

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAL PETEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN SPORLU BASİLLERİN
KARAKTERİZASYONU ve ANTİMİKROBİYAL
DUYARLILIKLARI

YILDIZ BAŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU

TEZ JURİLERİ
PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI
YRD. DOÇ. DR. AYDIN KILIÇ




YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2015
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAL PETEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN SPORLU BASİLLERİN
KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında Yıldız BAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/10/2015 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Aydın KILIÇ	


Prof. Dr. Selami SAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bal peteklerinden izole edilen sporlu basillerin karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıkları'nın araştırıldığı bu çalışma, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Arı yetiştiricilerinin en büyük sorunlarından biri olan Amerikan yavru çürüklüğü hastalığı konusuna ışık tutacak bu çalışmayı yapma olanağı sağlayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez aşamasının her anında önerileri ve paylaşımlarıyla yardımını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımnda her zaman yanımda olan güler yüzleri ile yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arif BOZDEVECİ, Emel UZUNALİOĞLU ve Ülkü Zeynep ÜREYEN'e, çalışmamın moleküler tanımlama kısmında sabırla ve titizlikle yardımcı olan arkadaşım Meryem DEMİRCİ ve değerli hocam Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Numune sağlanmasında Rize Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğüne ve Samsun Veterinerlik Araştırma Enstitüsü'ne ayrıca bitki ekstraktlarının temininde emeği geçen KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Arş. Gör. Gonca TOSUN'a, Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Nurettin YAYLI hocama teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, verdiğim kararlarda desteklerini her zaman arkamda hissettiğim maddi ve manevi yanımda olan canım ailem; babam İsmail Hakkı, annem Emine, ağabeylerim Resul ve Murat YILMAZ'a, kayınvalidem Fatma ve sevgili eşim Adem BAŞ'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Vagıf ATAMOV'a da teşekkürlerimi sunarım.

Yıldız BAŞ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “**Bal Peteklerinden İzole Edilen Sporlu Basillerin Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları**” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim 01/10/2015

Yıldız BAŞ

***Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

BAL PETEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN SPORLU BASİLLERİN KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI

Yıldız BAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Çalışmada, Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı şüpheli peteklerde, etken mikroorganizmaların (*Paenibacillus larvae*) izolasyonu, geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, antibiyotik direnci ve bitki ekstraktlarına olan duyarlılıklarının belirlenmesi planlanmıştır. Mikroorganizmaların üretimi için Mueller–Hinton, maya ekstresi, potasyum fosfat, glukoz ve sodyum piruvat besiyerleri (MYPGP) kullanıldı. Alınan 9 örnekten toplam 21 adet Gram pozitif basil izole edildi. İzolatların tanısı için bir dizi fiziksel ve biyokimyasal testler yapıldı. Geleneksel yöntemde yapılan tanıyı doğrulamak için 16S rRNA ITS gen bölgesi sekans analizi metodu kullanılarak moleküler tanı yapıldı ve soy ağacı oluşturuldu. İzolatların 9'u *Paenibacillus larvae*, 7'si *Paenibacillus* sp. ve 3'ü *Bacillus* sp. olarak tanımlandı. Geleneksel tanımlamada iki suş (PB2a ve PB3.2b2) *Bacillus* sp. olarak tanımlanırken, moleküler yöntemle *Paenibacillus* sp. olarak doğrulandı. Üç suшта (PB1b, PB3.3a1 ve PB3.3b) ise cins düzeyinde tanımlama farklı bulundu. Bu şekilde, geleneksel yöntemle de büyük oranda tanımlanabileceği belirlendi. Dokuz örnekten 4'ünde AFB etkeni olan *Paenibacillus larvae* tespit edilmiştir. Suşların antibiyotik direncine bakıldığında iki suşun (PB5b ve PB3.2b2) test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, 3 suş hariç (PB5b, PB2a, PB3.2b2) tümünde çoklu antibiyotik direncin taşıdığı gözlemlendi. *Paenibacillus larvae* suşlarının (9 adet) 6'sında gentamisine, 5'i orta 2'si dirençli olmak üzere amikasin ve 1 suшта trimetoprim/ sulfametoksazol'a karşı orta dirençli olduğu tespit edildi. Toplam 31 farklı bitkiye (8'i çiçekli, 23'ü kara yosunu) ait sulu ve metanol ekstraktları suşlara karşı test edildi. Sulu ekstraktansa metanol ekstraktların daha etkili olduğu belirlendi. En etkili ekstraktın *Thymus cilicicus*, *T. spicata* ve *Clinopodium umbrosum*'a ait oldukları gözlemlendi.

2015, 109 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, *Paenibacillus*, Antibiyogram, Antimikrobiyal Aktivite.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF SPORE-FORMING BACILLI ISOLATED FROM HONEYCOMB

Yıldız BAŞ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Aims of this study are isolation of effective microorganism, identification with conventional and molecular methods, antibiotic resistance, determination of sensitivity of the microorganism to the plant extracts in AFB disease suspected honeycomb. Muller Hinton, Yeast Extract, potassium phosphate, glucose and sodium pyruvate medium (MYPG) was used for the production of microorganisms. Received from the 9 sample total of 21 gram-positive bacilli were isolated. For identification of isolates some physical and biochemical properties were tested. To confirm the diagnosis made in the traditional method, 16S rRNA ITS gene sequence analysis was performed using molecular diagnostic methods and family tree was created. The isolates 9 *P.larvae*, 7 *Paenibacillus* sp. and 3 *Bacillus* sp. were identified. Two strains (Pb2a, Pb3.2b2) were identified as *Bacillus* sp. with traditional identification, but they were identified as *Paenibacillus* sp. with molecular methods. Three strains (PB1b, PB3.3a1 and PB3.3b) were different in the genus level identification. Largely similarity between the molecular diagnosis and conventional diagnosis was observed. 4 of the 9 samples which AFB factors *P.larvae* have been identified. When we look at antibiotic resistance for two strains (PB5b and PB3.2b2) as sensitive to all antibiotics tested, it was observed that in all but three strains (PB5b, PB2a, PB3.2b2) carrying the multiple antibiotics resistance. Six of *Paenibacillus larvae* strains resistance to gentamicin, 5 strains moderate, 2 strains resistance to amikacin and one strain moderately resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole were found. 31 different aqueous and methanol extracts of plants (8 phanerogam, 23 moss) were tested against strains. Methanol extracts was determined to be more effective than the aqueous extracts. *Thymus cilicicus*, *T. spicata* ve *Clinopodium umbrosum* extracts was determined to be the most effective.

2015, 109 page

Keywords: *Bacillus*, *Paenibacillus*, Antibiogram, Antimicrobial Activity.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Arıcılığın Tarihçesi	4
1.3. Arıcılığın Önemi	5
1.4. Dünyada Arıcılık Sektörüne Genel Bakış.....	6
1.5. Türkiye’de Arıcılık Sektörünün Genel Görünümü.....	7
1.6. Bal Arısı’nın Tarihi.....	8
1.7. Bal Arısı Taksonomisi	9
1.8. Bal Arısı Biyolojisi	9
1.8.1. Yumurta	11
1.8.2. Larva	11
1.8.3. Pupa	12
1.8.4. Ergin.....	12
1.9. Bal Arısı Morfolojisi.....	13
1.10. Arı Hastalıkları ve Sınıflandırılması.....	15
1.11. Bal Arısı Yavrularında Hastalık Yapan Gruplar.....	17
1.11.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB).....	17
1.11.2. <i>Paenibacillus larvae</i> ’nın Genel Özellikleri	17
1.11.3. <i>P. larvae</i> ’nın İzolasyonu ve İdentifikasyonu	19
1.11.4. <i>P. larvae</i> ’nın Kültürel Karakteri	19
1.11.5. <i>P. larvae</i> ’nın in Biyokimyasal Karakteri	20
1.11.6. <i>P. larvae</i> ’nın in vitro Sporulasyonu.....	20
1.11.7. <i>P. larvae</i> ’da Antibiyotik Kullanımı	21

1.11.8.	Hastalığın Bulaşma Şekli ve Hayat Evresi	21
1.11.9.	Hastalığın Belirtileri	22
1.11.10.	Hastalığın Önlenmesi.....	23
1.11.11.	Hastalığın Tedavisi	24
1.11.12.	Mücadele Yöntemleri	25
1.11.13.	Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB)	26
1.11.14.	Pudramsı Hastalık (Powdery Scale)	27
1.12.	Literatür Özeti.....	27
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	30
2.1.	Materyal	30
2.1.1.	Çalışma Grubu	30
2.1.2.	Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar	30
2.1.3.	Kullanılan Besiyerleri	31
2.1.3.1.	Mueller-Hinton Broth, Yeast Extract, Potassium Phosphate, Glucose, Pyruvate, Agar ve Broth besiyerleri (MYPGP)	31
2.1.3.2.	Muller Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması	31
2.1.3.3.	Nişasta (Starch) Besiyerinin Hazırlanması	32
2.1.3.4.	Nitrat Besiyerinin Hazırlanması	32
2.1.3.5.	Hareket Besiyerinin Hazırlanması	32
2.1.3.6.	Voges Proskauer Besiyerinin Hazırlanması	33
2.1.3.7.	Eskulin Testi.....	33
2.1.3.8.	Sitrat Agar Besiyerinin Hazırlanması	34
2.1.3.9.	Dehidroksiaseton Besiyerinin Hazırlanması.....	34
2.1.3.10.	Karbonhidratlardan Asit Üretim Testi.....	34
2.1.3.11.	Oksidaz Testi.....	35
2.1.3.12.	Katalaz Testi.....	35
2.1.3.13.	Antibiyogram Besiyeri	35
2.1.3.14.	Antimikrobiyal Aktivite Besiyeri.....	35
2.1.4.	Kullanılan Boyalar ve Ayıraçlar	36
2.1.4.1.	Gram Boyama Seti.....	36
2.1.4.2.	Nitrat Ayıraçları	36
2.1.4.3.	Voges-Proskauer Ayıraçları Hazırlanması	37
2.1.4.4.	Fehling Solüsyon'unun Hazırlanması.....	37

2.2.	Metod	37
2.2.1.	Numunelerin Toplanması	37
2.2.2.	Numunelerin Hazırlanması	38
2.2.3.	MYPGP Agar ve MHA Besiyerlerine Ekim.....	39
2.2.4.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması	39
2.2.5.	Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	39
2.2.5.1.	Gram Boyama	39
2.2.5.2.	Katalaz Testi.....	40
2.2.5.3.	Oksidaz Testi.....	40
2.2.5.4.	Nişasta (Starch) Hidrolizi Testi.....	40
2.2.5.5.	Nitrat Redüksiyon Testi	41
2.2.5.6.	Voges-Proskauer Testi (VP).....	41
2.2.5.7.	Hareket Testi	42
2.2.5.8.	Sitrat Kullanım Testi	42
2.2.5.9.	Farklı Sıcaklıklarda Üreme Özelliği	42
2.2.5.10.	Dihydroxyaceton Testi	42
2.2.5.11.	Karbonhidratlardan Asit Üretme Testi	43
2.2.5.12.	Eskulin Testi.....	43
2.2.6.	Antibiyogram Testi	44
2.2.7.	Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivite Testi.....	45
2.2.7.1.	Bitki Eksraktlarının Temini.....	45
2.2.7.2.	Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	45
2.2.8.	İzolatların Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	46
2.2.8.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	46
2.2.8.2.	Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi	47
2.2.8.3.	16S rRNA Geninin PCR ile Arttırılması.....	47
2.2.8.4.	Veri Analizi	48
3.	BULGULAR	49
3.1.	İzolatların Morfolojik ve Fiziksel Özellikleri	49
3.2.	İzolatların Biyokimyasal Özellikleri.....	54
3.3.	İzolatların Moleküler Özellikleri	57
3.3.1.	Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi	57
3.3.2.	16S rRNA Gen Fragmentlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	57

3.3.3. 16S rRNA Gen Sekanslarının Gen Bank'taki Benzerlikleri.....	58
3.3.4. Filogenetik Ağaç.....	59
3.4. Antibiyogram	62
3.5. Bitki Ekstraktlarının Bakteriyal İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Etkinlikleri	64
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	67
5. ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR	83
EKLER	93
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Eski çağlarda mağara duvaralarında arıcılık figürleri	4
Şekil 2.	Kraliçe arının gelişim evreleri	10
Şekil 3.	İşçi arının gelişim evreleri	10
Şekil 4.	Erkek arının gelişim evreleri	10
Şekil 5.	Yumurtadan olgun larvaya geçiş ve larva görüntüsü.....	12
Şekil 6.	Bal arısı pupa görüntüsü	12
Şekil 7.	Pupa dönemini tamalayarak gözden yeni çıkan bir işçi arı	13
Şekil 8.	Bal Arısı vücut kısımları.....	14
Şekil 9.	Sırasıyla ana arı, işçi arı ve erkek arının baş yapılarının görüntüsü	14
Şekil 10.	Balmumu bezlerinden mum salgılanması	15
Şekil 11.	İşçi arının deriye iğnesini sokması görüntüsü	15
Şekil 12.	<i>Paenibacillus larvae</i> 'nin sırasıyla vejetatif, spor-vejetatif ve spor formlarının görünümü	18
Şekil 13.	Amerikan yavru çürüklüğü hastalığına yakalanmış larva görüntüsü	22
Şekil 14.	Sırasıyla AFB'li peteğin ve kapalı gözlerin görüntüsü.....	23
Şekil 15.	Amerikan yavru çürüklüğü hastalıklı larvalarda sümüksü görünümü.....	23
Şekil 16.	Avrupa yavru çürüklüğü hastalığı'ndan ölmüş larva görüntüsü	27
Şekil 17.	Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı şüpheli petek örnekleri.	38
Şekil 18.	İzolatların petrideki koloni morfolojisi görünümleri.....	51
Şekil 19.	Bazı izolatların Gram boyamada spor ve vejetatif hücre görünümleri.....	52
Şekil 20.	Nişasta hidrolizinin pozitif ve negatif görüntüleri.....	54
Şekil 21.	Dehidroksiaseton testinin görüntüsü.	54
Şekil 22.	Maltoz, glukoz ve laktoz karbonhidratlarından asit üretim testin pozitif ve negatif sonuçları.....	56
Şekil 23.	Bakteriyal izolatların genomik DNA'larının agaroz jelde görünümü.	57
Şekil 24.	Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen fragmentlerinin agaroz jelde görünümü.....	57
Şekil 25.	İzolatların filogenetik ağacı.	61
Şekil 26.	Disk Diffüzyon metoduna göre PB2b'nin bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığı	62
Şekil 27.	Bazı izolatların 12 farklı bitki ekstraktlarına karşı antimikrobiyal etkinlik görüntüleri.	64

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Arıcılık yapan bazı ülkelerinin 2007 yılı koloni sayıları ve bal verimleri.....	6
Tablo 2.	Türkiye’de kovan sayısı, bal üretimi ve ortalama bal verimi.....	8
Tablo 3.	Farklı arı sınıflarının gelişim süreleri.....	10
Tablo 4.	Bal arısı zararlıları.....	16
Tablo 5.	Bal arısında görülen hastalık ve etkenleri.	16
Tablo 6.	<i>Paenibacillus larvae</i> ’nın bazı kimyasal özellikleri.....	43
Tablo 7.	Test edilen antibiyotik diskleri ve içeriği.	44
Tablo 8.	Test edilecek bitki ekstraktlarının isimleri ve konsantrasyonları.	45
Tablo 9.	AFB etkeni düşünülen numuneler, orjinleri ve elde edilen izolatlar....	49
Tablo 10.	İzolatların morfolojik, fiziksel özellikleri.	53
Tablo 11.	Bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri.	55
Tablo 12.	Elde edilen izolatların geleneksel yöntemle göre tür tayini sonuçları....	56
Tablo 13.	Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen benzerlikleri.	58
Tablo 14.	Elde edilen izolatların moleküler yöntemle göre tür tayini sonuçları. ...	60
Tablo 15.	Antibiyotiklerin disk difüzyon metoduyla suşlara karşı gösterdikleri inhibisyon zonu çapları.....	62
Tablo 16.	İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılıkları.	63
Tablo 17.	İzolatların antibiyotik dirençleri ve çoklu antibiyotik direnç profili.....	64
Tablo 18.	Bitki ekstraktlarının bakteriyal izolatlara karşı agar kuyucuk yöntemine göre antimikrobiyal etkinlik zonu çapları.	66

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AFB	Amerikan Yavru Çürüklüğü
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Baz çifti
Cfu	Koloni oluşturabilen birim
Cm	Cantimetre
CMC	Karboksi metil selüloz
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile Su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diaminotetraasetik asit
EFB	Avrupa Yavru Çürüklüğü
EtOH	Etil Alkol
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
G	Gram, Dünyanın yerçekimi ivmesi
kg	Kilogram
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NCBI	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
Ng	Nanogram
NJ	Neighbor-Joining
OTB	Ordu Ticaret Borsası
<i>P. larvae</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>

pH	Hidrojen iyon konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	Saniye
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA (10 mM: 1mM)
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Ünite
UV	Ultra Viyole
V	Volt
vb	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Arıcılık, Anadolu'nun en eski üretim etkinliklerinden biridir. Eskiden sadece aile ihtiyacını karşılayacak balı üretmek için yapılan arıcılık günümüzde ticari bir iş kolu haline gelmiştir. Arılar bir taraftan bal, balmumu, arı sütü, arı zehri, polen ve propolis gibi çok sayıda hayvansal ürünler üretirken, diğer taraftan da tozlaşma yoluyla verimi ve kaliteyi artırarak bitkisel üretimde devamlılığı sağlayan vazgeçilmez üreticilerdir (Erkan ve Aşkın, 2001). Dünya genelinde arı tozlaşması ile elde edilen ürünün o yıl üretilen yıllık balın değerinin 50 katını geçtiğini kaydedilmektedir (Tunca ve Çimrin, 2012).

Arıcılığın özellikle toprağı olmayan ya da az topraklı çiftçilere ek gelir kaynağı yaratması ve aile içerisinde değerlendirilemeyen işgücünün kullanılmasıyla kırsal kesimde yaşayan toplum bireylerinin istihdam ve gelir düzeylerinin artmasına olanak sağlamaktadır. Az sermaye ile çok kar sağlanabilmekte, yatırım bir defa yapıldığında uzun süre işletilebilmektedir. Araziye, suya, gübreye, işletme tesislerine, traktöre ve bunları çalıştıracak işçiye ihtiyaç duyulmamaktadır (Silici ve Özkök, 2011).

Türkiye, TürkVet veri bankasında yer alan arıcılık kayıt sistemine göre 2012 Kasım ayı itibariyle altı milyonu aşan arılı kovan sayısı ile dünya ikinciliğine sahiptir. Bal üretiminde dünya üçüncülüğü bulunan, çam balı üretiminde ise küresel talebin %90'dan fazlasını tek başına karşılayabilen Türkiye, kovan başına düşen verim sıralamasında on ülke arasında son sıralarda yer almaktadır (Konak, 2012). İhraç edilebilen nadir hayvansal gıda türleri arasında bulunan arıcılık ürünleri ülke ekonomisi ve tanıtımı açısından da stratejik öneme sahiptir. Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu bölgeleri başta olmak üzere sahip olduğu toprakların büyük bölümünde dört mevsim arıcılık yapılabilen ender ülkelerden birisi olan Türkiye'de, ne yazık ki verim kayıplarına bağlı düşük kârlılık sebebiyle arıcılıktan beklenen katma değere ulaşılamamaktadır (Karacaoğlu, 2012). Bunun sebepleri ise bilinçsizce yapılan arıcılık, arıcıların yeterince örgütlenmemeleri, bilinçsiz bakım besleme ve ilaç uygulamaları yapılması, ilaç uygulamaları sonucu kalıntı problemleri, arı hastalık ve zararlılarının

yeterince tanınmaması, zamanında teşhis ve tedavinin yapılamaması, mücadele ve korunma yöntemlerinin bilinmemesidir (Borum, 2014).

Bal arısı zararlıları ve hastalıklarının ülkemiz arıcılığının gelişmesine olumsuz etkileri olmuştur. Ülkemize ilk kez 1976 yılında giren *Varroa destructor*'un yaptığı hasar, toplam 600.000 koloni ve 7.000 ton ürünün kaybına yol açmıştır (Kaftanoğlu, 2000). 1988 yılında Avrupa'dan bulaşık ham balmumu ile yurdumuza girdiği bilinen kireç hastalığı (*Ascospheara apis*) bütün bölgelere yayılmış ve ağır koloni kayıplarına neden olmuştur. Arıcıların eğitimi özellikle hastalıklar konusunda bilinçlendirilmesi, hastalıkların yayılmasını engellemesi amacıyla çok önemlidir (Şahinler ve Gül, 2005).

