmüştür. Söz konusu ihtimalin değerlendirilmesi amacıyla farklı deney düzenekleri kurularak ileri testler yapılmıştır. Öncelikle ilk ihtimal göz önünde bulundurularak, olumsuz şartların kültürden uzaklaştırılabilmesi için yıkama işlemi deney düzeneğine eklenmiştir. Yıkama işlemleriyle birlikte ortamdaki olumsuz koşulların kaldırılmasına rağmen negatif kontrol grubu dışında deney gruplarında herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Bu durum organik asitlerin *P. larvae*'nin spor formunun inhibe edebileceği ihtimalinin dışında *P. larvae*'nin spor formundan vejetatif forma geri dönüşün organik asitlerle birlikte katı (kompleks) ortam sebebiyle zor olabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple tüm deney grupları sıvı ortama ekilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise *P. larvae*'nin spor formunda ya hiç üreme gözlenmemiş ya da antimikrobiyal madde ile muameleden sonra yayma ekim tekniği ile ekim gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan yayma ekim tekniğinde *P. larvae*'nin spor formundan vejetatif forma geri dönmesi dökme plak yöntemine kıyasla çok daha kolay gerçekleşebilmektedir. Yapılan bu çalışmalarda *P. larvae*'nin spor formunda görülen üremenin kontrol gruplarına az olması, araştırmacıları denenen antimikrobiyal ajanın *P. larvae*'nin spor formunu inhibe ettiğini düşünmelerine neden olmuştur [112, 150]. Bu denemelerin sonucunda üreme kontrol grupları da dahil olmak üzere 5. günde gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçla birlikte, organik asitlerin spor formu inhibe etmediği gibi sporulasyon sürecini de indükleyerek spor formun devamlılığını sağladığı

düşünülmüştür. Organik asitlerin yıkama işlemiyle birlikte spor solüsyonundan uzaklaştırılmasının ardından sıvı besiyerine ekilmesinin sonucunda negatif kontrol grupları da dahil olmak üzere tüm deney gruplarında 5. günde üremenin varlığı aynı yoğunlukta tespit edilmiştir. Bu durum organik asitlerin *P. larvae*'nin spor formu inhibe etmediği gibi sporulasyon sürecini indükleyerek spor formun devamlılığını sağladığını göstermektedir.

Tez çalışmasından elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde organik asitlerin arıcılık sektöründe *V. destructor* mücadelesindeki hali hazırda kullanımının *P. larvae* enfeksiyonuna karşı etkisi de ortaya çıkmıştır. Organik asitler *V. destructor* ile mücadelede hava sıcaklığı 15°C'nin altındayken, damlatma veya buhar yoluyla kovana uygulanmaktadır. Kovana uygulama şartları düşünüldüğünde, kolonideki yavru miktarı çok az veya yoktur. Dolayısıyla kolonide *P. larvae* mevcudu büyük oranda spor formda bulunmaktadır [30, 31, 154]. Bu açıdan değerlendirildiğinde tez çalışması sonuçlarına göre organik asitlerin kullanımı *P. larvae* sporlarının devamlılığını sağlamış olacaktır. Bu durum hastalık semptomlarının görülmesini engelleyecek ya da erteleyebilecektir. Ancak bu sonuç arıcılarımızı yanılgıya düşürebilir. Diğer yandan kış mevsiminin ılıman bir şekilde seyrettiği bölgelerde ise kolonide yavru bireylerin varlığı *P. larvae*'nin vejetatif formunun da kovan içindeki varlığına sebep olacaktır. Bu durumda organik asitler *P. larvae*'nin vejetatif formuna karşı antimikrobiyal etki göstereceğinden *V. destructor* mücadelesi sırasında hastalığa karşı akut bir tedavi de gerçekleşmiş olacaktır. Tüm bu açılardan değerlendirildiğinde organik asitlerin AYÇ ile mücadelesindeki etkinliği hava sıcaklığı ve kolonideki yavru miktarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Organik asitlerin *P. larvae* üzerine olan etkileri, tez çalışması kapsamındaki deney gruplarının farklı şekillerde çeşitlendirilmesi ve farklı organik asitlerin kullanılmasıyla genişletilebilir. Fakat tüm bu çalışmalar uygulanırken organik asitlerin kullanıldığı ortamda bal arılarının da bulunduğu dikkate alınmalı ve toksik etkinin belirlenmesi gibi süreçler de yapılacak çalışmalara dahil edilmelidir