Bakteriler tarafından meydana getirilen arı hastalıkları, özellikle de genç larvaları etkileyenler, önemli yer tutar. Bakteriyel hastalıklar içinde özellikle Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) ve Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) etkenleri arıcılıkta önemli kayıplara yol açmakta, ekonomiye ve arıcılığa büyük zararlar vermektedir (Bailey ve Ball, 1991; Kaftanoğlu vd., 1995; Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı (AFB), bal arılarının larva döneminde görülen, larvaların çürümesi ile ölümüne neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığının etmeni *Paenibacillus larvae* denilen sporlu bir bakteridir. Hastalık sporları ile bulaşık alet ve malzemelerin kullanılması, sağlıklı kolonilerin hastalıklı kolonilerle birleştirilmesi, açıkta yemleme yapılması, hastalıklı kolonilerden alınan bal ile sağlıklı kolonilerin beslenmesi vb. nedenlerle hastalığın yayıldığı düşünülmektedir (Tutkun ve İnci, 1992).

Arıcılık faaliyetleri sonucunda elde edilen ürünlerden biri olan bal, tarih öncesi çağlardan beri kullanılan enerji verici çok değerli bir besin maddesidir (Silici ve Özkök, 2011). Bal; "bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların ya da bitkilerin canlı kısımları ile bazı eşkanatlı böceklerin salgıladığı tatlı maddelerin bal arıları (*Apis mellifera*, *Apis mellifica*) tarafından toplanması, organizmalarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucu meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür" şeklinde tanımlanmaktadır (Hışıl ve Börekçioğlu, 1986).

Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de arıcılıkta kullanılan ilaçların arı ürünlerinde özellikle balda maksimum kalıntı miktarları belirlenmiştir. Ballarda ilaç kalıntıları başlıca iki yoldan kaynaklanır. Bunlardan ilki arı hastalıklarının sağaltımı amacıyla kovanda ilaç uygulanmasıdır. İlaç kalıntısının diğer nedeni zirai mücadelede kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar işçi arıların balın ham maddesi olan bitki özlerini emmesi ile arılar tarafından alınıp kovana getirilir. Bal arılarında bakterilerden ileri gelen hastalıklar (AFB, EFB, Septisemi), mantarlardan ileri gelen hastalıklar (Kireç hastalığı, Taş hastalığı) ve virüslerden ileri gelen hastalıklar (Tulumsu Yavru Çürüklüğü, Kronik Arı Felci Hastalığı) için kullanımına izin verilmiş ilaç etkin maddesi bulunmadığından ruhsatlı bir müstahzar da yoktur. Hastalıklara karşı mücadelede yasal olmayan antibiyotik ve pestisitlerin kullanılması, yasal olarak kullanılmasına müsaade edilen diğer ilaçların bile çok uzun süreli uygulama, doz aşımı, nektar akımı döneminde uygulama (uygulamadan hemen sonra bal hasadı) gibi işlemler sonucunda insanların tüketimine sunulan balda arzu edilmeyen bulaşmaların olmasına neden olmaktadır. Ayrıca ülkemizde peteklerin korunması için naftalin uygulaması da balda istenmeyen kalıntıya yol açmaktadır. Balın bu şekilde bulaşması saf, doğal ürün özelliğinin kaybolmasına ve tüketicilerin ilgisinin azalmasına yol açmaktadır. Balda yaşanan kalıntı sorunu balın ihracını da güçleştirmektedir (Akpınar, 2011).

Balda kalıntı problemleri başında; ruhsatlı-ruhsatsız bazı ilaçlar (özellikle antibiyotikler), pestisid (zirai ilaç kalıntıları), ağır metal ve naftalin kalıntısı vb. gibi etkenler öne çıkmaktadır. Örnek olarak arı ürünlerinde kloramfenikol, nitrofuranlar, antibakteriyel maddelerin (tetracycline, oxytetracycline, sulfanamidler vb.) varlığının teyidi kalıntı kabul edilmektedir (Akpınar, 2011).

Arılarda hastalık etkenlerine karşı kimyasal ilaçların kullanımının kalıntı bırakması nedeniyle kısıtlanması, bu hastalık etkenlerine karşı yeni çözüm önerilerinin aranmasına neden olmuştur. Bu nedenle birçok bilim insanı doğal etkenlerin arı hastalıklarında kullanımı yollarını araştırmaktadır. Bu amaca yönelik en uygun materyal bal üretiminde hammadde olan bitkilerdir. Arının özellikle bal yapmak için kullandığı bitkileri acaba hastalık etkenlerine karşı çözüm oluşturabilir mi sorusunun cevabı olumlu olup bu konuda çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Çalışmamızda bölgemizde yapılan arıcılığa bilimsel katkı sağlamak ve sorunlarını yerinde tespit ederek muhtemel çözüm önerilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda AFB şüpheli örneklerin toplanması, etken mikroorganizmaların izolasyon, tanımlanması, daha sonra bu etkenlere karşı yaygın kullanıldığı düşünülen antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi ve potansiyel mikrobiyal ajan olarak kullanılacak bitkisel kökenli doğal antimikrobiyal etkenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Arıcılığın Tarihçesi

Arıcılık tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Bal arısının yaptığı bal ilk çağlardan beri insanoglu için en önemli besin kaynaklarından birisidir. İspanya’da bir mağarada bulunan resim, kayaya halatlarla tırmanan bir insanı ve kaya üzerinde çizilen deliğin etrafında arıların var olduğunu göstermektedir (Şekil 1). Bu resim bize arıcılığın ilk çağlardan beri yapıldığını doğrulamaktadır (Ergün, 2003). Arıcılığın başlangıcı hakkında Avrupa ile ilgili ise fazla bir bilgi yoktur; ancak Orta Dogu’da Mezopotamya’da ve Afrika’da Eski Mısır’da önemli bir faaliyet olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 1. Eski çağlarda mağara duvarlarında arıcılık figürleri (URL- 1).

Arkeolojik bulgulara göre, arının ilk kültüre alındığı yer Eski Mısır’dır. İsa’dan Önce (İ.Ö.) 5000 yılından başlayarak toprak kapların kovan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bugün de buralarda ve Afrika’da benzer kaplarda arıcılık yapıldığı görülmektedir. Gelişim sürecinde toplumlar yerleşik düzene geçerken ve tarım tekniklerini geliştirirken, arılar için de daha uygun barınma gereçlerini bulmuşlardır. Sepet kovanlarında İ.Ö. 3000–2000 yıllarına ait örnekleri hem orta doğuda hem de Avrupa’da bulunmaktadır. Sepet kovanlar yapılış özellikleri ile arı kolonleri için çok uygun bir yaşam ortamı sağlamaktadır ve günümüzde de özellikle Anadolu ve uzantısı

topraklarda kullanılmaktadır. Arıcılıkta ilk duman uygulaması Eski Mısır'da, kolonilerin dışarıdan beslenmesi ise Romalılar zamanında yapılmıştır (Fıratlı ve Gençler, 1995).

Arıcılık ilkel koşul ve anlayıştan günümüz modern koşul ve anlayışına gelene kadar çeşitli aşamalardan geçmiştir. Günümüz arıcılığına gelene kadar yaşanan süreç veya arıcılığın kronolojisi;

- 1787 yılında ana arının havada çiftleştiği,
- 1845 yılında arı üreme biyolojisinin izahı,
- 1851 yılında çerçeveli fenni kovan keşfi,
- 1857 yılında temel petek kalıpları bulunuşu,
- 1865 yılında bal süzme makinesi icatı,
- 1882 yılında larva transfer yöntemiyle ana arı yetiştirme tekniğinin keşfi,
- 1926 yılında ana arılardan yapay dölleme yolunun bulunuşu şeklindedir.

Günümüzde artık “Teknik Arıcılık” rağbet görmekte olup bu yöntem, arıları kullanabilme ve yönetebilme sanatı olarak tanımlanmaktadır. Teknik arıcılıkta bilgi ve tecrübe çok önemli olup, ikisinin aynı anda kullanılması amaca daha etkin ulaşılmasını sağlamaktadır (OTB, 2013).

1.3. Arıcılığın Önemi

Arıcılık özellikle gelir durumu düşük, az topraklı veya topraksız orman içi veya orman kenarı köylülere gelir sağlanması açısından önemli bir tarımsal faaliyettir. Ayrıca fazla sermaye ve işgücü gerektirmemesi aynı zamanda herkesin yapabileceği, aile iş gücünün en iyi değerlendirilebileceği kısa zamanda gelir getirebilen bir uğraşı olması bakımından da sosyo-ekonomik bir önem taşımaktadır. İşlenmeyen tarımsal alanların değerlendirilmesi ve polinasyona katkı sağlaması sonucu çevresel sürdürülebilirliğe katkı sağlamaktadır. Ayrıca balın yüksek besin içerikli gıda olması ve alternatif tıbbi uygulamalara materyal olması açısından da ilgi çekmektedir (OTB, 2013).

1.4. Dünyada Arıcılık Sektörüne Genel Bakış

Yirminci yüzyılın ortalarından başlayarak çerçevesi kovan kullanımının yaygınlaşması, çağdaş arıcılık tekniklerinin benimsenerek uygulanması ve dünyada değişen ekonomik anlayışlar sonucu hem koloni sayısı hem de bal üretimi 1980’li yıllara kadar sürekli artmıştır. Seksenli yıllardan sonra bal üretiminde önde gelen ülkelerden Çin başta olmak üzere ABD, Arjantin ve Meksika’da koloni sayılarının azalması ya da sabit kalmasına karşın bu ülkelerde üretim artmaya devam etmiştir. Buna karşın, başta Afrika ülkelerinde olmak üzere 1990’lı yıllara kadar süren hızlı artış sonucu dünya koloni sayısı 60 milyonlara çıkmış, bu tarihten sonra hız kesmiş, 2000’li yıllarda 59-63 milyon aralığında seyretmiştir (Fıratlı vd., 2010).

Dünyanın önde gelen arıcılık ülkeleri arasında Gıda ve Tarım Örgütünün (FAO) 2007 yılı raporuna göre koloni sayısında ilk sırayı 7 milyon koloni ile Çin birinci, 4 milyon koloni ile Türkiye ikinci sırada yer almakta, ardından da Etiyopya, İran ve Arjantin’nin geldiğini bildirmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Arıcılık yapan bazı ülkelerinin 2007 yılı koloni sayıları ve bal verimleri (URL-12).

Ülkeler	Koloni Sayısı	Ülkeler	Bal Üretimi (ton)	Ülkeler	Verim (kg)
1.Çin	7 407 000	1.Çin	303 220	1.Kanada	56,68
2.Türkiye	4 825 596	2. Arjantin	81 000	2.Avustralya	48,91
3.Etiyopya	4 800 000	3.Türkiye	73 935	3.Çin	40,93
4.İran	3 500 000	4.ABD	67 286	4.Brezilya	40,87
5.Arjantin	2 970 000	5.Meksika	55 459	5.Meksika	30,18
6.Tanzanya	2 700 000	6.Etiyopya	44 000	6.ABD	28,03
7.Kenya	2 500 000	7.İran	36 000	7.Arjantin	27,27
8.İspanya	2 500 000	8.Brezilya	34 747	8.Romanya	18,81
9.ABD	2 400 000	9.Kanada	31 489	9.Almanya	17,77
10.Meksika	1 800 000	10.İspanya	31 256	10.Fransa	15,76
11.Polonya	1 450 000	11.Tanzanya	27 000	11.Türkiye	15,32
12.Yunanistan	1 315 000	12.Kenya	25 000	12.Yunanistan	13,45
13.Fransa	1 014 820	13.Avustralya	18 000	13.İtalya	12,76
14.İtalya	940 000	14.Yunanistan	17 690	14.İspanya	12,50
15.Almanya	900 000	15.Romanya	16 767	15.Polonya	10,31
16.Romanya	891 043	16.Almanya	16 000	16.İran	10,28
17.Brezilya	850 000	17.Fransa	16 000	17.Kenya	10,00
18.Kanada	555 471	18.Polonya	14 954	18.Tanzanya	10,00
19.Avustralya	368 000	19.İtalya	12 000	19.Etiyopya	9,16
Dünya	63 540 145	Dünya	1 400 491	Dünya	22,04

Bu sıralamadaki ilk üç ülke dünya toplam arı kolonisi varlığının %25'ine sahiptir. Bal üretiminde ise ilk sırayı Çin alamakta (303 bin ton), sonra Arjantin (81 bin ton) ve üçüncü sırada Türkiye (73 bin ton) gelmektedir. Türkiye bu potansiyeli ile dünyada önemli bir arıcılık ülkesi ve bal üreticisi konumundadır (Fıratlı vd., 2010). Bal verimi Çin, Arjantin, ABD, Meksika, Kanada, Brezilya ve Avustralya'da dünya ortalamasının üzerinde olup 30-60 kg arasındadır. Ülkemizde bal verimi yaklaşık olarak 15 kg olup, dünya ortalamasından (22 kg) oldukça düşük olmakla birlikte, Avrupa Birliği (AB) ülkelerindeki ortalama değerlerine benzerlik göstermektedir (Fıratlı vd., 2010).

1.5. Türkiye'de Arıcılık Sektörünün Genel Görünümü

Türkiye'nin coğrafi konumu, ekolojisi, nektar-polen sağlayan zengin bitki varlığı ve arı materyalinin genetik yapısıyla önemli bir potansiyel oluşmakla birlikte, arı yetiştiriciliğinde yaşanan birçok sorun nedeniyle istenilen verim düzeyine ulaşamamıştır. Arıcılığın temel sorunlarının başında eğitim, damızlık temini ve arı sağlığı konuları gelmektedir. Arıcılık konusunda teknik ve yardımcı eleman eksikliği, yapılan araştırmaların uygulama alanına aktarılamamış olması, yayın eksikliği, pazarlama ve üretimde organizasyonun kurulamamış olması, arı hastalıkları konusunda yeterince arıcıların bilgilendirilmemesi gibi eksiklikler ülke arıcılığını büyük bir boşluk içerisinde bırakmaktadır (Günaydın, 2008).

Son yıllarda önemli gelişmeler gösterse de koloni başına verimdeki artış hızı istenilen düzeyde gerçekleşmemiştir. Kovan sayısına bakıldığında ise yıllar itibariyle sürekli artış göstermektedir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2013 yılı itibariyle ülkemizde koloni sayısı 6.641.348 adet olduğu bildirilmektedir (Tablo 2). Koloni varlığı 1991 yılında 3.428.444 adet, 2000 yılında 4.267.123 iken 2005 yılında büyük artış göstermemekle birlikte 4.509.013'e yükselmiştir.

Yanlış arıcılık uygulamaları, hastalıklar ve değişen iklim koşulları nedeni ile 2007 yılında kitlesel arı ölümleri gerçekleşmiş, dolayısıyla bal üretimi yaklaşık 10.000 ton azalarak 73.935 tona düşmüştür. Bu veriler 2013 yılında 94.694 ton, verimlilik 14,3 kg olarak gerçekleşmiştir (URL-13).

Tablo 2. Türkiye’de kovan sayısı, bal üretimi ve ortalama bal verimi (URL-13).

Yıllar	Arıcılık Yapılan Köy Sayısı (adet)	Yeni Kovan (adet)	Eski Kovan (adet)	Bal (ton)	Verim (kg)
1991	21 540	3 161 583	266 859	54 655	15,9
1992	21 931	3 289 672	250 656	60 318	17,0
1993	21 975	3 450 755	234 692	59 207	16,1
1994	22 050	3 567 352	219 236	54 908	14,5
1995	21 987	3 701 444	214 594	68 620	17,5
1996	22 329	3 747 578	217 140	62 950	15,9
1997	22 145	3 798 200	204 102	63 319	15,8
1998	22 302	4 005 369	193 982	67 490	16,1
1999	22 447	4 135 781	185 915	67 259	15,6
2000	22 571	4 067 514	199 609	61 091	14,3
2001	22 606	3 931 301	184 052	60 190	14,6
2002	22 423	3 980 660	180 232	74 554	17,9
2003	22 110	4 098 315	190 538	69 540	16,2
2004	22 133	4 237 065	162 660	73 929	16,8
2005	22 550	4 432 954	157 059	82 336	17,9
2006	22 305	4 704 733	146 950	83 842	17,3
2007	21 560	4 690 278	135 318	73 935	15,3
2008	21 093	4 750 998	137 963	81 364	16,6
2009	21 469	5 210 481	128 743	82 003	15,3
2010	20 845	5 465 669	137 000	81 115	14,5
2011	21 131	5 862 312	149 020	94 245	15,7
2012	21 307	6 191 232	156 777	89 162	14,1
2013	79 934*	6 458 083	183 265	94 694	14,3

*Arıcılık yapan köy sayısı 2013 yılından itibaren “arıcılık yapan işletme sayısı” olarak değiştirilmiştir.

1.6. Bal Arısı’nın Tarihi

İlk defa Linnaeus tarafından 1758 yılında bal arısına “bal taşıyan arı” anlamında *Apis mellifera* adı verilmiştir. Daha sonraları “bal yapan arı” anlamına gelen *Apis mellifica* adı bal arısına verilse de bu isim ilk adı kadar yaygın kullanılmamıştır (Silici ve Özkök, 2011).

Bilinen ilk arı fosili 40 milyon yıl önce (Eosen Dönemi) Baltık Amber’de bulunmuştur. *A. mellifera*’nın tersiyer dönemde Afrika’da subtropiklerden köken aldığı düşünülmektedir. Daha sonraları Güney Afrika’dan Kuzey ve Batı Avrupa’ya, Hindistan ve Çin’in iç kısımlarına kadar yayılım göstermişlerdir. Amerika’ya göçmenler tarafından ilk koloniler ise 1700’lerin sonlarında götürülmüştür. Günümüzde kutuplar hariç bütün dünyaya yayılmışlardır (Silici ve Özkök, 2011).

1.7. Bal Arısı Taksonomisi

Dünyada 100.000 dolayında böcek türü taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Bu 100.000 tür içinde 23.000 dolayında arı türü bulunmaktadır. Bal arıları evrimleri süresince diğer böcek türlerinden farklılık göstererek kendilerine has morfolojik ve anatomik yapılarını geliştirmişlerdir. Hayvanlar aleminin böcekler sınıfında yer alan bal arısının taksonomisi aşağıda verilmiştir (URL-2).

Kingdom	: Animalia (Hayvanlar)
Phylum	: Arthropoda (Eklembacaklılar)
Subphylum	: Antennata (Antenliler)
Class	: Insecta (Böcekler)
Order	: Hymenoptera (Zar kanatlılar)
Family	: Apidae (Arılar)
Genus	: <i>Apis</i> (Bal Arıları)
Species	: <i>Apis mellifera</i> (Bal Arısı)

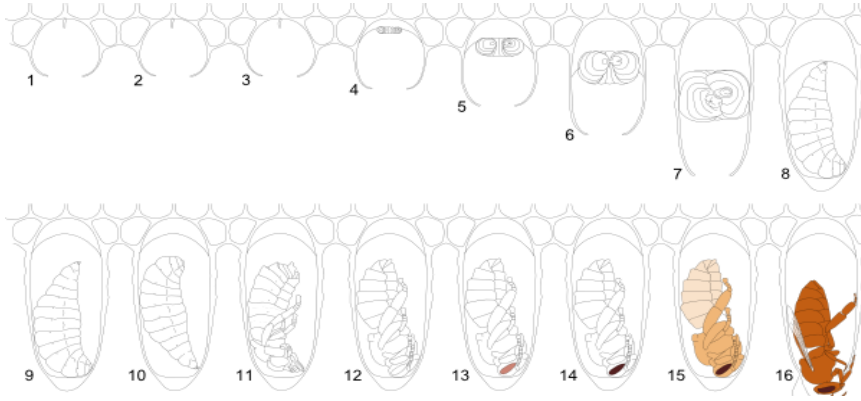
Apis cinsi içinde *Apis mellifera* "Batı" bal arısı olarak adlandırılır (Linnaeus, 1758). Bunun dışında "Doğu" bal arısı olarak *Apis cerana*, *Apis dorsata* ve *Apis florea* olarak adlandırılan 3 tür daha bilinmektedir. Dünya bal üretiminde *A. cerana*'dan kısmen yararlanırken tamamına yakını *A. mellifera*'dan gerçekleştirilmektedir. Diğer 2 tür ise doğal yuvalarda tek bir petek üzerinde yaşamaktadırlar (Arslangündoğdu, 2011).

1.8. Bal Arısı Biyolojisi

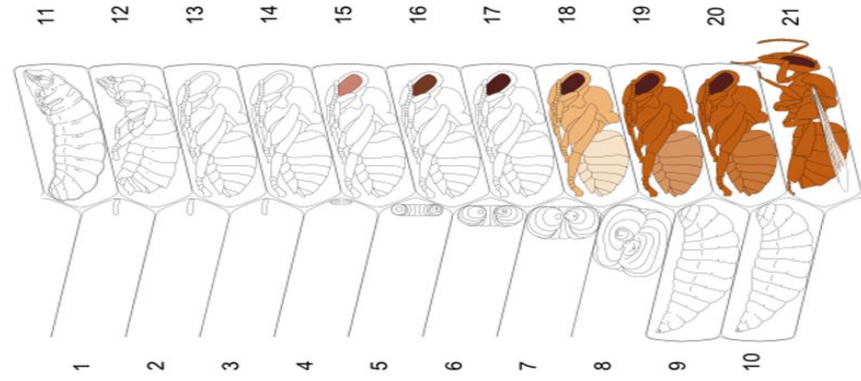
Bal arılarının yaşamında tam başkalaşım söz konusudur. Bal arıları yaşamlarına yumurta olarak başlayıp larva, pupa ve ergin evrelerini geçirerek gelişimlerini beslenme çeşidine göre ana arı, işçi arı ve erkek arı olarak tamamlarlar. Ana arı ile işçi arı, ana arının petek gözlerine yumurtladığı döllenmiş yumurtalardan, erkek arılar ise dölsüz yumurtalardan meydana gelmektedir. Yumurtanın petek gözüne bırakıldığı andan itibaren ergin arı oluncuya kadar geçen süre ana arı için 16, işçi arı için 21 ve erkek arı için 24 gündür (Tablo 3; Şekil 2, 3 ve 4) (Arslangündoğdu, 2011).

Tablo 3. Farklı arı sınıflarının gelişim süreleri (Kandemir, 2010)

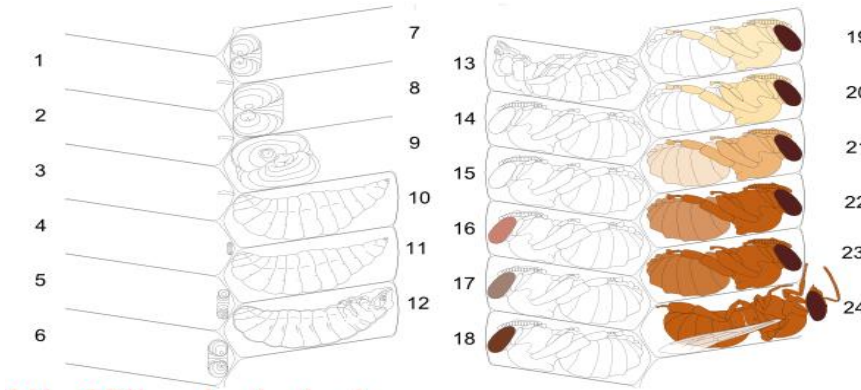
Bal Arısı Sınıfı	Yumurta Dönemi (gün)	Larva Dönemi (gün)	Pupa Dönemi (gün)	Toplam Gelişme Süresi
Kraliçe Arı	1.-3.	4.-9.	10.-15.	16
İşçi Arı	1.-3.	4.-9.	10.-20.	21
Erkek Arı	1.-3.	4.-10.	11.-23.	24



Şekil 2. Kraliçe arının gelişim evreleri (URL-3).



Şekil 3. İşçi arının gelişim evreleri (URL-3).



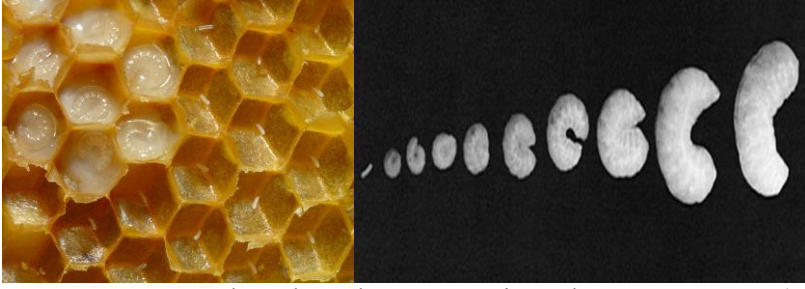
Şekil 4. Erkek arının gelişim evreleri (URL-3).

1.8.1. Yumurta

Arı yumurtası silindir şeklinde, uçları yuvarlak ve uzun ekseni boyunca eğri bir dışbükey görünümündedir. Petek üzerindeki küçük gözler (hücreler) işçi arı yetiştirmek için, büyük gözler ise erkek arı yetiştirmek için yapılıdır. Ana arı büyük petek gözüne dölsüz yumurta bırakırken, küçük göze ise döllu yumurta bırakır. Yumurta petek gözüne bırakıldığı zaman dikey konumundadır. Dikey konumda bırakılan yumurta yavaş yavaş yana eğilerek üçüncü günün sonunda petek gözünün tabanında tamamen yatay bir konuma gelir. Bu özellikten faydalanarak petek gözündeki yumurtanın kaç günlük olduğu kolayca anlaşılmaktadır. Petek gözünde bulunan döllenmiş yumurta döllenmemiş yumurtaya oranla daha hızlı gelişir ve dört saatte gelişimini tamamlar. Embriyo 3. günün sonunda yumurtadan çıkıp larva dönemine geçmektedir (Şekil 5) (Arslangündoğdu, 2011).

1.8.2. Larva

Bal arısı larvası renk, şekil, hacim olarak çok hızlı ve önemli değişiklikler gösterir. Bu dönemde vücudu oluşturan halkalar üzerinde gözenekler bulunur ve başta ağız parçaları oluşmuştur (Şekil 5). Larva dönemine geçmeden önce, işçi arılar tarafından larva yumurtadan çıktığı an beslenebilmesi için yumurtanın yanına arı sütü (5-15 günlük işçi arılar tarafından salgılanan) koymaya başlarlar. Larvanın çıkışıyla birlikte gözlere bırakılan arı sütü miktarıda artmaktadır. Bütün arı bireyleri larva döneminin ilk üç gününde arı sütüyle beslenir. Larvaya verilecek arı sütünün ölçüsü bireylere göre değişir ve en çok arı sütünü ana arı larvaları tüketir. Ana arı larvaları bütün larva dönemi boyunca arı sütüyle beslenmektedir. Larva döneminin ikinci üç günlük kısmında işçi ve erkek arı larvaları çiçek tozu-bal karışımına benzer, polen ihtiva eden düşük kalite arı sütüyle beslenirler. Yani kaliteli beslenen döllu yumurtadan ana arı, daha az kaliteli beslenen döllu yumurtadan işçi arılar meydana gelir (Arslangündoğdu, 2011).



Şekil 5. Yumurtadan olgun larvaya geçiş ve larva görüntüsü (URL-3).

1.8.3. Pupa

Larva 6 gün içerisinde 5 kez gömlek değiştirerek pupa dönemine girer (Şekil 6). İşçi arı larvası bulunan gözlerin ağzı 8. günün sonunda mühürlenir. Larva 9. gününde başındaki özel bir bezden salgıladığı salgıyı kullanarak bir kozaya dönüşür. Bu koza içerisinde 10. gününde hareketsiz olarak durmaktadır. Bu evre prepupa (pupa öncesi) devresi olarak adlandırılır ve 11. günde pupa olur. Pupa döneminde beslenme olmaz, renk ile deri değişimi gerçekleşir, ayaklar, kanatlar ve bütün organlar oluşur. Pupa dönemi prepupa dönemiyle birlikte toplamda ana arıda 7, işçi arıda 12 ve erkek arıda 15 gün sürer (Arslangündoğdu, 2011; Ergün, 2003).



Şekil 6. Bal arısı pupa görüntüsü (URL-3).

1.8.4. Ergin

Pupa 6. gömleği değiştirdikten sonra pupa evresinde kapatılmış olan petek gözü mührünü kemirerek kaldırmakta ve gözden ergin arı şeklinde çıkmaktadır (Şekil 7). Bu işlem 12–24 saat kadar sürmekte olup gözden çıkan arılar diğer ergin arıların arasına karışarak kovan içi görevlerine başlarlar (Arslangündoğdu, 2011).

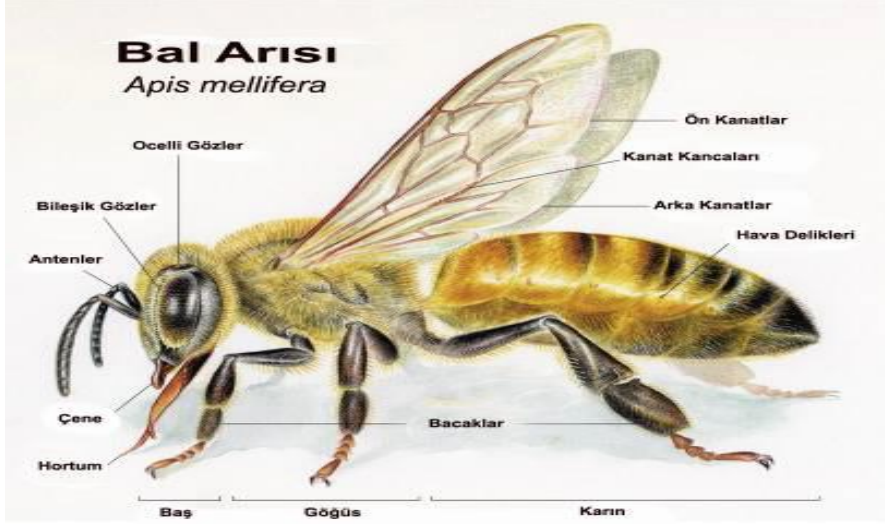


Şekil 7. Pupa dönemini tamalayarak gözden yeni çıkan bir işçi arı (URL-3).

1.9. Bal Arısı Morfolojisi

Arı bir böcek olup kitinden yapılmış dış iskeleti, altı bacağı ve bir çift anteniyle tipik böcek özelliklerini taşır. Karıncalar ve eşekarıları gibi bal arıları da zar kanatlılar takımından olup dört adet zar kanadı, çiğneme ve emme işlevine sahip ağız parçaları ve tam metamorfoz geçirmeleri ortak özellikleridir (URL-4). Arı vücudu temel olarak baş (head), göğüs (toraks), karın (abdomen) olmak üzere üç kısımdan oluşur (Şekil 8).

Baş üzerinde yerleşen gözler, antenler ve beslenme yapıları olarak proboscis (dil) ile mandibula (çeneler) bulunur. Proboscis, sıvıları emmede; mandibula ise poleni ezme ve balmumunu şekillendirmek için kullanılır. Kraliçe ve işçi arının başı çok benzerdir. Her ikisinde antenler aynıdır (12 bölümden oluşur). Erkek arıda ise anten 13 bölümden meydana gelir (Şekil 9). Arıların üç basit (ocelli), iki bileşik olmak üzere beş gözü bulunur. Bileşik gözler ommatidia adı verilen bireysel olarak ışığı duyarlı yüzlerce hücreden oluşmuştur. Bu yapılar aracılığıyla gözler; renkten, ışıktan ve güneşin ultraviyole ışınlarından yön bilgisini algılayabilmektedir (Morse ve Hooper, 1985; Sammataro ve Avitabile, 1998).



Şekil 8. Bal Arısı vücut kısımları (URL-5).



Şekil 9. Sırasıyla ana arı, işçi arı ve erkek arının baş yapılarının görüntüsü (URL-5).

Arı vücudunun orta bölümü olan göğüs (toraks), bacakları ve kanatları içeren baş ile karın arasındaki bölgedir. Son derece iyi kas yapısına sahip olup üç çift bacak bulunur. Üzerindeki özel yapılar ve kıllarla bezenmiş bacakları arının kendisini temizlemesine (en öndekiler), polen toplamasına ve taşımaya yardımcı olur. İşçi arıların arka bacakları, polenleri toplama ve taşımaya uygun olarak özelleşmiştir. Arka bacağın iç kısmını kaplayan kıllar polen taraklarını oluşturur. Arılar, ağızları ve bacakları ile topladıkları polenleri polen sepetine depolarlar. Toraks üzerinde üç çift olarak bulunan spirakulumlar ise solunum sisteminin dışa açılan kısımlarıdır (Sammataro ve Avitabile, 1998; Kandemir, 2010). Bal arısı vücudunun son kısmı olan karın (abdomen) hava delikleri, mum salgı bezleri (4 çift mum salgı bezi), koku bezleri, iğne, zehir kesesi gibi birçok bölümden oluşur. İşçi arı hayatının bir bölümünde kovan içerisinde mum salgılar ve peteklerin kabartılmasını gerçekleştirir. Mum küçük levhalar şeklinde üretilip daha sonra birbirine eklenip petekler oluşturulur (Şekil 10).



Şekil 10. Balmumu bezlerinden mum salgılanması (URL-5).

Karıdaki koku bezleri, kovan içi iletişimden, haberleşmeden sorumludur. Zehir kesesi ve iğne ise bal arılarının yegâne savunma mekanizması olup ölüm pahasına kovayı korumada kullanılır. İğne çok ilginç bir yapıya sahip olduğundan arı bir kez soktuğunda iğne kolayca geri çıkmaz, ancak zehir kesesi ile birlikte çıkar, istemsiz hareket ettiğinden hala pompalamaya devam eder ve arı ölür (Şekil 11).



Şekil 11. İşçi arının deriye iğnesini sokması görüntüsü (URL-4).

Kraliçe sadece kendisi gibi kraliçe olan bireyleri sokar ve kovana hakim olur. Erkeklerde ise iğne yoktur ve sokamaz. Arı zehiri son derece pahalı ve bir okadar da sağlıkta kullanılan bir maddedir. Arı zehiri bir protein zehiridir, içerisinde 2 ana protein bulunur, sekapin ve mellitin adları ile bilinir. Bu zehrin kullanımı sonucu yapılan tedaviye Apiterapi ismi verilir (Kandemir, 2010).

1.10. Arı Hastalıkları ve Sınıflandırılması

Bal arısı hastalık ve zararlıları, arıcılığın gelişmesini yavaşlatan ve üretimi sınırlandıran en önemli faktörlerden biridir (Aydın vd., 2003). Arının gelişme dönemi, pek çok hastalık etmeni ve zararlı için uygun ortam oluşturmaktadır. Arı hastalıkları, ergin ve yavru hastalıkları olarak sınıflandırılabilir (Tablo 4 ve 5).

Tablo 4. Bal arısı zararlıları (Uygur ve Girişgin, 2008).

Hastalık Adı	Etken	Etken Grubu
Varroa	<i>Varroa destructor</i>	Artropod
Mum Güvesi	<i>Galleria mellonella</i> <i>Achroia grisella</i>	Artropod (insect)
Trake Akarı	<i>Acarapis woodi</i>	Artropod
Arı Biti	<i>Braula coeca</i>	Artropod (insect)
Yaban arıları, karıncalar, arı kuşu, fare, ayı, kirpi		

Tablo 5. Bal arısında görülen hastalık ve etkenleri (Uygur ve Girişgin, 2008; Shimanuki ve Knox, 2000).

Hastalık Adı	Etken	Etken Grubu
Bal Arısı Yavrularında		
Amerikan Y.Ç	<i>Paenibacillus larvae</i>	Bakteri
Avrupa Y.Ç	<i>Melisococcus pluton</i> <i>Bacillus alvei</i> <i>Bacillus laterasporus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Bakteri
Powdery Scale	<i>Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens</i>	Bakteri
Kireç Hastalığı	<i>Ascospaera apis</i>	Mantar
Taş Hastalığı	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Mantar
Tulumsu Y.Ç	<i>Marator aitatulas</i>	Virüs
Bal Arısı Erginlerinde		
Nosema Hastalığı	<i>Nosema apis</i>	Protozoon
Septisemi (kan zehirlenmesi)	<i>Pseudomonas apiseptica</i>	Bakteri
Paraliz (arı felci)	<i>20 civarında virüs</i>	Virüs
Amoeba Hastalığı	<i>Malpighamoeba mellificae</i>	Protozoon

Bununla birlikte, dünyadaki hızlı ulaşım, kıtalar ve ülkelerarası arı, arı ürünleri ve arıcılık malzemeleri ticareti arı hastalıklarının kısa sürede tüm ülkelere yayılmasına neden olmaktadır. Gezgin arıcılık işlevi de hastalık ve zararlıların ülke içindeki hızlı yayılışında önemli bir etkidir. Arı hastalıkları, yavru yetiştirme faaliyetinin büyük hız kazanmış olması, beklenmeyen soğuk ve yağışlı havalardan dolayı özellikle ilkbahar aylarında en sık görülür. Bu kritik dönemde arıların özellikle yavru hastalıklarına karşı korunması, koloni kontrollerinin sık yapılması ve koloninin üşütülmemesine özen gösterilmelidir (Anonim, 2001; Shimanuki ve Knox, 2000).

1.11. Bal Arısı Yavrularında Hastalık Yapan Gruplar

1.11.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB)

Hastalık hakkındaki ilk araştırmalar ABD’de yapıldığı için Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) olarak adlandırılmıştır. Tüm dünyada görülen yavru arının larva dönemini etkileyen çok bulaşıcı ve öldürücü bir hastalıktır. Hastalığın etkeni *Paenibacillus larvae* olarak adlandırılan, 2.5-5 µm boyunda, 0.5-0.8 µm eninde Gram pozitif (+) sporlu bir bakteridir. İngiltere ve Yeni Zelenda’da bu hastalığa karşı ilaç kullanılmamakta ve bulaşık kovanlar yakılmaktadır. Yetişkin arılarda AFB hastalığı görülmez. Parazit sadece *Apis* cinsine dahil arıların larvalarını efekte etmektedir (Ergün, 2003).

1.11.2. *Paenibacillus larvae*’nın Genel Özellikleri

Paenibacillus larvae’nin Sistematikteki Yeri (Ash vd., 1993)

Alem : Bacteria

Şube : Firmicutes

Sınıf : Bacilli

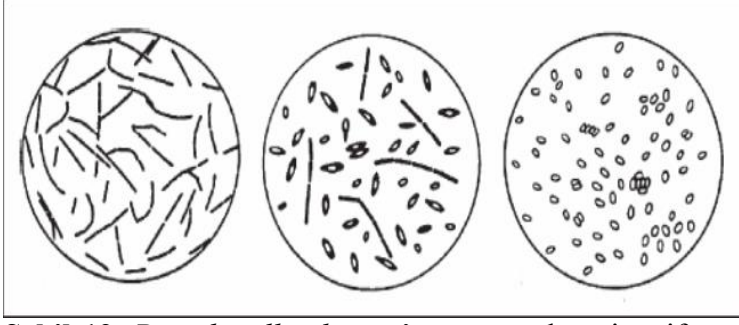
Takım : Bacillales

Aile : Paenibacillaceae

Cins : *Paenibacillus*

Türler : *P. larvae*, *P. alvei*, *P. amyolyticus*, *P. dendritiformis*, *P. lactis*, vb.

Paenibacillus fakültatif anaerobic, endospore-oluşturan Gram pozitif bir bakteri olup, orijinal olarak *Bacillus* cinsi içinde yer almaktaydı, ancak 1993’te bu gruptan ayrılmıştır (Ash vd., 1993). Vejetatif formu zincir veya tekli çubuk şeklinde, sporları ise iğ şeklinde 1.3 µm x 0.6 µm boyutunda ve şişkindir (Şekil 12). Karbol fuksin ile sporların duvarları kırmızımsı mor renkte boyanmaktadır ve spor merkezleri şeffaftır (Breed vd., 1957; Shimanuki ve Knox, 2000).



Şekil 12. *Paenibacillus larvae*'nin sırasıyla vejetatif, spor-vejetatif ve spor formlarının görünümü (Shimanuki ve Knox, 2000).

Hastalık etmeni olan sporlar kuru olarak 100 °C'de 8 saat, sıvı içinde ise 90 °C'de 120 dakika, 100 °C'de 11-14 dakika dayanabilmektedir. 100 °C ısıtılmış balda 30 dakika yaşadığı saptanmış, 116 °C sıcaklıkta ise 20 dakikada öldüğü bilinmektedir. Bu sporlar kovanda 33 yıl, toprakta 60 yıl ve temel petekte 45 yıl canlı kalabilmektedirler (Öncüer ve Benlioğlu, 1998).

Bakteri değişik çevresel koşullarda toprak, su, rhizosferde, bitkisel materyallerde, yemde ve böcek larvalarında, hatta klinik örneklerde izole edilmiştir (Lal ve Tabacchioni, 2009; McSpadden Gardener, 2004; Montes vd., 2004; Ouyang vd., 2008). Latince “paene” neredeyse anlamına gelmektedir. İki forma (spor ve vejetatif hücre) sahiptir. Yalnızca sporlar bal arıları için infeksiyon etkenidir. *P. larvae*'nin sporulasyonu ve gelişimi, arı larvalarının hemolenfinde olmasının yanı sıra çoğu suşlar saf atık ürünlerde de gelişirler (Shimanuki ve Knox, 2000).