5. YORUM

- Bu tez çalışmasıyla birlikte organik asitlerin *P. larvae* üzerine olan antimikrobiyal etkinliği ilk kez test edilmiştir. Böylelikle *V. destructor* ile mücadelede hali hazırda kullanılmakta olan bu yöntemin, arıcılıkta büyük sorunlara sebep olan başka bir hastalık olan AYÇ hastalığı üzerindeki etkisi de ortaya konmuştur.
- Çalışma kapsamında *P. larvae*'nin farklı formları eldesindeki metot yetersizliği sebebiyle *P. larvae*'nin vejetatif formundan spor formuna geçişteki sporulasyon sürecinin zamanlaması tespit edilerek literatüre katkıda bulunulmuştur.
- Test edilen organik asitlerin *P. larvae*'nin vejetatif formu üzerine bakterisidal etki gösterdiği açıkça görülmüştür.
- Organik asitlerin *P. larvae*'nin spor formunun devamlılığını indüklediği ve ortamdaki uzaklaştırıldıkları takdirde uygun besi yerinde 5. günde vejetatif forma döndükleri tespit edilmiştir.
- Arıcılıkta organik asitlerin *V. destructor* mücadelesinde sahada kullanımının erken ilkbaharda kovanda mevcut olan *P. larvae* sporlarının vejetatif forma dönüşmesini ve ilk yavru döneminde ortamdaki muhtemel *P. larvae* vejetatif formlarının dezenfeksiyonunu sağlayacağı düşünülmektedir. Organik asit kullanımının *P. larvae* enfeksiyonunu önleyici bir etkisinin bulunmamasına rağmen ortamdaki vejetatif formları yok etmesi dolayısıyla enfeksiyon oranını azaltıcı ve bulaşım oranını düşürücü bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] N. Mayda, Arı Poleni ve Arı Ekmeğinin Palinolojik, Kimyasal ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2020.
- [2] G.R. Williams, D.R. Tarpy, D. Vanengelsdorp, M.-P. Chauzat, D.L. Cox-Foster, K.S. Delaplane, P. Neumann, J.S. Pettis, R.E.L. Rogers, D. Shutler, Colony Collapse Disorder in context, *BioEssays*, 32 (2010) 845-846.
- [3] R. Johnson, Honey bee colony collapse disorder, Congressional Research Service Washington2010.
- [4] V. Burucu, H.S.G. Bal, Türkiye’de arıcılığın mevcut durumu ve bal üretim öngörüsü, *Tarım ekonomisi araştırmaları dergisi*, 3 (2017) 28-37.
- [5] <https://www.tab.org.tr/>, 12.10.2021.
- [6] G. Kavak, S. Bıyık, A. Güler, Son Yillarda Görülen Koloni Kayıpları Ve Muhtemel Sebepleri, *Uludag Bee Journal*, 15 (2015).
- [7] K.M. Smith, E.H. Loh, M.K. Rostal, C.M. Zambrana-Torrel, L. Mendiola, P. Daszak, Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses, *EcoHealth*, 10 (2013) 434-445.
- [8] D. Vanengelsdorp, J.D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B.K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D.R. Tarpy, J.S. Pettis, Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study, *PLoS ONE*, 4 (2009) e6481.
- [9] P. Simeunovic, J. Stevanovic, D. Cirkovic, S. Radojicic, N. Lakic, L. Stanisic, Z. Stanimirovic, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony, *Journal of Apicultural Research*, 53 (2014) 545-554.
- [10] E. Genersch, Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (2010) 87-97.
- [11] D.L. Downey, M.L. Winston, Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species, *Apidologie*, 32 (2001) 567-575.
- [12] L. Morawetz, H. Köglberger, A. Griesbacher, I. Derakhshifar, K. Crailsheim, R. Brodschneider, R. Moosbeckhofer, Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria, *PLOS ONE*, 14 (2019) e0219293.
- [13] E. Forsgren, European foulbrood in honey bees, *Journal of invertebrate pathology*, 103 (2010).
- [14] E. Borum, Bal Arılarında Yavru Çürüklüğü Ve Kireç Hastalığına Bağlı Koloni Kayıpları, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 16 (2017) 57-66.

- [15] E. Forsgren, B. Locke, F. Sircoulomb, M.O. Schäfer, Bacterial diseases in honeybees, *Current Clinical Microbiology Reports*, 5 (2018) 18-25.
- [16] L. Aydin, A. Doğanay, N. Güneş, H.H. Oruç, K. Yeşilbağ, S. Bakırcı, A.E. Borum, A.O. Girişgin, M.N. Muz, M.E. Güneş, *Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Sağlığı*, Dora Yayınevi, Ankara, 2021.
- [17] S.J. Martin, M.H. Allsopp, *Honey Bee Diseases and Parasites*, Springer International Publishing 2020, pp. 1-6.
- [18] A.S. Floyd, B.M. Mott, P. Maes, D.C. Copeland, Q.S. McFrederick, K.E. Anderson, Microbial Ecology of European Foul Brood Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*): Towards a Microbiome Understanding of Disease Susceptibility, *Insects*, 11 (2020) 555.
- [19] J. Ebeling, H. Knispel, G. Hertlein, A. Fünfhaus, E. Genersch, Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (2016) 7387-7395.
- [20] E. Genersch, A. Ashiralieva, I. Fries, Strain-and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2005) 7551-7555.
- [21] A. Lindström, Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood, *Microbial ecology*, 56 (2008) 253-259.
- [22] I. Alvarado, A. Phui, M.M. Elekonich, E. Abel-Santos, Requirements for in vitro germination of *Paenibacillus larvae* spores, *Journal of bacteriology*, 195 (2013) 1005-1011.
- [23] E. Forsgren, J. Stevanovic, I. Fries, Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes, *Veterinary microbiology*, 129 (2008) 342-349.
- [24] Resmi Gazete, 21 Aralık 2011.
- [25] L. Poppinga, E. Genersch, Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae, *Current opinion in insect science*, 10 (2015) 29-36.
- [26] E. Genersch, American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*, *Journal of invertebrate pathology*, 103 (2010) S10-S19.
- [27] F. Nazzi, Y. Le Conte, Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*, *Annual Review of Entomology*, 61 (2016) 417-432.
- [28] S.D. Ramsey, R. Ochoa, G. Bauchan, C. Gulbranson, J.D. Mowery, A. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J.M. Cicero, J.D. Ellis, *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (2019) 1792-1801.