P. larvae ve eski adıyla *P. pulvifaciens* türü AFB etkeni olarak bilinirken *P. polymyxa*, azot fikse etme yeteneğinden dolayı tarımda ve bahçecilikte, *P. amylolyticus* endüstride ve *P. peoriata* medical uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu grup bakteriler değişik ekstrasellüler enzimler (polisakkaritler, parçalayıcı enzimler ve proteazlar) üretirler ve kozmetikten biyoyakıtta kadar değişik sentetik reaksiyonları katalizleyebilirler. Değişik *Paenibacillus* spp. türleri antimikrobiyal maddeler üretebilir ve çok sayıda mikroorganizmaya mantarlara, toprak bakterilere, bitki patojeni bakterilere ve hatta önemli anaerobik patojen olan *Clostridium botulinum*'a karşı etkili olabilirler (Girardin vd., 2002; Piuri vd., 1998; Von der Weid vd., 2003). *Paenibacillus dendritiformis* ilk Ben-Jacob vd. (1994) tarafından keşfedilen karmaşık ve dinamik mimarili desen oluşturan sosyal bir bakteri türü vardır.

1.11.3. *P. larvae*'nin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Paenibacillus'un biyolojik örneklerden izolasyonu, vejetatif mikroorganizmaların ısıya muamele edilerek öldürülmesinden sonra yapılmaktadır. Bu aşama *P. larvae*'nin diğer mikroorganizmalarca maskelenmesini önlemeyi hedeflemektedir. *P. larvae*'nin farklı genotiplerinin çimlenme yetenekleri farklıdır (de Graaf vd., 2013).

AFB örneklerinde MYPGP agar rutin kullanılır. İnkübasyon için CO₂ gerekmemekle birlikte %5 CO₂ varlığı çimlenmeyi önemli ölçüde arttırdığı bildirilmektedir. *Paenibacillus*'un diğer türlerle kontaminasyonu yanı sıra *Bacillus* ve *Brevibacillus* cinsi bakterilerle kontaminasyonunu nalidiksik asit ve pipemidik asit aracılığıyla inhibe edilebilmektedir. Kültür ortamında görünür koloniler inkübasyonun 2. gününden sonra gözlenir; ancak bazen daha fazla süreye de ihtiyaç duyabilmektedir (de Graaf vd., 2013).

Paenibacillus larvae'nin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bazlı identifikasyonu önerilmekte ve bu amaçla birçok metod tanımlanmaktadır. Ancak 16S rRNA genine dayalı tanı en çok tercih edilen metod olarak bilinmektedir. *Paenibacillus larvae* suşlarının farklı tanımlanmalarının standart tekniklerin belirlenmesi, AFB epidemiyolojisi çalışmaları için zorunludur. Bu ise bilim adamlarına hastalık baş gösterdiğinde infeksiyon kaynağının belirlenmesinde, infeksiyonlar arasındaki ilişkide, virulent suşların tanımlanmasında, tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ve önlemlerin izlenebilirliğinde önem arz etmektedir. İzolatların farklılıklarının belirlenmesinde farklı teknikler kullanılabilir. Bunlardan bazıları fenotipik karakterlerin belirlenmesi, hücre ve koloni morfolojisi, total bakteri proteininin SDS-PAGE ile belirlenmesi veya biyokimyasal profillerinin belirlenmesini kapsamaktadır (de Graaf vd., 2013).

1.11.4. *P. larvae*'nin Kültürel Karakteri

Aerobik ve fakültatif anaerobik ortamlarda gerçekleşir. Sporulasyon ve vejetatif büyüme için aerobik koşullar gerekmektedir. Sporların gelişmesi düşük oksijen atmosferi ile artırılır. Basit ortamlarda büyümez (nutrient broth veya nutrient agar) *Bacillus* ve *Paenibacillus*'un diğer cinslerden ayrılması için temel karakteristik

özelliğidir. Başlıca büyüme ortamları ise; bal arısı özütü ortamı, nutritive broth/agara %10 tavşan ya da at serumu eklenmesi ile oluşan ortam, %0,01 thiaminhydrochloride ilaveli BHI. Sıvı ortamda kültürel karakterizasyonu; düzgün olmayan, sıvıda bulanıklık meydana getiren, bazı şuşlar ince şeffaf filmler oluşturabilir.

Katı ortamda kültürel karakterizasyonu; küçük, 1-2 mm çapında gri, açık sarı, R-tipi, kum tanesi görünümlü kolonilerdir. Zenginleştirilmiş veya bifazik besiyerlerinde birçok gram negatif ve pozitif bakterilere karşı (spor oluşturma evresinde) antimikrobiyal etkili maddeler üretmesinden dolayı geniş, mukoid, opak koloniler oluştururlar. Bazı zamanlar bu bakteriler parlak turuncu pigmente sahiptir (URL-10; Shimanuki ve Knox, 2000).

1.11.5. *P. larvae*'nin in Biyokimyasal Karakteri

Gliserol, glukoz ve trehalozdan asit üretir. L-arabinoz ve D-ksiloz'dan ise asit üretmez. Kazein ayrıştırma, jelatini sıvılaştırma, lipaz, H₂S üretme ve eskulin hidrolizi pozitif sonuç verirken nişasta hidrolizi, fenilalanin, indol üretimi, voges-proskauer, katalaz, dihydroxyacetone üretimi ve sitrat kullanımı testleri negatif sonuç vermektedir. Nitratı nitrite dönüştürme, alkalın fosfataz, asit fosfataz, mannitol ve salisinden asit üretme testleri ise değişkenlik gösterir. Sporulasyon evresinde güçlü proteolitik enzimler üretir ve kazeini parçalaması ile bu özellik gözlenebilir (URL-10; Shimanuki ve Knox, 2000).

1.11.6. *P. larvae*'nin in vitro Sporulasyonu

Paenibacillus larvae ve *P. popilliae* katalaz negatif *Paenibacillus*'lardır. Böceklerde etkin karakteristik sporulasyona sahiptirler fakat genellikle in vitro gelişme koşulları kullanıldığında çok zayıf sporlanırlar. *Paenibacillus larvae*'da in vitro sporulasyonun baskılanması oksijenik toksisitesinden dolayı meydana gelir. Örneğin NRRL-B 3650 şuşunun gelişimi, sıvı kültürde O₂'in sınırlandırılması durumunda artar. Hatta sporulasyon sırasında besin yetersizliği spor oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir (de Graaf vd., 2013).

1.11.7. *P. larvae*'da Antibiyotik Kullanımı

Bazı ülkelerde oksitetrasiklin antibiyotiği arı üreticileri tarafından bal arısı kolonilerinde AFB'de yoğun kullanımı, *P. larvae* izolatlarında tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnci ile sonuçlanmıştır. Direncin genomik olmayan (plazmid veya konjugant transpozon tarafından) horizontal yolla aktarıldığı ve hatta tetrasiklinin sub-inhibitör konsantrasyonlarda varlığı direncin artmasına neden olduğu görülmüştür. *P. larvae* yüksek dirençli fenotipleri tetK ve tetL genleri dahil olduğu farklı tetrasiklin direnci taşıyan doğal plazmidlerin varlığı belirlenmesiyle ilişkilidir (de Graaf vd., 2013). *P. larvae*'nın da dahil olduğu çoğu *Paenibacillus* türlerinde yüksek tetrasiklin hassasiyeti bulunmaktadır. *P. larvae*'nın varlığı kültür ortamında 0.02 µg/mL konsantrasyonlarında tetrasiklin ilavesiyle önlediği bildirilmektedir. Alternatif olarak 5 µg'lık oksitetrasiklin diski bakteri suşlarında geniş (yaklaşık 50 mm) inhibisyon zon çaplarına neden olmaktadır (Shimanuki ve Knox, 2000; de Graaf vd., 2013).

1.11.8. Hastalığın Bulaşma Şekli ve Hayat Evresi

Başlıca bulaşma yolları çok olup bunlar; sterilize edilmemiş temel peteklerin kullanımı, arıcıların kendileri, arıcı alet ve ekipmanları, hastalıklı kovanlardan diğer kovanlara çerçeve transferleri, doğal ve suni oğulların bulaş oluşumu, hastalık etkeni taşıyan ergin arıların varlığı, bulaşık kovanların nakilleri, kontamine ballarla arı beslemesi, ana arının bulaşmış olması, hastalık etkeni ile bulaşık olan eski kovanların kullanılması gibi pek çok sebepler sayılabilir (MAYBİR, 2014).

Arı larvası bakıcı işçi arı tarafından kendisine verilen sporla bulaşık gıdayı alarak hastalığa yakalanır. Sporlar sindirim organlarında gelişip çoğalarak larvanın gelişmesini yavaşlatırlar. AFB'de, bakteri larvanın gıdasını yediği için larvalar açıktan ölürlere. Larvalar pupa dönemine geçerken sporlar sindirim organlarını parçalayarak kana geçer ve yavrular kapalı gözler içinde ölür. Ölen bir yavruda 2-2,5 milyar AFB sporu oluşur ve yavru çürüyerek petek gözünün tabanına yapışır. İşçi arılar kapalı gözler içindeki ölen yavru arıları bilirler ve bu gözler üzerinde ufak delikler açarlar. Kovan temizliği yapan arılar da üzerinde delik bulunan gözleri açarak ölü yavruları temizlemeye çalışırlar. Ölen yavruların dışarı atılması ve petek gözlerin temizliği sırasında temizlikçi

arılar AFB sporlarını kovan içerisine bulaştırarak hastalığın yayılmasına yol açarlar. Arılar tarafından temizlenemeyen ölü larva ve pupalar kuruyarak petek gözlerinin tabanına yapışırlar. Burada oluşan sporlar larva kalıntıları ve petekler üzerinde uzun yıllar canlılıklarını koruyarak hastalığın çevreye yayılmasına neden olurlar (Ergün, 2003).

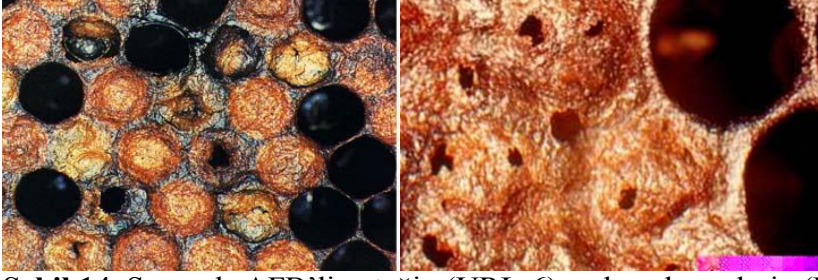
1.11.9. Hastalığın Belirtileri

Kuvvetli kolonilerde yeni bulaşmış hastalığın farkına varmak oldukça zordur. Hastalık ilerledikçe arı sayısında bir azalma başlar. Aktif ve çalışkan arılarda tembellik ve halsizlik göze çarpar. Hastalığın başlangıcında uçuş deliği önünde, açık ve kapanmış gözlerden söküp atılan henüz tam kurumamış koyu renkli larvalara rastlanır. Sağlıklı bir larva, inci beyazı görünüşünde, petek gözünde dik vaziyette bulunur. AFB enfekte bir larva, önce petek gözünün tabanında “C” harfi şeklinde daha sonra hücreyi dolduracak şekilde yukarı doğru gelişerek dik pozisyonda ölürler (Şekil 13).



Şekil 13. Amerikan yavru çürüklüğü hastalığına yakalanmış larva görüntüsü (URL-6).

AFB ile hastalıklı petek ve petek gözleri, sağlıklı kapalı gözler, hastalıklı larva kalıntılarını içeren açık gözler ve boş gözlerden ibaret alacalı manzara ile karakteristik bir görünüme sahiptir. Hastalıklı larvaların bulunduğu petek gözü kapakları; iç bükey, koyu renkli ve sümüksü manzaradadır. Kapalı gözlerde kapağın rengi solmuş, içeriye doğru çukurlaşmış, ayrıca delinmiş (toplu iğne başı kadar) durumdadır. Enfeksiyon ilerledikçe petek gözlerinin kapaklarında düzensiz delikler oluşur (Şekil 14).



Şekil 14. Sırasıyla AFB'li peteğin (URL-6) ve kapalı gözlerin (URL-8) görüntüsü.

Ölü larvalar koyu renkli, kahverengi, hatta siyaha kadar renk değiştirir. Ölü larva çikolata rengini aldığı anda bir kibrit çöpü sokulup çekilirse, larva iplik gibi 2,5–10 cm uzar (Şekil 15). Ölü larvaları içeren peteklerde, tipik zamk kokusu veya bozulmuş balık kokusu vardır ve nihayet 1 ay veya daha sonra hastalıklı bireyler kovanlara kuvvetle yapışmış, tipik koyu pullar halini alır. Ölü pupanın kurumuş kalıntısı işçi arıların söküp çıkaramayacağı şekilde petek gözünün içine yapışmıştır. Eğer ölüm pupa safhasında olursa, ‘pupa dili’ şeklinde isimlendirilen, pupaların ağız organellerinin dışarı uzaması ve petek gözünün tavanına yapışması şeklinde karakteristik bulgular şekillenir (Şekil 15). Dile ilaveten kurumuş pul şeklindeki larvalar da hastalık için patognomonik olan özelliklerdir (URL-7).



Şekil 15. Amerikan yavru çürüklüğü hastalıklı larvalarda sümüksü görünüm (URL-9).

1.11.10. Hastalığın Önlenmesi

Hastalığın önlenmesinde öncelikle hijyen kurallarına tüm arıların titizlikle topyekün uymasıyla mümkün olmaktadır. Bu amaçla;

- Arıların temiz kovan ve malzeme kullanması,
- El demirini her kovana inceledikten sonra mutlaka körük içerisinde yakarak steril etmesi gerekmektedir. Böylece kovanlar arası hastalık yayılımı engellenmiş olur.

- Kovanları düzgün bir şekilde incelenmesi, bu sırada yağmalamaya ve arıların kovanları şaşırmasına müsaade edilmemesi,
- Kovanlar kontrol edildiğinde mutlaka yeterli bal ve besinin olmasına özen gösterilmesi,
- Yavrulu çerçevelerde farklı renklerin oluşup oluşmadığına dikkat edilmesi,
- Hastalık son derece ilerlemiş ise, hastalıklı kovanları arıları ile birlikte bir çukur kazarak içerisinde yakılması şeklinde bir dizi tedbirlerin alınması gerekmektedir (Kandemir, 2010).

1.11.11. Hastalığın Tedavisi

Amerikan yavru çürüklüğü hemen her ülkede; ihbarı mecburi hastalıklar arasında yer almaktadır. Ülkemizde herhangi bir yerde salgın bir arı hastalığının çıktığı durumda 3285 Sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanununun 9. ve 10. maddelerine göre illerde Bakanlık İl Müdürlüğüne, ilçelerde İlçe Müdürlüğüne derhal bildirmelidir. Arıcılıkta AFB'yi kontrol etmede başarının sırrı, hastalığı erken dönemde belirlemeden geçer. Klinik bulgular, hastalığın teşhisinde önem taşırsa da, kesin teşhis için marazi madde alınarak laboratuvar muayenelerinin yapılması gereklidir. Arıcılar şüphelendikleri kovanlardan bal, petek ve larva örnekleri alarak ilgili teşhis laboratuvarlarına gönderebilirler.

Dünyanın bazı ülkelerinde yasal olarak, Türkiye'de ise yasak olmasına rağmen bazı arıcılar tarafından koruma amaçlı antibiyotik kullanılmaktadır. Sadece arıcılık alanındaki antibiyotikler değil hayvan ve insan sağlığında kullanılan antibiyotikler dahi arıcılıkta kullanılmaktadır; ancak antibiyotik sadece etkenin vegetatif formuna etkilidir. Hastalığa sebep olan ise etkenin sporlarıdır. Antibiyotik uygulaması geçici olarak belirtileri baskılayabilir, ancak sonra tekrar ortaya hastalık çıkabilir. Yavru çürüklüğü için kullanılan antibiyotiklerin koruma amaçlı ve sürekli kullanılması bir taraftan ballarda kalıntı problemlerine sebep olmakta diğer taraftan ise etken antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu sebeple başta Avrupa Birliği'ne üye ve Türkiye gibi üye aday ülkeler olmak üzere birçok ülkede, bu gibi nedenlerle antibiyotiklerin tedavi ya da korunma amaçlı kullanımı yasaklanmıştır (Bailey ve Ball, 1991; Alippi, 1999; de Graf vd., 2013; Forsgren vd., 2013).

1.11.12. Mücadele Yöntemleri

Hastalıklı kovan ve balın imhası: Ülkemizde ihbarı zorunlu olan bu hastalıkla en kesin ve etkili mücadele yöntemi, hastalıklı kolonilerin tümüyle yakılarak yok edilmesidir. Kovan gövdesi pürmüzle iyice alevden geçirilerek yakılmalı ve körük, maske, el demiri, yemlik, ana arı ızgarası gibi bulaşık olan malzemeler dezenfekte edilmelidir. Böylece hastalığın diğer kolonilere bulaşması önlenmiş olur. Çerçeve ve kapaklar arı, larva, propolis, bal ve balmumundan arındırıldıktan sonra yakılmalıdır. Bu artıkları temizlemek için önce el ile kazıma, sonra kostik soda ile suda kaynatma ya da sadece suda kaynatma yapılabilir. Daha sonra büyük bir çukur açılarak yakılır. Bu işlemin yağmacılığı önlemek ve daha rahat çalışabilmek için gece yapılması daha uygundur. İnfekte kovanlarda arılar, bal, infekte larva ve çerçeveler yakılarak yok edilmelidir. Bu amaçla kovan arılıktan uzak bir alana götürülerek hastalığın bulunduğu kovanın girişi gece, bir gazete kâğıdı ya da maskeleme bandı ile kapatılır ve kovana arıları öldürmek için insektisid dökülür. Yaklaşık 48 saat sonra da kovan yakılır. Fakat arıcı bunu yüksek maliyet ve uğradığı ekonomik zarar nedeniyle uygulamak istemez. Bunun için alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Hansen ve Broodsgaard, 1997; URL-14; Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Silkeleme: Hastalıklı kovanın arıları ve ana arısı boş ve temiz bir kovana alınır. Yeni kovana temiz temel petek konur. Yavrulu ve ballı çerçeveler kesinlikle yakılmalıdır. Hastalıklı kovandan elde edilen ballar kesinlikle ve kesinlikle arıları beslemede kullanılmamalıdır. Arıların bal midelerinde bulunan kontamine balın arılar tarafından harcanması sağlanır. Nektar akımı zayıfsa uygulamadan 1 gün sonra şurup verilir. Bundan 3-4 gün sonra kovana bulaşık olmayan kabarmış petek, ballı ve yavrulu çerçeveler verilmelidir (Hansen ve Broodsgaard, 1997; Parvanov vd., 2006).

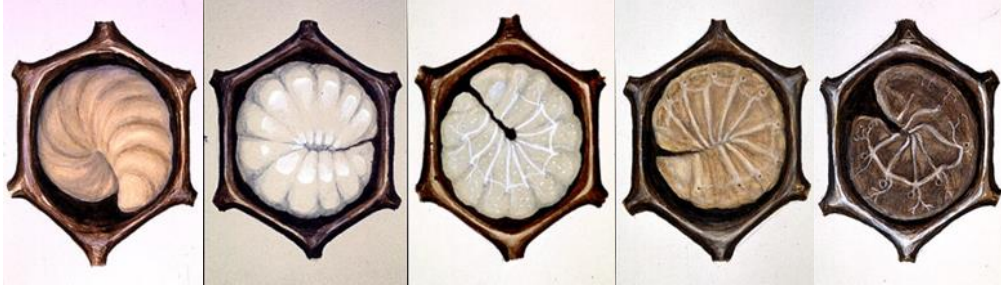
Radyoaktif uygulama: Gamma ışını uygulamasıdır. Kobalt- 60 kaynağı tarafından yayılan gamma ışınları, *P. larvae* spor, endospor ve vegetatif formlarının eliminasyonunu sağlar. Kontamine petek ve ahşap ekipmanın sterilizasyonunda güvenle kullanılır. Arı beslenmesinde kullanılan polen ve bal da bu işleme tabi tutulur. Ancak bunu arıcıların uygulaması pek mümkün değildir (Arbia ve Babbay, 2011; Guzman vd., 2011).

Sıvı parafine daldırma: Hastalıklı kovanın arıları petekleri ve balı yakıldıktan sonra ahşap kovan ve uygun alet ve ekipman 10 dakika süreyle ısıtılmış 160 °C'deki parafine batırılır. Ancak deri ile temas olursa ciddi yanıklar oluşabilir (Dobbelaere vd., 2001; Bogdanov, 2009; Arbia ve Babbay, 2011).

Bu son 2 yöntemin arıcular tarafından uygulanabilirliği tartışmalıdır. Son yıllarda esansiyel yağların hastalıkla mücadelede kullanımıyla ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Laboratuvar koşullarında yapılan incelemelerde oldukça da etkili bulunmuştur. Bu yağlar hem kovanda kalıntı bırakmamaktadır, hem de arılar için zararlı değildir. Fakat bu çalışmalar henüz daha yeni oluşu için koloni bazında başarılı olduğuna dair bilgiler henüz sınırlıdır ve araştırmalar devam etmektedir (Alippi vd., 1996; Gende vd., 2008, Gende vd., 2009).

1.11.13. Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB)

Avrupa Yavru Çürüklüğü de Amerikan Yavru Çürüklüğü gibi bakteriyel bir hastalıktır, fakat AFB kadar tahribatı yüksek değildir. Etmeni, *Melissococcus pluton*'dur. İlk olarak White (1908) tarafından tanımlanmış ve *Bacillus pluton* adı verilmiştir (Baily, 1983). Baily ve Collins (1981), daha sonra kültürel ve kimyasal özelliklerine dayanarak *Melissococcus pluton* olarak adlandırmışlardır. Hastalıkta diğer bazı sekonder bakteri türleri de (*Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterasporus*, *Enterococcus faecalis*) eken olur, ancak bunlar doğrudan hastalık oluşturmazlar. Özellikle bunlardan *Paenibacillus alvei*'nin ortamda bulunması ölen yavrularda çürümeye ve uzamaya sebep olduğundan Amerikan Yavru Çürüklüğü ile bu hastalığın karıştırılmasına neden olurlar. Avrupa Yavru Çürüklüğü iki günden küçük yavruya saldırır ve larva tarafından sindirilir, larvanın midesinde çoğalmaya başlar, larvanın yediği besini yiyerek larvanın ağızdan ölmesine neden olur (Şekil 16). AFB'de olduğu gibi kovan içinde çalışan ve farklı görevler gören arılar bu bakteriyi alıp bütün kovana yayar. Arıların kovanlar arası dolaşması ile hastalığın kovanlar arasında yayılıp tüm arılığa sıçramasına neden olur (Kandemir, 2010; MAYBİR, 2014).



Şekil 16. Avrupa yavru çürüklüğü hastalığı'ndan ölmüş larva görüntüsü (URL-6).

1.11.14. Pudramsı Hastalık (Powdery Scale)

Etkeni *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* (*Bacillus pulvifaciens*) dir. Nadir görülen bir hastalıktır. Parlak kahverengiden sarıya dönen ölü larvalardan izole edilir. Larvaların tepesine dokunulduğunda ufalanan ve toz gibi dağılan bir görüntüye sahiptir. *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* vejetatif yapı 0,3-0,6x1.5-3.0 µm boyunda, spor yapısı ise 1.0x1.3-1.5 µm boyutlarındadır. Glukoz agar ortamında iyi ürer. Nutrient agarda 20 °C'de üreyebilmesi ve Browni hareketi negatif olmasıyla *P. larvae*'den ayırt edilir. İlk izolasyonlarda kırmızı kahverengi pigment üretir, alt kültürlerinde bu özelliği kaybedebilir (Shimanuki ve Knox, 2000).

1.12. Literatür Özeti

Fries ve Nordström (2001), yaptıkları çalışmada kuluçka odasından 30 gr bal ve 100 yetişkin arı örnekleri alınarak yaptıkları çalışmada MYPGP agar kullanmış, %5 CO₂'li ortamda *P. larvae larvae* üretmişlerdir. Amerikan yavru çürüklüğü semptomu olmayan kolonilerden alınan örneklerde; arılardaki pozitif test sayısı aynı kolonideki bal örneklerinkinden fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, kuluçka odasından alınan örneklerden daha fazla *P. larvae* elde edilmesi nedeniyle baldan ziyade yetişkin arılardan örnek almak gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bursa ve Yalova yörelerinde yavru çürüklüğü şüpheli 24 farklı arılıktan alınan eski petek ile ticari firmalar tarafından üretilen 11 değişik marka hazır petekte insan ve arı sağlığına zararlı bakteriyel ve fungal mantar etkenleri araştırılmıştır. Eski peteklerin tamamında bir veya birden fazla bakteriyel ve fungal etkene rastlanırken, ticari peteklerin 6'sında (%54,5) etken izolasyonu yapılmıştır. Etken izole edilen ticari temel

peteklerin 5'inin (%83,3) bakteriler birinde ise (%16,7) fungal etkenler ile kontamine olduğu tespit edilmistir. İncelenen tüm örneklerde ise AFB etkeni *P. larvae* ve EFB etkeni *M. pluton* saptamadığı belirtilmiştir (Özakın vd., 2003).

Antunez vd. (2004)'e Uruguay'da, ülke genelinde (2001-2002 yılları) alınan toplam 103 bal örneğinin, %73'ünde (0,5-819 cfu/g aralığında) *Paenibacillus larvae* sporlarının varlığını bildirmişlerdir. Pohorecka ve Bober (2008), 2005 ve 2007 yılında yaptıkları çalışmada 242 AFB şüpheli örneğin %56'sında *P. larvae* pozitifliğini bildirmişlerdir. Gillard vd. (2008)'e AFB bulgusu olan ve olmayan kovanlarda yaptığı çalışmada çeşitli örneklerden (petek gözü, çerçeve kenarı, kovan içi-girişi ve balda) *P. larvae* izole etmişlerdir. Belirtilen çalışmada hastalık bulunmayan örneklerde %22-41 arasında değişen oranda *P. larvae* taşıyıcılığı bildirilmektedir.

Lindstrom vd. (2008)'e koloniler arası fiziksel uzaklığın bulaş oranına etkisini çalışmış, bulaşın önlenmesinde mesafenin önemli olduğunu, en az 2 km ve yukarısı uzaklığın bulaşı azalttığı sonucuna varılmıştır. Kılıç vd. (2010), hastalık şüpheli 25 farklı işletmeden alınan 100 adet bal ve bal mumu örneğinden PZR ile 8'inde (kültür 7'sinde) *P. larvae* pozitif olarak bildirmiştir. Gende vd. (2011). Yaptığı bir çalışmada, *Paenibacillus larvae* (Beyaz) sporlarının yetişkin arı başına düşen spor yükü ve AFB görünümü arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sardinya (İtalya) adasında bulunan 8 kovanlardan 44 arı kovani toplanmış, yetişkin arı başına *P. larvae* sporların ortalama sayısı sağlıklı kovanda yaklaşık 3000 seviyelere kadar ulaştığında da hastalık görülmediği belirlenmiştir. Pohorecka vd. (2012)'e Polonya'da 2009–2011 yılları arasında yapılan çalışmada 162 farklı lokaliteden alınan kovanlarda *Paenibacillus larvae* spor prevalansı %45 olarak belirlenmiştir.

Paenibacillus larvae bal arılarında AFB hastalığı etkeni olup dünya çapında yayılmış, arıcılıkta ciddi ekonomik kayıplara neden olan tehlikeli bir hastalıktır. Yapılan antibiyotik tedavileri artık bu hastalığa karşı daha az etkili olmakla birlikte, antibiyotikler arı ürünlerinde kalıntı bırakması nedeniyle kullanımı yasaklanmıştır. Bu nedenle antibiyotik yerine hastalığı yenmek için yeni alternatiflerin araştırılması, özellikle organik veya yağ asitleri, prebiyotikler, bitkisel esansiyel yağlar gibi doğal içeriklerin çalışmalarda kullanılması tüm dünyada büyük bir hız kazanmıştır.

Propolis etanolik ekstratının (PEE), *P. larvae*'ya karşı AFB'nin potansiyel kontrolüne olan etkisi çalışılmış, en az %50 değeri arılar için toksik olmadığı, beslenme ile verilen uygulamada 21-42 gün sonra *P. larvae*'nin önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Antunez vd., 2008). González ve Marioli (2010), yaptıkları bir çalışmada ise 10 adet bitkisel türün dört ayrı yerden temin edilen *P. larvae* suşlarına karşı (*Achyrocline satureioides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus cinerea*, *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Lippia turbinata*, *Marrubium vulgare*, *Minthostachys verticillata*, *Origanum vulgare*, *Tagetes minuta* ve *Thymus vulgaris*) bitkisel su ekstratları (buhar distilasyonu sonrası kalan su ve kaynatılarak hazırlanan öz) ile yine bu bitkilerin esansiyel yağları, *P. larvae* büyüme üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır. Gende vd. (2010) yapılan başka bir çalışmada tetrasiklin hidroklorür aktivitesi ve tarçın (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) uçucu yağı, Arjantin'nin değişik yörelerinden izole edilmiş *Paenibacillus larvae*'nin altı farklı izolatlarına karşı test edilmiştir. Tetrasiklin hidroklorür ortalama MIC değerleri, 41.67 ± 19.17 ug/mL iken, tarçın MIC değerleri 3.67 ± 1.80 ug/mL bildirilmiştir. Kuzyšinová vd. (2013), iki farklı çevreden alınan kovanlarından iki *P. larvae* suş (CCM4488 ve PL02) izole etmiştir. Bu suşlara karşı adaçayı (*Salvia officinalis*), anason (*Pimpinella anisum*), keklikotu (*Origanum vulgare*), kimyon (*Carum carvi*), kekik (*Thymus vulgaris*), biberiye (*Rosmarinum officinalis*), karanfil (*Syzygium aromaticum*), papatya (*Chamomilla recutita*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*) gibi bitkisel esansiyel yağların etkinliği incelenmiştir. Özkırım vd. (2012)'e yayınladığı bir çalışmada 10 farklı bitki ekstraktını test etmiş, *Rosmarinus officinalis* ve *Origanum onites*'in *Paenibacillus* sp.'ye karşı en etkili olarak belirlemişlerdir. Nafea vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Paenibacillus larvae* suşuna etkili 4 farklı bal (narenciye, karanfil, pamuk ve kafor) tipi farklı konsantrasyonlarda (%5, %10 ve % 20) antibakteriyel aktivite incelenmiş, %20'lik konsantrasyonların en etkili olduğu, en yüksek antibakteriyel aktivitesi pamuk (27,75 mm) balında var olduğu bildirilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Nisan 2013- Nisan 2014 yılları arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi. Çalışma grubu Rize ilinin çeşitli ilçelerine ait ve Samsun-Veteriner Araştırma Merkezi'nden gelen hastalıklı olduğu düşünülen bal ve petek örneklerinden izole edilen mikroorganizmalarla yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Bal ve petek örneklerinin incelenmesi için kullanılan laboratuvar gereçleri; Otoklav, inkübatör, karıştırıcı (vorteks), pastör fırını, çalkalayıcı su banyosu, pH metre, mikro ve makro santrifüjler, buzdolabı, derin dondurucu (-20 °C ve -80 °C), sınıf II güvenlik kabineti, hassas terazi, saf su cihazı, ışık mikroskopları (koloni mikroskobu ve olimpus Bx51 araştırma mikroskobu görüntü analiz sistemli araştırma mikroskobu), PCR cihazı, elektroforez ve görüntü analiz sistemi, bunzen beki, çeşitli cam malzemeler (cam fanus, cam pipetler, pastör pipeti, vida kapaklı tüpler, mavi kapaklı şişeler, mezür, erlenmayer, lam, lamel, cam baget), petri kapları, mikro ve makro pipet uçları, eppendorf tüpleri, PCR tüpleri, eküvyon çubukları, termometre, mikro kuyucuklu eliza plakaları.

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler değişik firmalardan sağlandı. Mueller-Hinton agar (MHA) ve sıvı (MHB), brain heart infusion agar (BHIA) ve sıvı (BHIB), beef ekstrakt (BE), yeast ekstrakt (YE), malt ekstrakt (ME), sitrat agar, (Merck, Detroit, USA) besiyerleri ticari olarak elde edildi. Kimyasal sarf malzemesi olarak; Dextroz (D-glukoz), sodyum klorür (NaCl), maltoz, pepton, potasyum nitrat (KNO₃), sodyum piruvat, asetik asit, potasyum nitrat (Merck), di-potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄) (Sigma), potasyum iyodür, safranin, sodyum hidroksit (NaOH), esculin, metil kırmızısı, n-naftol, hidroklorik asit (HCl), potasyum hidroksit (KOH),

gliserol, magnezyum klorür (MgCl), sodyum sitrat, izoamil alkol, potasyum asetat, tween 20 (Merck) firmalarından sağlandı. Etil alkol teknik kullanıldı.

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

2.1.3.1. Mueller-Hinton Broth, Yeast Extract, Potassium Phosphate, Glucose, Pyruvate, Agar ve Broth besiyerleri (MYPGP)

Mueller-Hinton Broth	10 g
Yeast Extract	15 g
K ₂ HPO ₄	3 g
Glukoz	2 g
Sodyum piruvat	1 g
Agar	14 g
dH ₂ O	1000 mL (pH 6,8 ± 0,2)

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda tartılarak 1000 mL distile su içinde çözüldü. 1.1 atm basınçta, 121 °C’de 20 dakika otoklav edildi. Otoklavlanan besiyeri, 90 mm’lik steril petrielerin herbirine 25 mL olacak şekilde döküldü. Besiyeri donduktan sonra kullanılacak süreye kadar buzdolabında +4 °C’de bekletildi.

Aynı miktardaki karışımdan agar ilave edilmeden hazırlanan sıvı besiyeri 1.1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklavlandıktan sonra steril vida kapaklı tüplere tevzi edildi. Kullanılacak süreye kadar oda sıcaklığında bekletildi (Dingman ve Stahly, 1983; Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013).

Hazırlanan her iki besiyeride genel üretim besiyeri, antibiyogram ve antibakteriyal madde etkinliğini ölçme çalışmalarında kullanıldı.

2.1.3.2. Muller Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması

Merck’in toz olarak bulunan hazır besiyerinden 27 g tartılıp 1000 mL distile su içinde çözüldü ve 1.1 atm basınçta 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilizasyon işlemine

tabii tutuldu. Steril edilen besiyeri, steril petri kaplarına herbirine 25 mL gelecek şekilde döküldü. Petriler donduktan sonra kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C’de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi (Bilgehan, 2004). Hazırlanan besiyeri genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

2.1.3.3. Nişasta (Starch) Besiyerinin Hazırlanması

Brain Heart Infusion agar besiyeri, üretici firma tarafından litrede belirtilen miktarlarda tartılarak içerisine %0,4 oranında çözümlenmiş nişasta eklenip distile suda karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 1.1 atm basınçta, 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Hazırlanan besiyeri steril petrilere 20 mL olacak şekilde dağıtıldı. Kullanacağı süreye kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). Bakteri izolatların amilaz enzimine sahip olup olmadığını saptamak amacıyla kullanıldı.

2.1.3.4. Nitrat Besiyerinin Hazırlanması

Beyaz Ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
KNO ₃ (Potasyum Nitrat)	1 g
dH ₂ O	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda tartılıp üzerine 1000 mL distile su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Vida kapaklı tüplere 4 mL miktarında dağıtıldı ve 1.1 atm basınçta, 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi. Nitrat besiyeri, bakterilerin nitratı indirgeyebilme yeteneğini ölçmek için kullanıldı.

2.1.3.5. Hareket Besiyerinin Hazırlanması

Sığır Eti (Beef) Özütü	3 g
Pepton	5 g
Agar	3 g
dH ₂ O	1000 mL

Karıştırılıp, ısıtılarak eritilir. Tüplere 5 mL dağıtılıp 1.1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). İzolatların hareket yeteneklerini belirlemede kullanıldı.

2.1.3.6. Voges Proskauer Besiyerinin Hazırlanması

Pepton	7 g
Glukoz	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
dH ₂ O	1000 mL (pH: 6.9)

Yukarıdaki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp 1000 mL distile su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Çözünen besiyeri farklı pH’lara (pH 5.8, 6.8 ve 7.7) ayarlandı, 2 mL miktarında tüplere aktarıldı ve otoklavda steril edildi. 1.1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). Bakterilerin karbohidratları farklı pH’larda butandiol yolunu kullanıp kullanmadıklarının belirlenmesinde kullanıldı.

2.1.3.7. Eskulin Testi

Heart muscle, infussion	10 g
Peptic digest of animal tissue	10 g
Sodyum chloride	5 g
Eskulin	1 g
Distile su	1000 mL

Yukarıdaki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp 1000 mL distile su ilave edilerek çözülmesi sağlandıktan sonra 2 mL olarak vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Otoklavda steril edildikten sonra kullanıldı (Koneman vd., 1997). Bakterilerin eskulini parçalayabilip parçalayamadığının belirlenmesi için kullanıldı.

2.1.3.8. Sitrata Agar Besiyerinin Hazırlanması

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda 22,5 g granül halindeki besiyeri tartılıp 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve tüplerin her birine 5 mL olacak şekilde dağıtıldı. 121 °C'de 1.1 atm basınç altında 15-20 dakika otoklav edildikten sonra yatık olarak donduruldu ve kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). İzole edilen bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitrati kullanıp kullanmadıklarını test etmek amacıyla kullanıldı.

2.1.3.9. Dehidroksiaseton Besiyerinin Hazırlanması

Yeast Ekstrakt	1g
Gliserol	1,2 g
Agar	2 g
dH ₂ O	100 mL

Yukarıdaki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp 100 mL distile su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Çözündükten sonra besiyeri steril petrilere 20 mL olacak şekilde dağıtıldı ve 1.1 atm basınçta 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi (Vallat vd., 2012).

2.1.3.10. Karbonhidratlardan Asit Üretim Testi

Tripton	5 g
Yeast extract	15 g
K ₂ PO ₄	3 g
Alkolik bromocresol purple	%0,04
dH ₂ O	1 L

J broth besiyeri hazırlandı, 1.1 atm basınçta 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi. Test

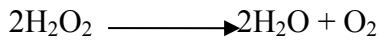
edilecek karbohidratın %10 ya da %5'lik stok solusyonları distile suda hazırlandı. Filtre ile (45 µm por çaplı) steril edildi. Test edileceği zaman 9 mL J brot 1 mL karbohidrat (maltoz, laktoz, trehaloz, ksiloz, glukoz) stok solusyonu steril şartlarda karıştırılarak 0.5 mL olarak steril ependorf tüplere aktarılarak kullanıldı (Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013). Bakterilerin hangi şekerleri kullanabildiklerini öğrenmek için hazırlandı.

2.1.3.11. Oksidaz Testi

Bu test, aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin ayırt edilmesi için kullanıldı. Bunun için; 0,1 g miktarında 1,4-fenilendiamonyum diklorür 10 mL distile su içerisinde çözüldü ve eppendorf tüplerine 1 mL şeklinde dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de aliminyum folyaya sarılı şekilde bekletildi (Koneman vd., 1997).

2.1.3.12. Katalaz Testi

Katalaz enzimi yapan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırırlar. Bu nedenle bakterinin katalaz enzimi üretip üretmediğinin belirlenmesinde kullanılır (Koneman vd., 1997).



2.1.3.13. Antibiyogram Besiyeri

Bu amaçla MYPGP agar ve sıvı besiyeri kullanıldı. Kullanılan antibiyotik diskleri ticari (12 adet) olarak temin edilmiştir.

2.1.3.14. Antimikrobiyal Aktivite Besiyeri

Bu amaçla MYPGP agar ve sıvı besiyeri kullanıldı. Toplam 31 farklı bitkiye ait metanol ekstraktları izole edilen bakterilere karşı agar kuyucuk metodu ile test edildi.

2.1.4. Kullanılan Boyalar ve Ayıraçlar

2.1.4.1. Gram Boyama Seti

A) Kristal viyole stok solüsyonu (%90-95 boya içeren)hazırlamak için 40 g Kristal viyole tartıldı ve 400 mL Etanol (%95) ile bir cam şişede eritildi, etiketlendi ve oda ısısında saklandı.

Amonyum okzalat solüsyonu (%1'lik) hazırlamak için 16 g Amonyum okzalat (analitik saflıkta) ve 1600 mL distile su bir kahverengi cam şişede karıştırılır ve eritilir. Etiketlendikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Her iki solüsyonun raf ömrü 1 yıldır. Kristal viyole stok solüsyonunun 40 mL'si Amonyum okzalat solüsyonunun 160 mL'si ile karıştırılarak etiketlendi ve kullanıldı.

B) Lügol solüsyonu

İyot solüsyonu nişasta hidroliz ve gram boyama testi için hazırlandı. 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür havanda birlikte ezilip 300 mL distile su ile homojenize edilerek çözünmesi sağlandı. Karanlık kapaklı şişeye alındı ve tam çözünmesi için bir gece bekletildi (Bilgehan, 2004).

C) Alkol (%96'lık etil alkol): Kristal viyole ile boyanmış, lügol solüsyonu ile mordalanmış preparatlarda renk giderilmesi için kullanıldı

D) Safranin solüsyonu: Porselen kroşede 2,5 g safranin 10 mL alkol (%95) ile çözülüp koyu renk kapaklı şişeye aktarıldı. Üzerine 100 mL distile su ilave edilerek tamamlandı. Bir gün bekletildikten sonra zıt boya olarak gram boyamada kullanıldı (Koneman vd., 1997).

2.1.4.2. Nitrat Ayıraçları

Ayıraç A: 0,5 g Alpha Naphthylamine, 100 mL Asetik Asit (SN) %30

Ayıraç B: 0,8 g Sülfanilik Asit, 100 m Asetik Asit (SN) %30

Ayıraç C: Çinko Tozu. Tüm ayıraçlar için gerekli maddeler karıştırılıp +4 °C'de buz dolabında saklandı.