- [29] A. Özkırım, B. Küçüközmen, Chitosan-based gel application on model bees (*Apis mellifera* L.) for healing bite wounds caused by *Varroa destructor*, *Journal of Apicultural Research*, (2021) 1-7.
- [30] A.O. Girişgin, L. Aydın, Efficacies of formic, oxalic and lactic acids against *Varroa destructor* in naturally infested honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in Turkey, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2010) 941-945.
- [31] B. Yücel, Bal arısı (*Apis mellifera* L.) kolonilerinde varroa (*Varroa jacobsoni* Q.) ile mücadelede farklı organik asitlerin kullanılmasının koloni performansı üzerine etkileri, *Hayvansal Üretim*, 46 (2005).
- [32] I. Çakmak, L. Aydın, E. Gulegen, H. Wells, *Varroa* (*Varroa destructor*) and tracheal mite (*Acarapis woodi*) incidence in the Republic of Turkey, *Journal of Apicultural research*, 42 (2003) 57-60.
- [33] D.C. De Graaf, A.M. Alippi, K. Antúnez, K.A. Aronstein, G. Budge, D. De Koker, L. De Smet, D.W. Dingman, J.D. Evans, L.J. Foster, Standard methods for American foulbrood research, *Journal of Apicultural Research*, 52 (2013) 1-28.
- [34] E.N. Grady, J. MacDonald, L. Liu, A. Richman, Z.-C. Yuan, Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review, *Microbial cell factories*, 15 (2016) 1-18.
- [35] B.G. Saville, Differentiation of virulent and biological control *Paenibacillus* larvae strains associated with American foulbrood in bee hives, University of York, 2011.
- [36] H. Beims, B. Bunk, S. Erler, K.I. Mohr, C. Spröer, S. Pradella, G. Günther, M. Rohde, W. von der Ohe, M. Steinert, Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood, *International Journal of Medical Microbiology*, 310 (2020) 151394.
- [37] E. Genersch, E. Forsgren, J. Pentikäinen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski, I. Fries, Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus* larvae subsp. *larvae* as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (2006) 501-511.
- [38] S. Bassi, G. Formato, M. Milito, K. Trevisiol, C. Salogni, E. Carra, Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus* larvae isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy, *Veterinary Quarterly*, 35 (2015) 27-32.
- [39] M. Djukic, E. Brzuszkiewicz, A. Fünfhaus, J. Voss, K. Gollnow, L. Poppinga, H. Liesegang, E. Garcia-Gonzalez, E. Genersch, R. Daniel, How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus* larvae, *PloS one*, 9 (2014) e90914.
- [40] M. Peters, J. Kilwinski, A. Beringhoff, D. Reckling, E. Genersch, 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 (2006) 100-104.

- [41] A. Fünfhaus, E. Genersch, Proteome analysis of *Paenibacillus* larvae reveals the existence of a putative S - layer protein, *Environmental microbiology reports*, 4 (2012) 194-202.
- [42] D.W. Dingman, Comparative analysis of *Paenibacillus* larvae genotypes isolated in Connecticut, *Archives of microbiology*, 197 (2015) 789-795.
- [43] M.T. Madigan, *Brock Biology of Microorganisms*, 11. baskı, SciELO Espana, 2005.
- [44] I. Alvarado, M.M. Elekonich, E. Abel-Santos, H.J. Wing, Comparison of in vitro methods for the production of *Paenibacillus* larvae endospores, *Journal of microbiological methods*, 116 (2015) 30-32.
- [45] A. Özkırım, Bazı Sentetik Antibiyotikler ve Bitkisel Yağların Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Yavru Çürüklüğü Hastalıklarındaki (Amerikan ve Avrupa Yavru Çürüklüğü) Antibakteriyel Etkilerinin Saptanması, *Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi*, 2006, pp. 107.
- [46] A. Lindström, S. Korpela, I. Fries, The distribution of *Paenibacillus* larvae spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Journal of invertebrate pathology*, 99 (2008) 82-86.
- [47] M. Šedivá, M. Laho, L. Kohútová, A. Mojžišová, J. Majtán, J. Klaudivy, 10-HDA, a major fatty acid of royal jelly, exhibits pH dependent growth-inhibitory activity against different strains of *Paenibacillus* larvae, *Molecules*, 23 (2018) 3236.
- [48] A.d.S. Cruz, C. Elaine, M. Da Silva-zacarin, O.C. Bueno, O. Malaspina, Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae, *Cell Biology and Toxicology*, 26 (2010) 165.
- [49] Q.W. Chan, A.P. Melathopoulos, S.F. Pernal, L.J. Foster, The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae, *BMC genomics*, 10 (2009) 1-9.
- [50] A. Felicioli, B. Turchi, F. Fratini, M. Giusti, R. Nuvoloni, F.R. Dani, S. Sagona, Proteinase pattern of honeybee prepupae from healthy and American Foulbrood infected bees investigated by zymography, *Electrophoresis*, 39 (2018) 2160-2167.
- [51] Q.W.T. Chan, *Proteomic analysis of Apis mellifera immune response against Paenibacillus larvae*, University of British Columbia, 2010.
- [52] D. Yue, M. Nordhoff, L.H. Wieler, E. Genersch, 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 (2008) 1612-1620.
- [53] S. Rauch, A. Ashiralieva, K. Hedtke, E. Genersch, Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American foulbrood of honeybees, *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (2009) 3344-3347.

- [54] J. Ebeling, A. Fünfhaus, E. Genersch, The buzz about ADP-Ribosylation toxins from *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood in honey bees, *Toxins*, 13 (2021) 151.
- [55] S. Müller, E. Garcia-Gonzalez, E. Genersch, R.D. Süssmuth, Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus* larvae, *Natural product reports*, 32 (2015) 765-778.
- [56] A. Fünfhaus, L. Poppinga, E. Genersch, Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *P. aenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood, *Environmental Microbiology*, 15 (2013) 2951-2965.
- [57] L. Poppinga, B. Janesch, A. Fünfhaus, G. Sekot, E. Garcia-Gonzalez, G. Hertlein, K. Hedtke, C. Schäffer, E. Genersch, Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood of honey bees, *PLoS Pathogens*, 8 (2012) e1002716.
- [58] E. Garcia-Gonzalez, L. Poppinga, A. Fünfhaus, G. Hertlein, K. Hedtke, A. Jakubowska, E. Genersch, *Paenibacillus* larvae chitin-degrading protein Pl CBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees, *PLoS pathogens*, 10 (2014) e1004284.
- [59] E. Garcia-Gonzalez, E. Genersch, Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *P. aenibacillus* larvae, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis, *Environmental Microbiology*, 15 (2013) 2894-2901.
- [60] K. Antúnez, M. Anido, G. Schlapp, J.D. Evans, P. Zunino, Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus* larvae, potential virulence factors involved in honeybee larval infection, *Journal of invertebrate pathology*, 102 (2009) 129-132.
- [61] T. Erban, J. Zitek, M. Bodrinova, P. Talacko, M. Bartos, J. Hrabak, Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV *Paenibacillus* larvae genotypes reveals a wide range of virulence factors, *Virulence*, 10 (2019) 363-375.
- [62] K. Antunez, D. Arredondo, M. Anido, P. Zunino, Metalloprotease production by *Paenibacillus* larvae during the infection of honeybee larvae, *Microbiology*, 157 (2011) 1474-1480.
- [63] S. Sood, H. Steinmetz, H. Beims, K.I. Mohr, M. Stadler, M. Djukic, W. von der Ohe, M. Steinert, R. Daniel, R. Müller, Paenilarvins: iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae, *Chembiochem*, 15 (2014) 1947-1955.
- [64] K. Antúnez, M. Anido, D. Arredondo, J.D. Evans, P. Zunino, *Paenibacillus* larvae enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection, *Veterinary microbiology*, 147 (2011) 83-89.
- [65] G. Hertlein, S. Müller, E. Garcia-Gonzalez, L. Poppinga, R.D. Süssmuth, E. Genersch, Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae, *PLoS One*, 9 (2014) e108272.