2.1.4.3. Voges-Proskauer Ayıraçları Hazırlanması

A Ayıraç : 5 g Alpha Naphthol, 100 mL Etil Alkol (% 95'lik)

B Ayıraç : 10 g Potasyum Hidroksit, 100 mL Distile Su.

Her iki ayıraç da karıştırılıp çözüldükten sonra kullanılacağı süreye kadar + °C'de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.1.4.4. Fehling Solüsyon'unun Hazırlanması

Solüsyon A: 10 g Sodyum Hidroksit, 35 g Potastum Sodyum Tartarat, 50 mL Distile su

Solüsyon B: 7 g Bakır Sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 50 mL Distile su.

Her iki solüsyonda test esnasında taze hazırlanıp kullanıldı (Koneman vd., 1997).

2.2. Metod

2.2.1. Numunelerin Toplanması

Numuneler; Rize Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü ve Samsun Veteriner Araştırma Merkezi'nden gelen hastalık teşhisi konmuş çerçevesi petek örneklerinden oluşmaktadır. Laboratuvarımıza ulaşan numuneler test edileceği süreye kadar oda ısısında bekletildi. Ekim için peteklerin kararmış gözeneklerinden larva, ergin arı ve bal örnekleri toplandı (Şekil 17).



Şekil 17. Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı şüpheli petek örnekleri.

2.2.2. Numunelerin Hazırlanması

Larva Örneklerinin Hazırlanması: Steril koşullarda steril pens ve makas yardımıyla 5 adet larva alınarak 5 mL steril distile su içinde karıştırıcı yardımıyla suspanse edildi. Katı larva kısımları steril cam baget yardımıyla parçalanarak homojen hale getirildi.

Ergin Arı Örneklerinin Hazırlanması: Larva safhasını tamamlamış ancak petek gözünden çıkamamış ergin arılar numune olarak kullanıldı. Bu amaçla 5 adet ergin arı %70'lik metanolde 3 dakika bekletildikten sonra 3 kez steril distile sudan geçirilerek yıkandı. Daha sonra 5 mL steril distile su ilave edilerek homojenizatörde parçalandı.

Bal Örneklerinin Hazırlanması: Bazı örneklerde ise çerçevelerin yüzeyinde bulunan bal, numune olarak kullanıldı. Bu amaçla 5 gram bal örneği 5 mL steril distile su ile karıştırıldı.

Numunelerin hazırlanması aşamasından sonra tüm numunelerde aynı yol izlendi. Örnekler 80 °C'de 10 dakika su banyosunda vejetatif formların eliminasyonu için ısıya maruz bırakıldı. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda ısısında soğuyana kadar bekletilip 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısım atılarak kalan pellet kısmı karıştırıcıda homojen hale getirildi. Hazırlanan örneklerden birer adet MYPGP ve Müller-Hinton Agar besiyerlerine ekim yapılması için kullanıldı. Tekrar ekim gerekebilir düşüncesiyle kalan örnekler -20 °C'de saklamaya alındı (Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013).

2.2.3. MYPGP Agar ve MHA Besiyerlerine Ekim

Isıya maruz bırakılıp işlenmiş örneklerden sporlu bakteri (*Paenebacillus* sp.) üretimi için MYPGP ve Müller-Hinton Agar besiyerlerine 100 µL örnek alınıp aseptik şartlarda çizgi ekimi yöntemi ile ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan plaklar 37 °C’de 3-4 gün %5’lik CO₂’li ortamda (mumlu kavanoz tekniği kullanılarak) etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.2.4. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması

İnkübasyondan sonra MYPGP Agar üzerinde üreme gösteren bakteriyal kolonilerin morfolojisi ve gram boyanma özellikleri araştırıldı. Gram pozitif sporlu basil gözlenen kültürler, saf kültür eldesi için MYPGP agar besiyerine tek koloni alınarak pasajları yapıldı ve aynı şartlarda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra saf olarak izole edilen kültürler, steril ependorf tüplerine %20 gliserol içeren 1 mL MYPGP sıvı besiyerine 6-7 öze dolusu bakteri alınarak stok solüsyonları hazırlandı ve numaralandırılarak -80 °C’de saklamaya alındı. Ayrıca DNA izolasyonu için de saf olarak izole edilen kültürlerden, 6-7 öze dolusu bakteri alınarak steril ependorf içine distile suda çözüldü ve 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılarak pellet kısım kullanılacağı süreye kadar -20 °C’de saklandı.

2.2.5. Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.5.1. Gram Boyama

Gram boyama bakterilerin tanımlanma ve sınıflandırılması için kullanılan en önemli boyama yöntemidir. Bu bir farklılaştırıcı boyama olup bakterileri gram pozitif ve gram negatif olarak ikiye ayırır. Gram negatif boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Elde edilen izolatlardan her biri için bakteriyal smear hazırlandı ve alevle 3 kez tespit edildi. Hazırlanan smear 1 dakika kristal viole ile muamele edildi ve dH₂O ile yıkandı. Daha sonra 1 dakika lugol ile muamele edildi ve Aseton-Alkol ile renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra renk kaybını önlemek için dH₂O ile yıkayıp 1 dakika safraninle

muamele edildi ve tekrar dH₂O ile yıkandı. Boyamalar kurutma kağıdı ile kurutuldu ve mikroskop ile 1000x büyütmede incelendi. Mor renkle boyanan bakteriler gram pozitif, pembe renge boyanan bakteriler ise negatif olarak değerlendirildi. Hücrelerin içinde boyanmayan kısımlar ise spor olarak belirlendi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.2. Katalaz Testi

Katalaz testi ile bakterilerin katalaz enzimi üreterek hidrojen peroksidi parçalayıp parçalamadıkları tespit edilir. Bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂), lam üzerine damlatıldı ve üremekte olan kültürden bir öze dolusu alınarak hidrojen peroksitle karışımı sağlandı. Çoğu aerobik bakteriler katalaz enzimi aracılığıyla, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak köpük oluşumuna neden olur. katalaz deneyinde gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilir (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.3. Oksidaz Testi

Solunumlarında oksidatif fosforilasyon yapan bakteriler bu reaksiyonlarda oksidaz enzimi kullanırlar. Hazırlanan çözeltiden lam üzerine bir miktar damlatıldı ve üzerine taze kültürden öze yardımı ile alınan bakteriler bırakıldı. Kurutma kâğıdında 5-30 sn. içerisinde mavi-mor renk oluşumu testin pozitif, bu süreç içerisinde herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemesi ise testin negatif olduğunu göstermektedir (Benson, 1985; Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.4. Nişasta (Starch) Hidrolizi Testi

İncelenecek bakterilerin 24-48 saatlik kültürlerinden çizgi ekimi şeklinde ekimler nişasta agar petrilere yapıldı ve petrilere 4-5 gün 37 °C'de %5'lik CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra nişasta ayırıcı olan lugol petri kutusunun yüzeyini kaplayacak şekilde ilave edilip 3 dakika bekletildi. Koloni etrafının mavi-siyah renge boyanmamış olması nişastanın, amilaz enzimine sahip bakterilerce parçalanması yeteneğine sahip olduklarını gösterdi. Sonuç pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişimi olmayan örnekler ise negatif olarak kabul edildi (Bilgehan, 2004).

2.2.5.5. Nitrat Redüksiyon Testi

Bunun için test edilecek bakterilerin 24-48 saatlik kültürlerinden bir öze dolusu alınarak nitrat besiyerine ekimleri yapıldı ve 37 °C'de her gün üremeleri kontrol edilmek üzere 5 gün inkübe edildikten sonra ayıraçları damlatılarak nitratın nitrite, nitritin azot gazına kadar olan geçiş dönümleri test edildi. Bunun için inkübasyonu tamamlanmış kültürlerle sırasıyla önce A sonra B ayırıcından 1'er mL eklendi, 30 sn içinde kırmızı bir renk oluşması nitratın bakteriler tarafından redükte edildiği ve ortamda nitritlerin var olduğunu gösterdi, deney sonucu pozitif olarak değerlendirildi. Bu süre içerisinde renk değişimi olmayan örneklere ise bir miktar çinko tozu ilave edildi. Çinko tozu nitratları nitrite redükte eder. Tozun eklenmesiyle 30 sn içinde kırmızı renk oluşumu, besiyerindeki nitratların bakteriler tarafından redükte edilmemiş, eklenen çinko tarafından redükte edilmiş olduğunu gösterir ki buda nitrat redüksiyon deneyinin negatif olarak değerlendirilmesiyle sonuçlandı. Çinko tozun eklenmesine karşın yine renk oluşmazsa bu kez ortamda nitratın kalmamış olduğu nitratların bakteriler tarafından nitritlerdende öteye NH₃, NO ve N₂ gazlarına dönüştürülmüş olduğu anlaşıldı. Bu durumda bakterilerin nitrat redüksiyon deneyi ise pozitif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.6. Voges-Proskauer Testi (VP)

Glukozun fermantatif parçalanması esnasında oluşan pürivik asit bir kısım bakterilerde bulunan enzimatik sistemlerle daha ileriye doğru parçalanarak son ürün olarak aseton oluşturur. Özel ayıraçlarla ortaya çıkan bu ürünü oluşturan bakteriler voges-proskauer olumlu olarak kabul edilir. Farklı pH'da (5.8, 6.8 ve 7.7) oluşturulan voges-proskauer besiyerine taze bakteri kültürlerinden öze yardımı ile aseptik şartlarda ekimler yapıp 37 °C'de 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonları tamamlanan kültürlerle voges-proskauer ayıraçlarından ilk olarak yaklaşık 0,6 mL A ayıracı (a-naftol) ve hemen arkasından 0,2 mL B ayıracı (potasyum hidroksit) damlatıldı ve besiyerinin havayla temas etmesi için tüplerin ağzı açık şekilde iyice çalkalanıp 10-15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüplerde pembe-kırmızı rengin oluşması sonucun pozitif olduğunu açık kahverengi halka oluşumu ise sonucun negatif olduğunu gösterir (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.7. Hareket Testi

İzolatların hareketli olup olmadığının araştırılması için hareket testi yapıldı. Elde edilen izolatların saf kültürlerinden iğne öze ile alınarak, dik olarak hazırlanmış hareket besiyerine batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapıldı. Kültürler 37 °C’de 2-3 gün inkübasyona bırakıldı. Yumuşak agarda ekim çizgisi boyunca yayılma şeklinde gözlenen üremeyi hareket pozitif olarak değerlendirildi. Sadece dikine doğru üreme yapanlar ise negatif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.8. Sitrat Kullanım Testi

Sitrat agar besiyeri, sitratları tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğindeki bakterilerin belirlenmesinde kullanılan bir besiyeridir. Organizmalar sitratı hücre içine alan enzim olan permeaz ve parçalayan enzim olan sitrat liyaza sahipse Simmon sitrat agarda alkali bir reaksiyon oluşturur. Besiyerinde bulunana bromthmol mavisi ayrıcının yeşil rengi maviye döner.

Taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınan koloniler sitrat besiyeri yüzeyine ekimleri yapıldı. 37 °C’de 3-4 gün inkübeye bırakıldı. İnkübasyon sonucunda yeşil olan sitrat besiyerinin renginin maviye dönüşmesi sonucun pozitif, renk değişimi görülmemesi sonucun negatif olduğunu gösterdi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.2.5.9. Farklı Sıcaklıklarda Üreme Özelliği

Bakteri izolatların 24-48 saatlik kültürlerden her birinden 3'er adet MYPG sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. Her bir izolattan birer adeti 35, 42 ve 45 °C’de olmak üzere 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sıcaklıklarda üreme özellikleri olup olmadıkları araştırıldı (Koneman vd., 1997)

2.2.5.10. Dihydroxyaceton Testi

Hazırlanan besiyeri üzerine taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınan kolonilerin ekimleri yapıldı. 37 °C’de 3-4 gün inkübeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra

besiyeri üzerinde üreyen bakterilere taze hazırlanmış solüsyon A ve solüsyon B birebir oranında karıştırılıp üremiş koloniler üzerine ilave edildi. Bir iki dakika içinde kolonilerin renginin sarıdan kırmızı bakır rengine dönüşmesi testin pozitif olarak değerlendirildi (Claus ve Berkeley, 1986).

2.2.5.11. Karbonhidratlardan Asit Üretme Testi

Hazırlanan sıvı besiyerine taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınan koloniler bırakıldı. 37 °C’de yaklaşık 14 gün inkübeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra karbonhidratlı besiyerlerinin koyu rengi sarıya dönüşmesi bakterinin o karbonhidratı kullanıp asit ürettiklerini gösterir ve sonuç pozitif olarak kaydedilir. Eğer sıvı besiyerinde herhangi bir renk değişimi gözükmezse sonuç negatiftir (Vallat vd., 2012; de Graaf, 201).

2.2.5.12. Eskulin Testi

Bakteriler MYPGP besiyerinde 24-48 saatlik kültürlerinden bir öze dolusu steril şartlarda eskulin sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. 24-72 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Üreyen kültür UV lambası (UV illuminate) altında tutulduğunda floresan vermeyen kültürler pozitif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

Paenibacillus larvae’nin Bergey’s Manuel of Determinative bakteriyolojide verilen bazı kimyasal özellikleri Tablo 6’da verilmiştir (Krieg ve Holt, 1984).

Tablo 6. *Paenibacillus larvae*’nın bazı kimyasal özellikleri.

Karakteristik Özellikler	<i>P. larvae</i>	<i>P. alvei</i>	Karakteristik Özellikler	<i>P. larvae</i>	<i>P. alvei</i>
Oksidaz	ND	+	Nişasta Hidrolizi	-	+
Katalaz	-	+	Nitrat Redüksiyon	D	-
Sitrat	-	-	Glukoz	+	+
Eskulin	+	+	Maltoz	D	-
Dehidroksiaseton	-	+	Trehaloz	+	-
Voges-Proskauer	-	+	Ksiloz	-	-
pH<6	D	+			
PH>7	-	-			

ND: sonuç bildirilmemiş, D: Değişken, +: Test olumlu, -: Test olumsuz.

2.2.6. Antibiyogram Testi

Çalışmada Gram pozitif bakteriler için seçilmiş antibiyotik diski panelinden 12 adet ilaç seçilmiş ve bunların diskleri ticari olarak temin edilmiştir (Tablo 7).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için izolatlar MYPGP agar besiyerinde bir gecelik kültürleri gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra her bir izolatdan, steril serum fizyolojik içerisinde bulanıklık değeri 0,5 McFarland olacak şekilde sulandırılmaları hazırlandı. Manuel olarak hazırlanıp steril petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülmüş MYPGP Agar (pH 7.2-7.4) yüzeyi kurutuldu. Steril bir eküvyon çubuğu yardımı ile bulanıklılığı ayarlanmış kültürlerin MYPGP agar besiyeri yüzeylerine yayma ekimleri yapıldı. Dört derece sıcaklıkta saklanmakta olan antibiyotik diskleri alınarak agar yüzeyine temas edecek şekilde ve disk aralarında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. Disklerin yerleştirilmesinden sonra petri kapları 36 °C'de %5 CO₂ varlığında bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilme yapıldı. Ölçülen zon çapları EUCAST (2014) kitapçığındaki ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak, bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı" veya "dirençli" olarak değerlendirildi.

Tablo 7. Test edilen antibiyotik diskleri ve içeriği.

Antibiyotik Adı	Kısaltması	Doz İçeriği (µg)	Dirençli (R)	Orta (I)	Duyarlı (S)
Gentamisin	CN	10	≤12	13-14	≥15
Ceftazidim	CAZ	10	≤14	15-17	≥18
Sefuroksim	CXM	30	≤14	15-17	≥18
Seftazolin	KZ	5	≤14	15-17	≥18
Kloramfenikol	C	30	≤12	13-17	≥18
Amoksisilin klavunat	AMC	20/10	≤19	-	≥20
Penisilin	P	10	≤14	-	≥15
Eritromisin	E	15	≤13	14-22	≥23
Trimetoprim - Sulfametoksazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
Tetrasiklin	TE	30	≤14	15-18	≥19
Amikasin	AK	30	≤14	15-16	≥17
Ampilisin	AMP	10	≤16	-	≥17

2.2.7. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivite Testi

2.2.7.1. Bitki Ekstraktlarının Temini

Bitkilerin mevsiminde toplanması, kurutulması, tür tanımlarının yapılması KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ile KTÜ Orman Fakültesi ve Orman Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerince yapıldı. Bitkilerin metanol ekstraksiyonları KTÜ Fen Fakültesi Kimya Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ekstre edilmiş ve toz halinde gelen maddeler miligram olarak tartılıp DMSO içinde çözüldü ve toz halinde laboratuvarımıza gönderilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Test edilecek bitki ekstraktlarının isimleri ve konsantrasyonları.

Sayı	Bitki İsimleri	Stok sol. (µg/mL)	Sayı	Bitki İsimleri	Stok sol. (µg/mL)
1	* <i>Thymus cilicicus</i>	372 800	17	<i>S. virescens</i>	88 650
2	* <i>T. spicata</i>	55 600	18	<i>S. laevipila</i>	48 500
3	* <i>Clinopodium umbrosum</i>	306 825	19	<i>S. intermedia</i>	82 700
4	* <i>Petrorhagia saxifraga</i>	274 800	20	<i>S. ruralis var. ruraliformis</i>	123 000
5	* <i>Dichistidium capillosum</i>	62 530	21	<i>Tortella densa</i>	153 000
6	* <i>Ziziphora clinopodios</i>	188 750	22	<i>T. tortuosa</i>	817 000
7	* <i>Sideritis libanotica</i>	478 800	23	<i>T. humulis</i>	87 200
8	** <i>Gypsophila glandulosa</i>	169 560	24	<i>Grimmia orbicularis</i>	25 350
9	<i>Polytrichum formosum</i>	118 100	25	<i>Grimmia alpestris</i>	66 750
10	<i>P. commune</i>	177 950	26	<i>Schistidium popillosum</i>	91 150
11	<i>Calliergonella cuspidata</i>	132 200	27	<i>S. trichodon</i>	31 430
12	<i>C. lindbergii</i>	371 800	28	<i>Diplophyllum taxifolium</i>	95 700
13	<i>Metzgeria conjugata</i>	371 800	29	<i>Leucobryum glaucum</i>	29 460
14	<i>Isoetes alopecuroides</i>	127 500	30	<i>Dicranum majus</i>	73 960
15	<i>Eurhynchium striatum</i>	263 600	31	<i>Hedwigia ciliata</i>	57 100
16	<i>Syntrichia calcicola</i>	46 200			

2.2.7.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri olup olmadığının ölçülmesinde agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı (Ridderhof vd., 2003; Perez, 1990). Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürleri MYPGP agar içine (Difco, Detroit, MI) 48 saat çoğaltıldı. Daha sonra steril serum fizyoloji içinde yaklaşık olarak 10^6 kob/mL (koloni oluşturan birim = colony forming unit) şeklinde dilüsyonları hazırlandı. Önceden hazırlanmış MYPGP agar besiyeri üzerine steril eküvyon çubuklarıyla her bir bakteri izolatının ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam

boru yardımıyla 2 cm aralıklarla, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa stok bitki ekstraktı çözeltilerinden 50 mikrolitre damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petripler 24-48 saat mumlu kavozda 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zonları ölçüldü. Standart kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg) ve standart çözücü (metanol) kontrolü kullanıldı.

2.2.8. İzolatların Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.8.1. Genomik DNA İzolasyonu

İzolatların 16-24 saatlik gece kültürleri distile sıvı içerisinde hazırlandı ve her bir izolat ependorf tüpe aktarılarak aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı (Sambrook, 1989).

- Gece kültürleri 13000 rpm’de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Pelletlerin üzerine 500 µL TE tamponu eklenerek (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) çözüldü.
- Her bir tüpe 50 µL lizozim enzimi konularak vortekslendi (1/4 mercimek büyüklüğünde lizozim).
- Tüpler 37 °C’de 1 saat bekletildi.
- Her bir tüpe 50 µL %10’luk SDS eklenerek 5-6 defa alt üst edildi ve 37 °C’de 30 dakika bekletildi.
- Sonra her tüpe 3 M’lık 1/10 hacim sodyum asetat (Na-Ac pH 5.2) eklendi ve 65 °C’de 10-30 dakika beklenerek her 10 dakikada bir alt üst edildi.
- Her tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi, vortekslendi ve 5 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi.
- Tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım temiz ependorf tüplerine aktarıldı.
- Tüplere tekrar 500 µL kloroform ilave edildi ve tüpler alt üst edilerek 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı.
- Tüplere tekrar 500 µL kloroform ilave edildi. Tüpler alt üst edilerek 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Böylece bu işlem üç defa tekrarlandı. Bu tüplere 1/10 hacim sodyum asetat ve 2 hacim (yaklaşık 900 µL) %96’lık soğuk EtOH (etil alkol) ilave edilerek -20 °C’de 45 dakika bekletildi.