- [66] B. Erdem, Mikrobiyal sideroforlar ve biyoteknolojideki uygulama alanları, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (2013) 77-88.
- [67] E. Garcia-Gonzalez, S. Müller, G. Hertlein, N. Heid, R.D. Süssmuth, E. Genersch, Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*, *Microbiologyopen*, 3 (2014) 642-656.
- [68] Y. Tang, S. Frewert, K. Harmrolfs, J. Herrmann, L. Karmann, U. Kazmaier, L. Xia, Y. Zhang, R. Müller, Heterologous expression of an orphan NRPS gene cluster from *Paenibacillus larvae* in *Escherichia coli* revealed production of sevadicin, *Journal of biotechnology*, 194 (2015) 112-114.
- [69] T. Dang, B. Loll, S. Müller, R. Skobalj, J. Ebeling, T. Bulatov, S. Gensel, J. Göbel, M. Wahl, E. Genersch, Molecular Basis of Antibiotic Self-Resistance in a Bee Larvae Pathogen, *bioRxiv*, (2021).
- [70] M. Turner, O. Tremblay, K.A. Heney, M.R. Lugo, J. Ebeling, E. Genersch, A.R. Merrill, Characterization of C3larvinA, a novel RhoA-targeting ADP-ribosyltransferase toxin produced by the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Bioscience reports*, 40 (2020) BSR20193405.
- [71] H.-A. Schild, S.W. Fuchs, H.B. Bode, B. Grünwald, Low-molecular-weight metabolites secreted by *Paenibacillus larvae* as potential virulence factors of American foulbrood, *Applied and environmental microbiology*, 80 (2014) 2484-2492.
- [72] J. Ebeling, H. Knispel, A. Fünfhaus, E. Genersch, The biological role of the enigmatic C3larvinAB toxin of the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*, *Environmental microbiology*, 21 (2019) 3091-3106.
- [73] U. Riessberger-Galle, W. Von Der Ohe, K. Crailsheim, Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae* larvae, the causative agent of the American foulbrood, *Journal of invertebrate pathology*, 77 (2001) 231-236.
- [74] G. Hertlein, M. Seiffert, S. Gensel, E. Garcia-Gonzalez, J. Ebeling, R. Skobalj, A. Kuthning, R.D. Süssmuth, E. Genersch, Biological role of paenilarvins, iturin-like lipopeptide secondary metabolites produced by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, *PLoS One*, 11 (2016).
- [75] P. Chantawannakul, B.N. Dancer, American foulbrood in honey bees, *Bee World*, 82 (2001) 168-180.
- [76] K. Antúnez, M. Anido, J.D. Evans, P. Zunino, Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Veterinary microbiology*, 141 (2010) 385-389.
- [77] R.S. Cornman, D. Lopez, J.D. Evans, Transcriptional response of honey bee larvae infected with the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, *PLoS One*, 8 (2013) e65424.
- [78] S. Rieg, T.M. Bauer, G. Peyerl-Hoffmann, J. Held, W. Ritter, D. Wagner, W.V. Kern, A. Serr, *Paenibacillus larvae* bacteremia in injection drug users, *Emerging infectious diseases*, 16 (2010) 487.

- [79] E. Genersch, Paenibacillus larvae and American foulbrood—long since known and still surprising, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3 (2008) 429-434.
- [80] A. Lindström, S. Korpela, I. Fries, Horizontal transmission of Paenibacillus larvae spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing, *Apidologie*, 39 (2008) 515-522.
- [81] M. Gillard, J. Charriere, L. Belloy, Distribution of Paenibacillus larvae spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis, *Journal of invertebrate pathology*, 99 (2008) 92-95.
- [82] J.G. Stephan, J.R. De Miranda, E. Forsgren, American foulbrood in a honeybee colony: spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development, *BMC Ecology*, 20 (2020).
- [83] I. Fries, A. Lindström, S. Korpela, Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), *Veterinary microbiology*, 114 (2006) 269-274.
- [84] I. Fries, S. Camazine, Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, *Apidologie*, 32 (2001) 199-214.
- [85] S.F. Pernal, R.L. Albright, A.P. Melathopoulos, Evaluation of the Shaking Technique for the Economic Management of American Foulbrood Disease of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae), *Journal of Economic Entomology*, 101 (2008) 1095-1104.
- [86] A. Ashiralieva, E. Genersch, Reclassification, genotypes and virulence of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees—a review, *Apidologie*, 37 (2006) 411-420.
- [87] B. Locke, M. Low, E. Forsgren, An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation, *Preventive Veterinary Medicine*, 167 (2019) 48-52.
- [88] R.M. Alonso-Salces, N.M. Cugnata, E. Guaspari, M.C. Pellegrini, I. Aubone, F.G. De Piano, K. Antunez, S.R. Fuselli, Natural strategies for the control of Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review, *Apidologie*, 48 (2017) 387-400.
- [89] M. Del Hoyo, M. Basualdo, A. Lorenzo, M. Palacio, E. Rodriguez, E. Bedascarrasbure, Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on Paenibacillus larvae spore loads, *Journal of Apicultural Research*, 40 (2001) 65-69.
- [90] H. Hansen, C.J. Brødsgaard, Control of American foulbrood by the shaking method, *Apiacta*, 38 (2003) 140-145.
- [91] P. Elzen, D. Westervelt, D. Causey, J. Ellis, H. Hepburn, P. Neumann, Method of application of tylosin, an antibiotic for American foulbrood control, with effects on small hive beetle (Coleoptera: Nitidulidae) populations, *Journal of Economic Entomology*, 95 (2002) 1119-1122.

- [92] J. Pettis, J. Kochansky, M. Feldlaufer, Larval *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) mortality after topical application of antibiotics and dusts, *Journal of economic entomology*, 97 (2004) 171-176.
- [93] A.M. Alippi, G.N. Albo, F.J. Reynaldi, M.R. De Giusti, In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin, *Veterinary microbiology*, 109 (2005) 47-55.
- [94] L. Bulson, M.A. Becher, T.J. McKinley, L. Wilfert, Long term effects of antibiotic treatments on honeybee colony fitness: A modelling approach, *J. Appl. Ecol.*, 58 (2021) 70-79.
- [95] J.D. Evans, Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, *Journal of invertebrate pathology*, 83 (2003) 46-50.
- [96] Ž. Bargańska, J. Namieśnik, M. Ślebioda, Determination of antibiotic residues in honey, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 1035-1041.
- [97] R.S. Borba, M. Spivak, Propolis envelope in *Apis mellifera* colonies supports honey bees against the pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Scientific reports*, 7 (2017) 1-6.
- [98] L. Gende, A. Satta, V. Ligios, L. Ruiu, F. Buffa, N. Fernandez, S. Churio, M. Eguaras, M. Fiori, I. Floris, Searching for an American foulbrood early detection threshold by the determination of *Paenibacillus larvae* spore load in worker honey bees, *Bulletin of insectology*, 64 (2011) 229-233.
- [99] J. Kochansky, J. Pettis, Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood, *Journal of apicultural research*, 44 (2005) 24-28.
- [100] C.M. Mihai, L.A. Mărghitaș, D.S. Dezmirean, F. Chirilă, R.F. Moritz, H. Schlüns, Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 110 (2012) 68-72.
- [101] A. Özkırım, N. Keskin, M. Kürkçüoğlu, K.H.C. Başer, Evaluation of some essential oils as alternative antibiotics against American foulbrood agent *Paenibacillus larvae* on honey bees *Apis mellifera* L, *Journal of Essential Oil Research*, 24 (2012) 465-470.
- [102] A.M. Alippi, A.C. López, F.J. Reynaldi, D.H. Grasso, O.M. Aguilar, Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees, *Veterinary microbiology*, 125 (2007) 290-303.
- [103] K. Kuzyšinová, D. Mudroňová, J. Toporčák, L. Molnár, P. Javorský, The use of probiotics, essential oils and fatty acids in the control of American foulbrood and other bee diseases, *Journal of Apicultural Research*, 55 (2016) 386-395.
- [104] S.R. Fuselli, S.B.G. de la Rosa, M.J. Eguaras, R. Fritz, 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*, 24 (2008) 2067-2072.

- [105] M. Maggi, L. Gende, K. Russo, R. Fritz, M. Eguaras, Bioactivity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus* larvae related to the drying treatment of the plant material, *Natural product research*, 25 (2011) 397-406.
- [106] N. Roussenova, Antibacterial activity of essential oils against the etiological agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus* larvae), *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14 (2011) 17-24.
- [107] P. Giménez-Martínez, M. Ramírez-Ambrosi, M.A.-S. Rosa, B. Gallo, A.B. Luis, M. Maggi, S. Fuselli, Antimicrobial activity of phenolic extract of apple pomace against *Paenibacillus* larvae and its toxicity on *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Science*, 64 (2020) 199-208.
- [108] N. Szawarski, P.G. Martínez, G. Mitton, P. Negri, F.M. Arcerito, M.P. Moliné, S.R. Fuselli, M.J. Eguaras, L. Lamattina, M. Maggi, Antimicrobial activity of indoleacetic, gibberellic and coumaric acids against *Paenibacillus* larvae and its toxicity against *Apis mellifera*, *Spanish journal of agricultural research*, 18 (2020) 501.
- [109] N. Szawarski, P. Giménez-Martínez, G. Mitton, P. Negri, F. Meroi Arcerito, M.P. Moliné, S. Fuselli, M. Eguaras, L. Lamattina, M. Maggi, Short communication: Antimicrobial activity of indoleacetic, gibberellic and coumaric acids against *Paenibacillus* larvae and its toxicity against *Apis mellifera*, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18 (2020).
- [110] P. Giménez-Martínez, M. Ramírez-Ambrosi, R.M. Alonso-Salces, B. Gallo, L.A. Berrueta, M. Maggi, S. Fuselli, Antimicrobial Activity of Phenolic Extract of Apple Pomace against *Paenibacillus* larvae and its Toxicity on *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Science*, (2020).
- [111] A. Oliveira, M. Leite, L.D. Kluskens, S.B. Santos, L.D. Melo, J. Azeredo, The first *Paenibacillus* larvae bacteriophage endolysin (PlyPI23) with high potential to control American foulbrood, *PLoS One*, 10 (2015).
- [112] L.Q. Lopes, C.G. Santos, R. de Almeida Vaucher, L. Gende, R.P. Raffin, R.C. Santos, Evaluation of antimicrobial activity of glycerol monolaurate nanocapsules against American foulbrood disease agent and toxicity on bees, *Microbial pathogenesis*, 97 (2016) 183-188.
- [113] K. Sorkun, B. Yılmaz, A. Özkırım, A. Özkök, Ö. Gençay, *Yaşam İçin Arılar*, Önder Matbaa, Ankara, 2014.
- [114] A. Özkırım, B. Küçüközmen, Ö.G. Çelemlı, Impact of sterilization process on chemical composition and antimicrobial activity of propolis, *Journal of Apicultural Research*, 58 (2019) 780-787.
- [115] L. Petruzzi, M. Rosaria Corbo, D. Campaniello, B. Speranza, M. Sinigaglia, A. Bevilacqua, Antifungal and antibacterial effect of propolis: a comparative hit for food-borne pseudomonas, enterobacteriaceae and fungi, *Foods*, 9 (2020) 559.
- [116] K. Bilikova, M. Popova, B. Trusheva, V. Bankova, New anti-*Paenibacillus* larvae substances purified from propolis, *Apidologie*, 44 (2013) 278-285.