- Tüpler 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı.
- Kalan pelletlerin üzerine 500 µL %70’lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Pelletler 37 °C’de kurutulduktan sonra 75 µL TE içerisinde çözüldü.

2.2.8.2. Genomik DNA’ların Agaroz Jelde Yürütülmesi

Genomik DNA yürütülmesi işlemi için eriyik jel hazırlandı. Eriyik jelin mikrodalga fırınında çözünmesi sağlandı. Jel tankının parçaları birleştirilerek eriyik jelin döküleceği yer hazırlandı ve kuyucukların oluşması için jel tarağı takıldı. Eriyik jel fırınından çıkarıldıktan sonra 50 °C’ye kadar soğutulunca içerisine 0,5 µL etidyum bromür (0,5 µg/mL) ilave edildi ve homojen şekilde çözünmesi sağlandı. Soğuyan eriyik jel, jel kalıbına döküldü ve 15-20 dakika katılaşması için bekletildi. Agaroz jel katılaştıktan sonra jel tarağı dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra agaroz jel elektroforez tankının içerisine düzgünce yerleştirildi ve jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi. Her bir izolatanın DNA solüsyonundan 7 µL alındı ve 3 µL 10X yürütme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 100 V’luk elektrik alanda 25 dakika yürütüldü. Yürütme sonucunda izolatlardan elde edilen genomik DNA’lar UV ışığı altında görüntülendi. İzolatların DNA bantları agaroz jel üzerinde görüldükten sonra DNA solüsyonları üzerine 3 µL RNA az ilave edildi ve 37 °C’de 1 saat bekletildi. Daha sonra DNA’lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.2.8.3. 16S rRNA Geninin PCR ile Arttırılması

16S rRNA genleri her bir izolattan elde edilen genomik DNA’dan 27F (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’) ileri ve 1492R (5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğatıldı. Primerler MACROGEN (Hollanda) firmasından elde edildi. PCR reaksiyon şartları; 12 ng kalıp DNA, 5 µL 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1U *Tag* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP olacak şekilde hazırlandı ve bu karışımı steril saf su ile 50 µL’ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µL’lik tüplerde ve Thermocycler (Eppendorf)’de gerçekleştirildi.

Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri;

1. 94 °C 5:00
2. 94 °C 0:45
3. 50 °C 1:00
4. 72 °C 1:30
5. 35 döngü 94 °C 0:45
6. 72 °C 1:30
7. 4 °C

Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µL'si %1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/mL) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntüledi. Elde edilen PCR ürünleri sekans edilmek üzere MACROGEN (Hollanda) firmasına gönderildi. Sekanslama işleminde ise 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primerleri kullanıldı (MACROGEN).

2.2.8.4. Veri Analizi

Elde edilen bütün 16S rRNA dizileri BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile düzenlendi ve NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak GenBank'ta yer alan diğer 16S rRNA dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. 16S rRNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak ClustalW programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA (Tamura vd., 2011, version 5) filogenetik programı yardımıyla neighbor-joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 5.0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışma Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı, KTÜ-Eczacılık Fakültesi, KTÜ-Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, KTÜ-Mühendislik Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Rize İl Müdürlüğü destekleriyle, RTEÜ-Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvar'ında yapılmıştır.

Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni düşünülen örnekler Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü laboratuvarından temin edilmiştir. Bu amaçla hastalık etkeni bal, arı, petek ve larva örnekleri kullanılmıştır (Tablo 9). Toplam 9 örnek uygun şekilde homojenize edilerek kültür için hazırlandı ve 100 mikrolitresi MYPGP Agar besiyerine tek koloni düşürme metoduyla ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan plaklar %5'lik CO₂'li ortamda 37 °C'de 3-4 gün etüvde inkübasyona bırakıldı.

Tablo 9. AFB etkeni düşünülen numuneler, orjinleri ve elde edilen izolatlar.

Numune sayısı	Alındığı yer	Örnek Türü	İzolat No (N=21)
1	Fındıklı (TİM)	Bal Larva	PB1a1, PB1a2 PB1b, PB1c
2	Rize (TİM)	Bal Larva	PB2a, PB2b, PB2c PB2d
3	Güneysu (TİM)	Yetişkin Arı Larva	PB3.2a, PB3.2b2 PB3.1a, PB3.3a1 PB3.3b, PB3.3b1
4	Samsun (VAM)	Larva	PB4
5	Samsun (VAM)	Larva	PB5a, PB5b
6	Samsun (VAM)	Yetişkin Arı	PB6a, PB6b
7	Fındıklı (TİM)	Larva	-
8	Fındıklı (TİM)	Yetişkin Arı	-
9	Pazar (TİM)	Larva	PB9a, PB9b

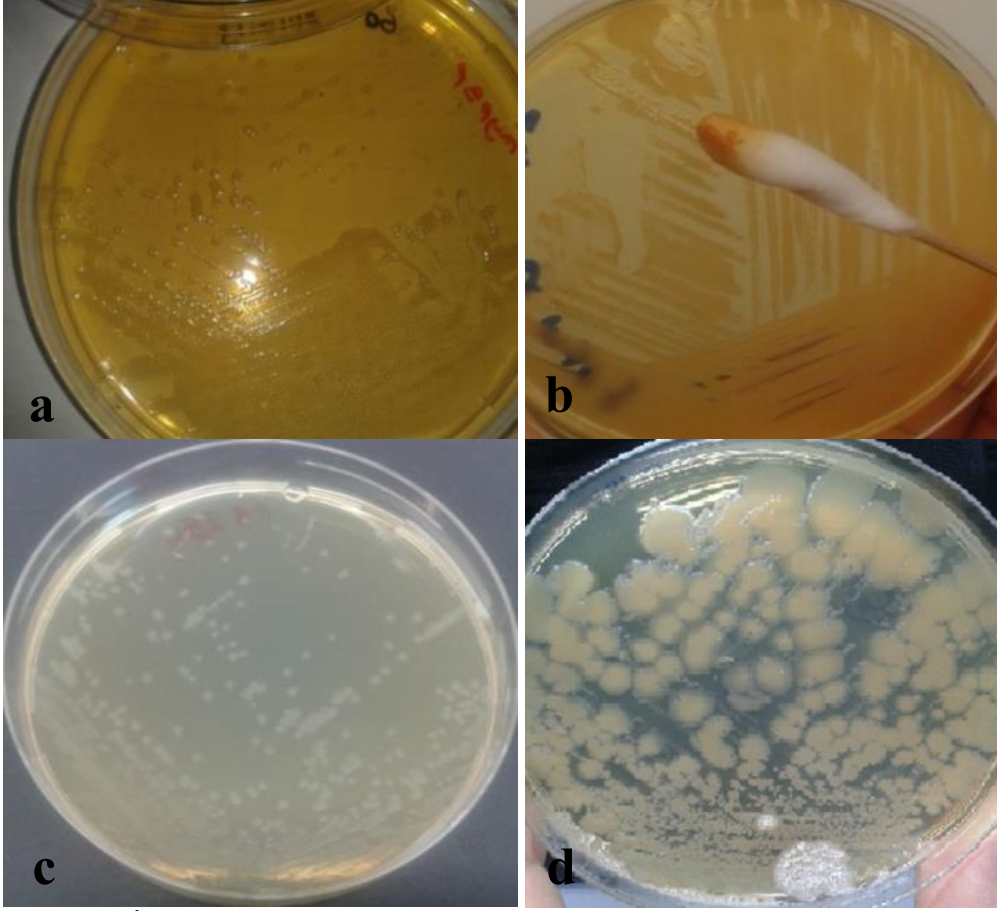
VAM: Veteriner Araştırma Merkezi, TİM: Rize Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü

3.1. İzolatların Morfolojik ve Fiziksel Özellikleri

Kültür sonucunda üreyen bakteri kolonileri makroskopik (koloni rengi, tipi ve büyüklüğü) ve mikroskopik (Gram özelliği, bakteri morfolojisi, spor içeriği ve konumu) olarak incelendi. İnceleme sonucunda petride üreyen koloniler; şeffaf renkli M tipi (mukoit), turuncu renkli hızlı üremeye petride tüm yüzeyi kaplayan S tipi ve krem

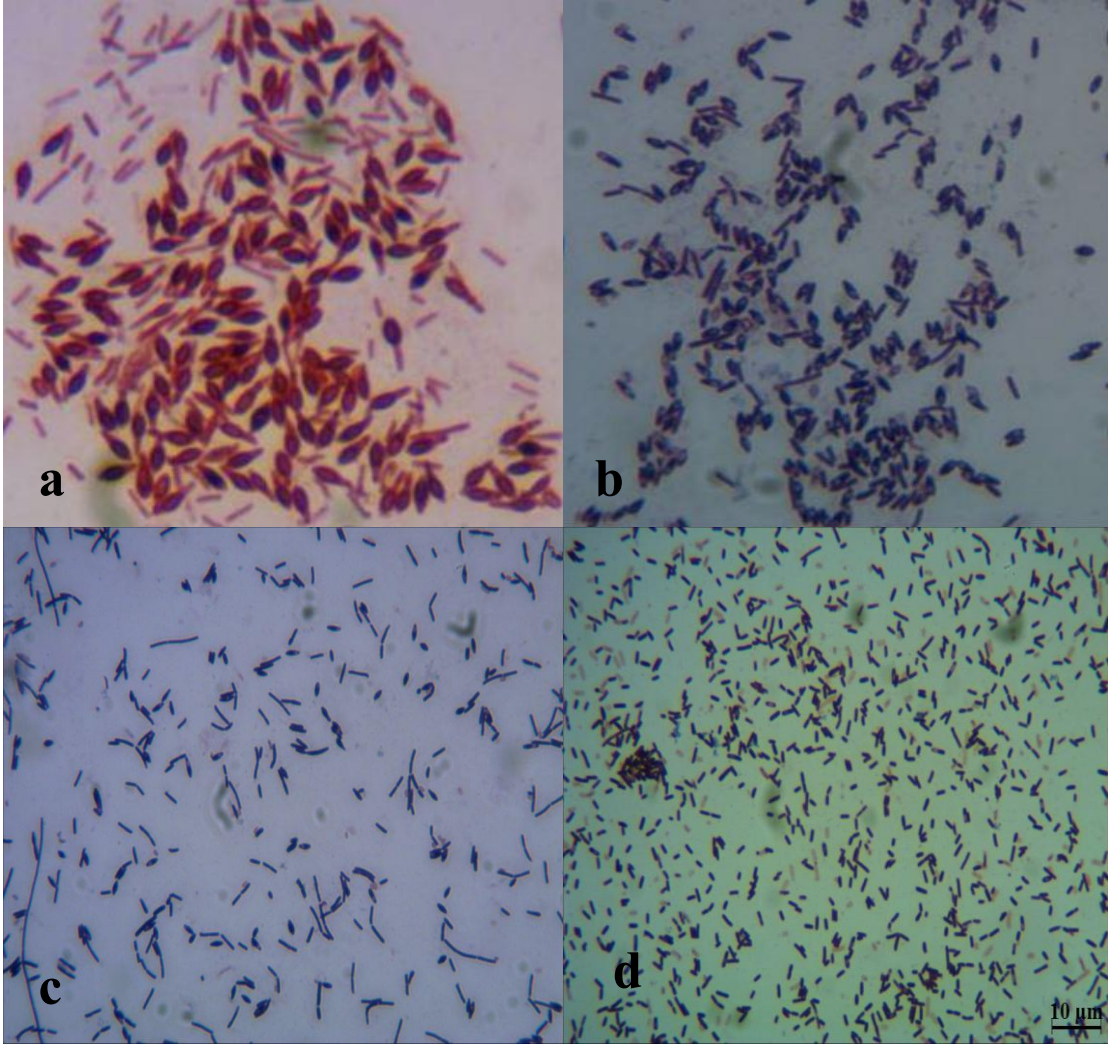
renkli küçük (0.2-0.3 cm çaplı) S tipi (düzgün) ya da R tipi (pürtüklü) izolatlar belirlendi. Tek koloni düşürme tekniğiyle MYPGP agar besiyerine pasajları yapıldı (Şekil 18). Saf kültürlerden hem DNA izolasyonu hem de diğer çalışmalarda kullanmak üzere stok kültürler hazırlandı. İzolatların her biri “PB” (Paenibacillus) şeklinde kodlanarak numune geliş sırasına göre rakamla, izolat sırasına göre alfabetik harflerle numaralandırıldı.

Saf kültürlerden gram boyama yapılarak Gram pozitif sporlu basil (kısa, uzun, kalın, tekli, ikili, kısa ve uzun zincirli vb.) oldukları belirlendi. Tür tanısında önemli bir kriter olan spor varlığı, hücre içindeki konumları ve yoğunlukları gözlemlendi. Aynı zamanda izolatların sıvı ve katı besiyerinde (MYPGP) üreme süreleri belirlendi. Bazı izolatların (PB9) hızlı (24 saatte), bazıları ise yavaş (48-72 saatte) ürettiği tespit edildi. İzolatlarda hareket besiyerinde ekim çizgisinin kenarına doğru üreme göstermeleri ve petride yayılmalarından dolayı 12 izolat (PB1a1, PB1a2, PB1b, PB1c, PB2a, PB2b, PB2c, PB2d, PB3.3b, PB3.3b1, PB9a, PB9b) hareket pozitif olarak değerlendirildi. MYPGP sıvı besiyerinde ekimleri yapılan izolatların tümü 40 °C’de ürettiği, yalnızca bir suşun ise 55 °C’de (PB2d) üreme gösterdiği belirlendi (Tablo 10).



Şekil 18. İzolatların petrideki koloni morfolojisi görünüşleri. a) MYPGP agarda şeffaf renkli mukoit (M tipi) koloniler (PB6a), b) MYPGP agarda turuncu renkte petri yüzeyünü kaplayan hareketli izolatlar (PB9a), c) MHA'da krem renkli S tipi koloniler, d) MHA'da R tipi koloniler (PB1a1).

İzolatların Gram boyamalı preparatlarında mikroskobik morfolojileri incelendiğinde tümü mor boyandığı (Gram pozitif), sporlu basil oldukları gözlemlendi. Sporları incelendiğinde ise PB1a1, PB3.3b, PB4, PB5a, PB5b, PB6a, PB6b, PB9a ve PB9b *P. larvae* sporu gibi subterminal konumlu şişkin bir yapı gösterirken, beş izolatta geç sporlanma geri kalan izolatlarda ise subterminal, terminal ya da sentral sporlanma gözlemlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Bazı izolatların Gram boyamada spor ve vejetatif hücre görünüşleri (100X büyütme). a) PB3.3b suşunun morfolojisi ve terminal-subterminal şişkin sporları, b) PB4 suşunun Gram pozitif subterminal spor ve hücreleri, c) PB6a suşunun Gram pozitif subterminal spor ve hücreleri, d) PB2b suşunun terminal-subterminal spor ve hücreleri.

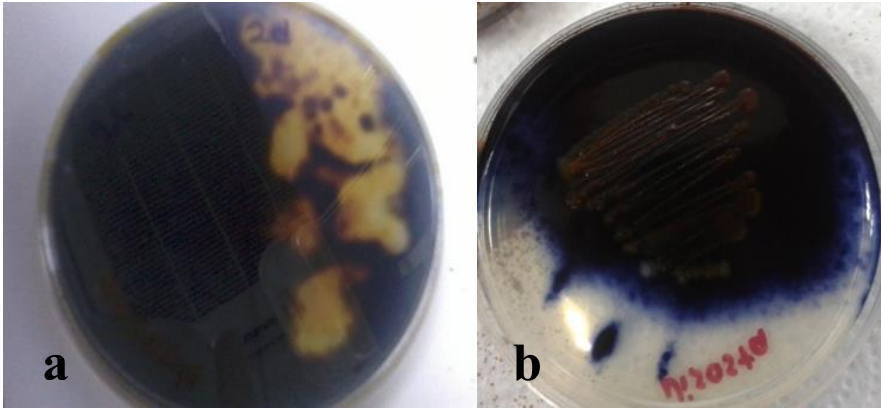
Tablo 10. İzolatların morfolojik, fiziksel özellikleri.

İzolat No	Besiyeri Morfolojisi	Mikroskopik Morfoloji	Spor Konumu	55 °C Üreme	HR
PB1a1	Krem renkli, S-tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Terminal ve şişkin	-	+
PB1a2	Krem renkli, S-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Sentral	-	+/-
PB1b	Turuncu, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Sentral (Geç sporlanma)	-	+
PB1c	Krem renkli, R-tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal	-	+/-
PB2a	Krem renkli, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Subterminal (Geç sporlanma)	-	+
PB2b	Krem-şeffaf renkte, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Subterminal	-	+
PB2c	Krem-şeffaf renkte, S-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Terminal	-	+/-
PB2d	Krem renkli, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Subterminal (Geç sporlanma)	+	+
PB3.1a	Şeffaf renkli, M-Tipi yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal	-	-
PB3.2a	Şeffaf renkli, M-Tipi yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal	-	-
PB3.3a1	Şeffaf renkli, R-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal (Geç sporlanma)	-	-
PB3.2b2	Krem renkli, M/S tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	TE (Geç sporlanma)	-	-
PB3.3b	Sarımsı renkte, R-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Terminal ve şişkin	-	+
PB3.3b1	Krem renkli, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Subterminal	-	+
PB4	Krem renkte, R-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal ve şişkin	-	-
PB5a	Şeffaf-krem renkli, M-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal ve şişkin	-	-
PB5b	Şeffaf renkli, R-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal ve şişkin	-	-
PB6a	Şeffaf-krem renkli, M-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal ve şişkin	-	-
PB6b	Şeffaf renkli, M-Tipi, yavaş üreme	Gr (+), basil	Subterminal ve şişkin	-	-
PB9a	Turuncu renkli, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Terminal ve şişkin	-	+
PB9b	Turuncu renkli, S-Tipi, hızlı üreme	Gr (+), basil	Terminal ve şişkin	-	+

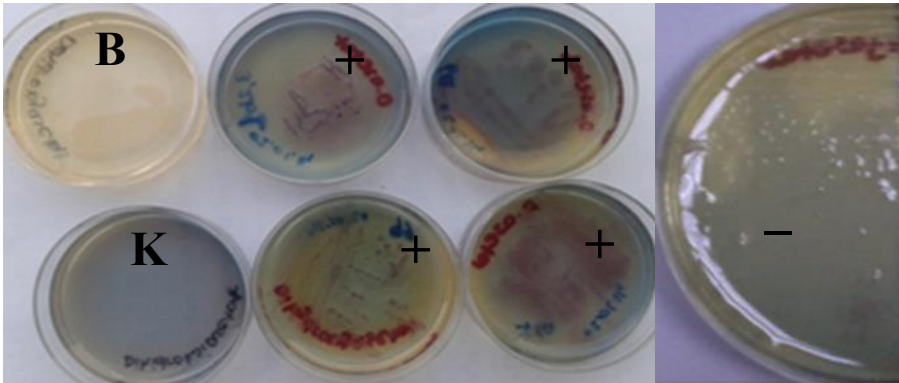
Gr: Gram boyama sonucu, (+): Pozitif, (+/-): Zayıf pozitif, (-): Negatif, HR: Hareket, TE: Tespit edilemedi.

3.2. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

Suşların geleneksel yöntemlerle sınıflandırılmasında bir dizi biyokimyasal testler kullanılmıştır (Tablo 11). Test edilen izolatların tümünde oksidaz testi olumlu olduğu, 9 izolatta (PB3.1a, PB3.2a, PB3.3a1, PB3.2b2, PB4, PB5a, PB5b, PB6a ve PB6b) katalaz enzimi üretmeyerek negatif olduğu belirlendi. Tek karbon kaynağı olarak sitrat kullanım testine bakıldığında sadece PB1a2 izolatında güçlü pozitiflik gözlemlendi. Farklı pH'larda (pH5.8, 6.8 ve 7.7) yapılan Voges-Proskauer testinde izolatlarımızdan biri her üç pH'da pozitif, üç suşun ise sadece pH5.8 ve 6.8'de pozitif oldukları gözlemlendi. Suşların 8'inde eskulin hidrolizi (PB1a2, PB1b, PB1c, PB2b, PB2c, PB2d, PB5a ve PB5b), ikisinde nişasta (PB1a1 ve PB2d) hidrolizi (Şekil 20), tümünün nitratı nitrite indirgelediği, ve çoğunun dehidroksiaseton ürettiği gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 20. Nişasta hidrolizinin pozitif (a) ve negatif (b) görüntüleri.



Şekil 21. Dehidroksiaseton testinin görüntüsü.