- [117] M. Simone-Finstrom, R.S. Borba, M. Wilson, M. Spivak, Propolis counteracts some threats to honey bee health, *Insects*, 8 (2017) 46.
- [118] S. Park, J. Kim, Y.-K. Shin, K.-Y. Kim, Antimicrobial activity of 4-hydroxyderricin, sophoraflavanone G, acetylshikonin, and kurarinone against the bee pathogenic bacteria *Paenibacillus* larvae and *Melissococcus plutonius*, *Journal of Apicultural Research*, 60 (2021) 118-122.
- [119] V. Bankova, D. Bertelli, R. Borba, B.J. Conti, I.B. da Silva Cunha, C. Danert, M.N. Eberlin, S. I Falcão, M.I. Isla, M.I.N. Moreno, Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, *Journal of Apicultural Research*, 58 (2019) 1-49.
- [120] M. Wilson, D. Brinkman, M. Spivak, G. Gardner, J. Cohen, Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*, *Journal of invertebrate pathology*, 124 (2015) 44-50.
- [121] A. Özkırım, Ö.G. Çelemlı, A. Schiesser, L. Charistos, F. Hatjina, A comparison of the activities of Greek and Turkish propolis against *Paenibacillus* larvae, *Journal of Apicultural Research*, 53 (2014) 528-536.
- [122] K. Antúnez, J. Harriet, L. Gende, M. Maggi, M. Eguaras, P. Zunino, Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood, *Veterinary microbiology*, 131 (2008) 324-331.
- [123] M.F. Fangio, D.E. Orallo, L.B. Gende, M.S. Churio, Chemical characterization and antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae of propolis from Buenos Aires province, Argentina, *Journal of Apicultural Research*, 58 (2019) 626-638.
- [124] M.J. Park, B.Y. Kim, H.G. Park, Y. Deng, H.J. Yoon, Y.S. Choi, K.S. Lee, B.R. Jin, Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22 (2019) 684-689.
- [125] M.A. Hornitzky, The pathogenicity of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly, *Journal of apicultural research*, 37 (1998) 267-271.
- [126] K. Bíliková, G. Wu, J. Šimúth, Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor, *Apidologie*, 32 (2001) 275-283.
- [127] N.T. Williams, Probiotics, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67 (2010) 449-458.
- [128] M. Iorizzo, B. Testa, S.J. Lombardi, S. Ganassi, M. Ianiro, F. Letizia, M. Succi, P. Tremonte, F. Vergalito, A. Cozzolino, Antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: Potential benefits for honeybee health, *Antibiotics*, 9 (2020) 442.
- [129] A.M. Alippi, F.J. Reynaldi, 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 (2006) 141-146.

- [130] M. Yoshiyama, K. Kimura, Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood, *Journal of Invertebrate Pathology*, 102 (2009) 91-96.
- [131] E. Forsgren, T.C. Olofsson, A. Vázquez, I. Fries, Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae, *Apidologie*, 41 (2010) 99-108.
- [132] S. Lamei, J.G. Stephan, B. Nilson, S. Sieuwerts, K. Riesbeck, J.R. de Miranda, E. Forsgren, Feeding honeybee colonies with honeybee-specific lactic acid bacteria (Hbs-LAB) does not affect colony-level Hbs-LAB composition or *Paenibacillus* larvae spore levels, although American Foulbrood affected colonies harbor a more diverse Hbs-LAB community, *Microbial ecology*, (2019) 1-13.
- [133] B.A. Daisley, A.P. Pitek, J.A. Chmiel, K.F. Al, A.M. Chernyshova, K.M. Faragalla, J.P. Burton, G.J. Thompson, G. Reid, Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus* larvae infection in honey bees, *The ISME Journal*, 14 (2020) 476-491.
- [134] K.J. Grubbs, D.S. May, J.A. Sardina, R.K. Dermenjian, T.P. Wyche, A.A. Pinto-Tomás, J. Clardy, C.R. Currie, Pollen *Streptomyces* Produce Antibiotic That Inhibits the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus* larvae, *Frontiers in Microbiology*, 12 (2021).
- [135] A.M. Lazzeri, N.P. Mangia, M.E. Mura, I. Floris, A. Satta, L. Ruiu, Potential of novel food-borne *Lactobacillus* isolates against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae, *Biocontrol Science and Technology*, 30 (2020) 897-908.
- [136] S.T. Abedon, S.J. Kuhl, B.G. Blasdel, E.M. Kutter, Phage treatment of human infections, *Bacteriophage*, 1 (2011) 66-85.
- [137] R. Johnson, C. Gyles, W. Huff, S. Ojha, G. Huff, N. Rath, A. Donoghue, Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs, *Animal Health Research Reviews*, 9 (2008) 201-215.
- [138] P.K. Tsourkas, *Paenibacillus* larvae bacteriophages: Obscure past, promising future, *Microbial genomics*, 6 (2020).
- [139] H. Beims, J. Wittmann, B. Bunk, C. Spröer, C. Rohde, G. Günther, M. Rohde, W. von der Ohe, M. Steinert, *Paenibacillus* larvae-directed bacteriophage HB10c2 and its application in American foulbrood-affected honey bee larvae, *Applied and environmental microbiology*, 81 (2015) 5411-5419.
- [140] D.Y. Aydoğan, H.H. Hadimli, Bakteriyofaj tedavisi, *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27 (2016) 38-47.
- [141] E. Jończyk-Matysiak, E. Popiela, B. Owczarek, K. Hodyra-Stefaniak, K. Światała-Jeleń, N. Łodej, D. Kula, J. Neuberg, P. Migdał, N. Bagińska, Phages in Therapy and Prophylaxis of American Foulbrood—Recent Implications From Practical Applications, *Frontiers in microbiology*, 11 (2020) 1913.
- [142] T.S. Brady, B.D. Merrill, J.A. Hilton, A.M. Payne, M.B. Stephenson, S. Hope, Bacteriophages as an alternative to conventional antibiotic use for the prevention or treatment of *Paenibacillus* larvae in honeybee hives, *Journal of invertebrate pathology*, 150 (2017) 94-100.

- [143] S.B. Santos, A. Oliveira, L.D. Melo, J. Azeredo, Identification of the first endolysin Cell Binding Domain (CBD) targeting *Paenibacillus* larvae, *Scientific reports*, 9 (2019) 1-9.
- [144] S. Ghorbani-Nezami, L. LeBlanc, D.G. Yost, P.S. Amy, Phage therapy is effective in protecting honeybee larvae from American foulbrood disease, *Journal of Insect Science*, 15 (2015).
- [145] D.G. Yost, P. Tsourkas, P.S. Amy, Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood disease, *Bacteriophage*, 6 (2016) e1122698.
- [146] E. Jończyk-Matysiak, E. Popiela, B. Owczarek, K. Hodyra-Stefaniak, K. Świtła-Jeleń, N. Łodej, D. Kula, J. Neuberg, P. Migdał, N. Bagińska, F. Orwat, B. Weber-Dąbrowska, A. Roman, A. Górski, Phages in Therapy and Prophylaxis of American Foulbrood – Recent Implications From Practical Applications, *Frontiers in Microbiology*, 11 (2020).
- [147] H. Oliveira, L.D. Melo, S.B. Santos, F.L. Nóbrega, E.C. Ferreira, N. Cerca, J. Azeredo, L.D. Kluskens, Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins, *Journal of virology*, 87 (2013) 4558-4570.
- [148] M.A. Sheflo, A.V. Gardner, B.D. Merrill, J.N. Fisher, B.L. Lunt, D.P. Breakwell, J.H. Grose, S.H. Burnett, Complete genome sequences of five *Paenibacillus* larvae bacteriophages, *Genome announcements*, 1 (2013) e00668-00613.
- [149] C.A. Dos Santos, M.M. Seckler, A.P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, M. Rai, Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues, *Journal of pharmaceutical sciences*, 103 (2014) 1931-1944.
- [150] R. de Almeida Vaucher, J.L. Giongo, L.P. Bolzan, M.S. Côrrea, V.P. Fausto, C.F. dos Santos Alves, L.Q.S. Lopes, A.A. Boligon, M.L. Athayde, A.P. Moreira, Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18 (2015) 205-210.
- [151] J. Dibner, P. Buttin, Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism, *Journal of Applied Poultry Research*, 11 (2002) 453-463.
- [152] H. Kaya, A. Kaya, M. Gül, Ş. Çelebi, S. Timurkaan, B. Apaydın, Effects of supplementation of different levels of organic acids mixture to the diet on performance, egg quality parameters, serum traits and histological criteria of laying hens, *Europ Poult Sci*, 78 (2014) 1-12.
- [153] A. Imdorf, J.-D. Charriere, C. Maqueln, V. Kilchenmann, B. Bachofen, Alternative varroa control, *American Bee Journal*, 136 (1996) 189-194.
- [154] N. Gunes, L. Aydın, D. Belenli, J.M. Hranitz, S. Mengilig, S. Selova, Stress responses of honey bees to organic acid and essential oil treatments against varroa mites, *Journal of Apicultural Research*, 56 (2017) 175-181.

- [155] V. Dietemann, J. Pflugfelder, D. Anderson, J.-D. Charrière, N. Chejanovsky, B. Dainat, J. de Miranda, K. Delaplane, F.-X. Dillier, S. Fuch, *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control, *Journal of Apicultural Research*, 51 (2012) 125-132.
- [156] L. Aydın, *Varroa destructor*'un Kontrolünde Yeni Stratejiler, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 5 (2005) 59-63.
- [157] F. Özçelik, Mikroorganizma Kültürlerini Muhafaza Yöntemler.
- [158] S. Tejero-Sariñena, J. Barlow, A. Costabile, G.R. Gibson, I. Rowland, In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids, *Anaerobe*, 18 (2012) 530-538.
- [159] E. Peh, S. Kittler, F. Reich, C. Kehrenberg, Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations—A synergistic effect?, *Plos one*, 15 (2020).
- [160] C. Cherrington, M. Hinton, G. Mead, I. Chopra, Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications, *Advances in microbial physiology*, 32 (1991) 87-108.
- [161] M. Cruz-Romero, T. Murphy, M. Morris, E. Cummins, J. Kerry, Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications, *Food Control*, 34 (2013) 393-397.