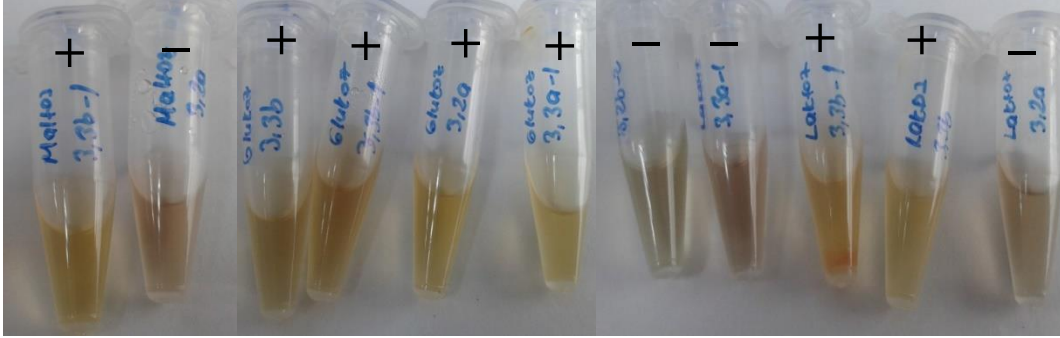
(B: Dehidroksiaseton besiyeri, K: Ayıraç damlatılmış besiyeri, (+): Pozitiflik (kırmızı renkli koloni) sonuç, (-): Negatif (renksiz koloni) sonuç.

Tablo 11. Bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri.

İZOLAT NO	O	K	S	E	NŞ	Voges-Proskauer (Ü/S)			DHYA Ü/S	NT Ü/S	G	M	L	T	K
						pH 5,8	pH 6,8	pH 7,7							
PB1a1	+	+	-	-	+	++/-	+/-	+/-	+++	+/+	+	+	-	+	-
PB1a2	+	++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	-
PB1b	+	+	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+	+	+	+	-
PB1c	+	+	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+	-
PB2a	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+	+	+	+	-
PB2b	+	+	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+	-
PB2c	+	+	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+	+	-
PB2d	+	++	-	+	+	+++	+++	+/-	+/+	+++	+	+	+	+	-
PB3.1a	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+++	+/-	+	-	-	+	-
PB3.2a	+/-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+/-	+	-	-	+	-
PB3.3a1	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	-	-	+	-
PB3.2b2	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+++	+++	-	-	-	+	-
PB3.3b	+	+	-	-	-	+++	+/-	+/-	ND	+/+	+	+	+	+	-
PB3.3b1	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	ND	+/+	+	+	+	+	+
PB4	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+++	+/+	+	-	-	+	+
PB5a	+	-	-	+	-	+++	+/-	+/-	+++	+++	+	-	-	+	-
PB5b	+/-	-	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+++	+/-	+	-	-	+	+
PB6a	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+++	+/-	+	-	-	+	-
PB6b	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+++	+/+	+	-	-	+	-
PB9a	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+	+	-	+	-
PB9b	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+++	+/-	+	+	-	+	-

O: Oksidaz, K: Katalaz, S: Sitrat, E: Eskulin, NŞ: Nişasta, DHYA: Dehidroksiaseton, NT: Nitrat, G: Glukoz, M: Maltoz, L: Laktoz, T: Trehaloz, K: Ksiloz, Ü/S: Üreme/Sonuç, ND; Test edilemedi, +/-: Zayıf, +: İyi, 2 ve 3+: Çok iyi.

Çalışmada izolatların bir dizi karbonhidratları (Glukoz, Maltoz, Laktoz, Trehaloz, Ksiloz) fermente edebilme özellikleri araştırıldı (Tablo 11). İzolatların 19'unda glukoz, 8'inde maltoz, 6'sında laktoz, 3'ünde ksiloz ve tümünde trehaloz pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 22).



Şekil 22. Maltoz, glukoz ve laktoz karbonhidratlarından asit üretim testin pozitif ve negatif sonuçları.

Çalışmada elde edilen izolatların makroskobik, mikroskobik, fiziksel ve biyokimyasal özellikleri (geleneksel tanı yöntemleri) incelenerek yapılan tür tanısına göre suşların 6'sı *Bacillus* sp., 6'sı *Paenibacillus* sp. ve geri kalan 9 tanesi ise *Paenibacillus larvae* olarak tanımlandı (Tablo 12).

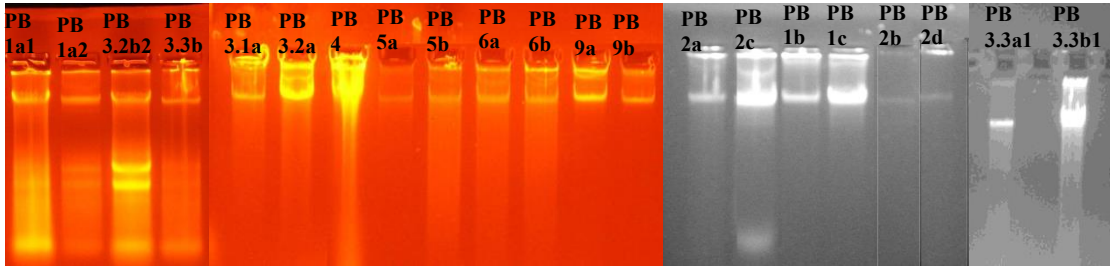
Tablo 12. Elde edilen izolatların geleneksel yöntemle göre tür tayini sonuçları (N=21).

İzolat	Tür	İzolat	Tür
PB1a1	<i>Paenibacillus</i> sp.	PB3.2b2	<i>Bacillus</i> sp.
PB1a2	<i>Bacillus</i> sp.	PB3.3b	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB1b	<i>Paenibacillus larvae</i>	PB3.3b1	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB1c	<i>Paenibacillus</i> sp.	PB4	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB2a	<i>Bacillus</i> sp.	PB5a	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB2b	<i>Bacillus</i> sp.	PB5b	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB2c	<i>Bacillus</i> sp.	PB6a	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB2d	<i>Bacillus</i> sp.	PB6b	<i>Paenibacillus larvae</i>
PB3.1a	<i>Paenibacillus larvae</i>	PB9a	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB3.2a	<i>Paenibacillus larvae</i>	PB9b	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB3.3a1	<i>Paenibacillus</i> sp.		

3.3. İzolatların Moleküler Özellikleri

3.3.1. Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi

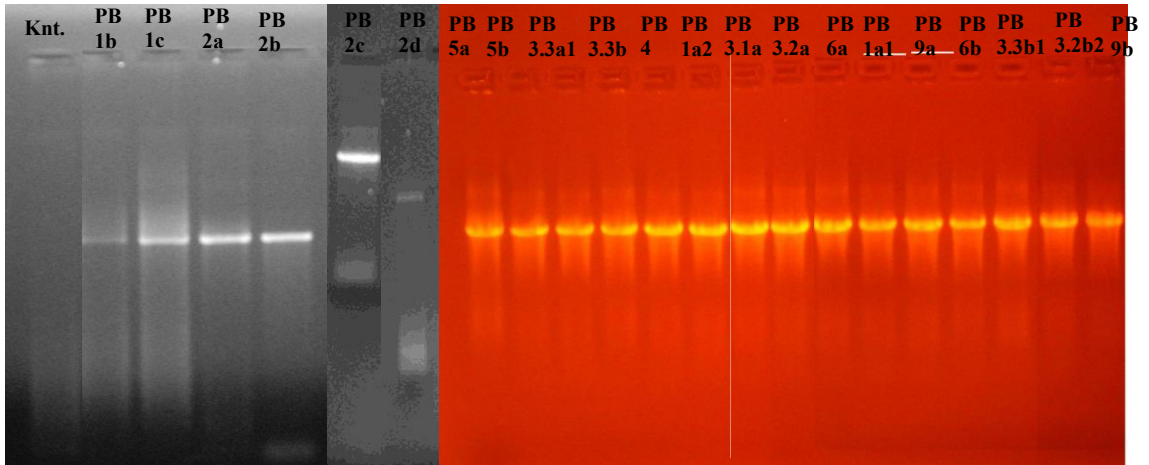
Geleneksel yöntemlerle tanımlanan izolatların moleküler yöntemlerle doğrulanması amacıyla izolatlardan genomik DNA izole edildi. İzolatlardan elde edilen genomik DNA fragmentleri % 1'lik agaroz jelde 100 V'ta 20-25 dk yürütüldü. Yürütme işleminin ardından genomik DNA'lar UV ışığı altında görüntülendi (Şekil 23).



Şekil 23. Bakteriyal izolatların genomik DNA'larının agaroz jelde görünümü.

3.3.2. 16S rRNA Gen Fragmentlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Bakteriyal izolatlardan elde edilen 16S rRNA gen fragmentleri agaroz jelde yürütüldü. Jelin ilk kuyucuğuna herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını anlamak için negatif kontrol yüklenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen fragmentlerinin agaroz jelde görünümü.

3.3.3. 16S rRNA Gen Sekanslarının Gen Bank'taki Benzerlikleri

İzolatların 16S rRNA dizin analizi MACROGEN firması tarafından yapıldı. Bu sekanslar Gen Bank'ta var olan diğer bakterilerin 16S rRNA genleriyle karşılaştırılarak yüzde benzerlikler tespit edildi (Tablo 13, Şekil 25).

Tablo 13. Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen benzerlikleri.

İzolat No	Benzer Olduğu Bakteriler	Genbank Numarası	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB1a1	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> VITSURB	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3452	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. BAB-3451	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151.1	100	99
PB1a2	<i>Bacillus safensis</i> BT 167	KJ848530.1	100	100
	<i>Bacillus safensis</i> WM-265	KJ210641.1	100	100
	<i>Bacillus pumilus</i> FLU2	KJ410678.1	100	100
	<i>Bacillus safensis</i> WB-223	KF749412.1	100	100
PB1b	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> VITSURB	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3452	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. BAB-3451	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151.1	100	99
PB2a	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> VITSURB	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3452	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. BAB-3451	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151.1	100	99
PB2b	<i>Bacillus</i> sp. M413	KJ944102.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M411	KJ944100.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M407	KJ944096.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M406	KJ944095.1	100	100
PB2c	<i>Bacillus</i> sp. M413	KJ944102.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M411	KJ944100.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M407	KJ944096.1	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. M406	KJ944095.1	100	100
PB3.1a	<i>Paenibacillus larvae</i> Ymb1	EF187246.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> 03-189	DQ079623.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> 02-130	DQ079622.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	AY030079.1	100	99
PB3.2a	<i>Paenibacillus larvae</i> Ymb1	EF187246.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> 03-189	DQ079623.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> 02-130	DQ079622.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	AY030079.1	100	99
PB3.3a1	<i>Paenibacillus larvae</i> Ymb1	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae</i> 03-189	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae</i> 02-130	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	AY030079.1	100	100

Tablo 13'ün devamı.

İzolat No	Benzer Olduğu Bakteriler	Genbank Numarası	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB3.2b2	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	100
PB3.3b	<i>Paenibacillus dendritiformis VITSURB</i>	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3452</i>	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus sp. BAB-3451</i>	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3421</i>	KF917151.1	100	99
PB3.3b1	<i>Paenibacillus dendritiformis VITSURB</i>	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3452</i>	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus sp. BAB-3451</i>	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3421</i>	KF917151.1	100	99
PB4	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	100
PB5a	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	100
PB5b	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	100
PB6a	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	99
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	99
PB6b	<i>Paenibacillus larvae Ymb1</i>	EF187246.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 03-189</i>	DQ079623.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae 02-130</i>	DQ079622.1	100	100
	<i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i>	AY030079.1	100	100
PB9a	<i>Paenibacillus dendritiformis VITSURB</i>	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3452</i>	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus sp. BAB-3451</i>	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3421</i>	KF917151.1	100	99
PB9b	<i>Paenibacillus dendritiformis VITSURB</i>	KF850540.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3452</i>	KF917182.1	100	99
	<i>Bacillus sp. BAB-3451</i>	KF917181.1	100	99
	<i>Paenibacillus sp. BAB-3421</i>	KF917151.1	100	99

*PB1c ve PB2d izolatların moleküler tanımlaması yapılamamıştır.

3.3.4. Filogenetik Ağaç

Geleneksel yöntemlerle tanıları yapılan izolatların moleküler yöntemlerle de tanıları doğrulandı (Tablo 14, Şekil 25). Suşlar %99-100 aralığında benzerlikle

tanımlanarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 25). Dendogram MEGA 5.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır (Tamura vd., 2011). Nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir.

Tablo 14. Elde edilen izolatların moleküler yöntemle göre tür tayini sonuçları (N=19).

İzolat	Tür	İzolat	Tür
PB1a1	<i>Paenibacillus</i> sp.	PB3.3b	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB1a2	<i>Bacillus</i> sp.	PB3.3b1	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB1b	<i>Paenibacillus</i> sp.	PB4	<i>Paenibacillus</i> larvae
PB2a	<i>Paenibacillus</i> sp.	PB5a	<i>Paenibacillus</i> larvae
PB2b	<i>Bacillus</i> sp.	PB5b	<i>Paenibacillus</i> larvae
PB2c	<i>Bacillus</i> sp.	PB6a	<i>Paenibacillus</i> larvae
PB3.1a	<i>Paenibacillus</i> larvae	PB6b	<i>Paenibacillus</i> larvae
PB3.2a	<i>Paenibacillus</i> larvae	PB9a	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB3.3a1	<i>Paenibacillus</i> larvae	PB9b	<i>Paenibacillus</i> sp.
PB3.2b2	<i>Paenibacillus</i> larvae		

*PB1c ve PB2d izolatları moleküler yöntemlerle tanımlanamamıştır.

3.4. Antibiyogram

Çalışmada izole edilen *Paenibacillus* ve *Bacillus* cinslerinin gram pozitif panel antibiyotiklerin 12'sine olan duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle test edildi, oluşturdukları inhibisyon zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçüldü (Tablo 15, Şekil 26).

Tablo 15. Antibiyotiklerin disk difüzyon metoduyla suşlara karşı gösterdikleri inhibisyon zonu çapları (mm).

İzolat No	CN	CAZ	CXM	KZ	C	AMC	P	E	SXT	TE	AK	AMP
PB1a1	>20	>20	>20	>20	>20	>40	>40	-	16	17	20	25
PB1a2	17	-*	-	30	14	25	20	20	30	30	18	22
PB1b	19	30	30	35	32	30	>20	12	10	20	18	25
PB1c	16	-	-	35	15	25	25	25	30	32	17	25
PB2a	17	35	30	30	25	25	>20	18	20	24	17	25
PB2b	15	-	-	30	15	27	29	25	35	32	16	26
PB2c	16	-	-	30	19	30	30	25	35	32	16	25
PB2d	22	-	-	25	25	25	30	25	30	40	20	25
PB3.1a	10	35	30	30	30	30	30	30	28	30	12	35
PB3.2a	12	30	30	30	30	30	>20	30	30	25	15	35
PB3.3a1	12	35	30	35	25	30	30	30	25	30	15	35
Pb3.2b2	17	20	22	35	30	35	40	25	24	30	18	35
PB3.3b	15	25	30	30	35	30	30	10	10	15	15	25
PB3.3b1	9	35	25	35	25	30	30	22	25	25	10	30
PB4	15	35	29	30	29	30	30	35	15	30	15	50
PB5a	10	25	30	30	25	30	30	29	20	40	11	40
PB5b	15	30	>30	>30	30	>30	>20	30	>20	>30	20	40
PB6a	12	35	30	35	30	30	>20	30	25	35	15	50
PB6b	10	40	40	35	30	30	30	29	20	30	15	35
PB9a	19	39	>30	35	25	>30	30	18	8	30	15	25
PB9b	15	30	30	35	28	30	30	17	10	35	17	25

CN: Gentamisin, P: Penisilin, CAZ: Ceftazidim, E: Eritromisin, CXM: Sefuroksim, KZ: Seftazolin, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimetoprim Sulfametoksazol, C: Kloramfenikol, AK: Amikasin, AMC: Amoksisilin Klavunat ve AMP Ampilisin, *: İnhibisyon yok.



Şekil 26. Disk Diffüzyon metoduna göre PB2b'nin bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığı.

Ölçülen zon çapları EUCAST kriterleri ile karşılaştırılarak etkili olanlara duyarlı (S), az etkili olanlara orta dirençli (I) ve etkili olmayanlara dirençli (R) şeklinde kodlanarak direç durumu belirlendi (URL-11) (Tablo 16). Çalışmada orta dirençli olan sonuçlar da dirençli olarak değerlendirilerek suşların tek ve birden çok antibiyotiğe karşı olan direnç profilleri çıkarıldı (Tablo 17). Elde edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde seftazolin, amoksilin klavulonat, penisilin ve ampisiline karşı tüm izolatların ise duyarlı olduğu gözlemlendi. Yalnızca iki suşun (PB3.2b2 ve PB5b) test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, bir suşun (PB2a) ise tek bir antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenirken, diğerlerinin birden fazla (2 ile 4 farklı antibiyotiğe karşı çoklu direnç) antibiyotiğe karşı dirençli olduğu gözlemlendi. En fazla direnç amikasinine karşı (12 suşta) belirlendi.

Tablo 16. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılıkları.

İZOLAT NO	CN	CAZ	CXM	KZ	C	AMC	P	E	SXT	TE	AK	AMP
PB1a1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S
PB1a2	S	R	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S
PB1b	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
PB1c	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PB2a	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
PB2b	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S
PB2c	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PB2d	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB3.1a	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PB3.2a	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PB3.3a1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PB3.2b2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB3.3b	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	R	S
PB3.3b1	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
PB4	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
PB5a	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PB5b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB6a	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PB6b	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PB9a	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S
PB9b	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S
Dirençli	7	5	5	-	3	-	-	8	5	2	12	-

CN: Gentamisin, P: Penisilin, CAZ: Cefotaksim, E: Eritromisin, CXM: Sefuroksim, KZ: Seftazolin, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimetoprim Sulfametoksazol, C: Kloramfenikol, AK: Amikasin, AMC: Amoksisilin Klavonat ve AMP Ampilisin, R: Dirençli, I: Orta dirençli (Dirençli kabul edildi), S: Duyarlı.

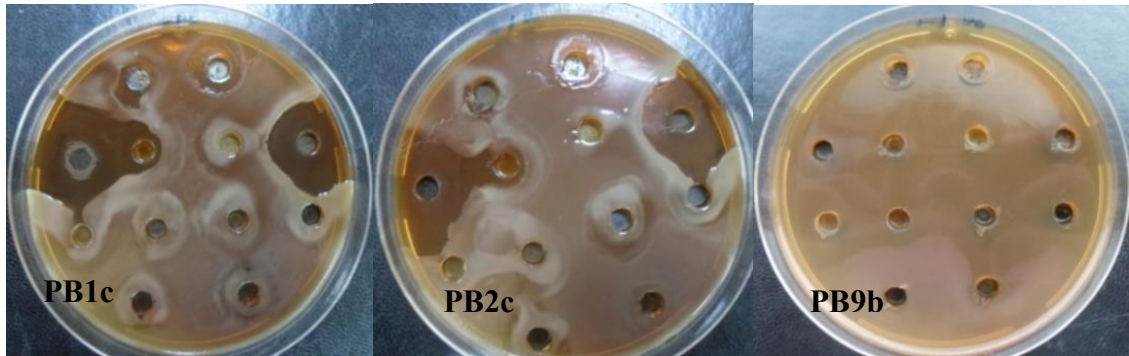
Tablo 17. İzolatların antibiyotik dirençleri ve çoklu antibiyotik direnç profili (N=21).

Anti-biyotikler	Antibiyotik Direnci				Çoklu Antibiyotik Direnci				
	Dirençli		Duyarlı		Antibiyotik Gruplar	Dirençli		Duyarlı	
n	%	n	%	n		%	n	%	
CN	7	33	14	67	E+ SXT	2	10	19	90
CAZ	5	24	16	76	E+ SXT+AK	1	5	20	95
CXM	5	24	16	76	E+TE	1	5	20	95
KZ	-	-	21	100	E+TE+ SXT+AK	1	5	20	95
C	3	14	18	86	CAZ+CXM	1	5	20	95
AMC	-	-	21	100	CAZ+CXM+C	1	5	20	95
P	-	-	21	100	CAZ+CXM+C+E	1	5	20	95
E	8	38	13	62	CAZ+CXM+C+AK	1	5	20	95
SXT	5	24	16	76	CAZ+CXM+AK	1	5	20	95
TE	2	10	19	90	CN+AK	6	29	15	71
AK	12	57	9	43	CN+AK+E	1	5	20	95
AMP	-	-	21	100	SXT+AK	1	5	20	95

CN: Gentamisin, P: Penisilin, CAZ: Ceflazidim, E: Eritromisin, CXM: Sefuroksim, KZ: Seftazolin, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimetoprim Sulfametoksazol, C: Kloramfenikol, AK: Amikasin, AMC: Amoksisilin Klavunat ve AMP Ampilisin, n; sayı,

3.5. Bitki Ekstraktlarının Bakteriyal İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Etkinlikleri

Çalışmada AFB şüpheli örneklerden izole edilen tüm bakteriyal izolatların çeşitli bitki ekstraktlarına olan duyarlılıkları “agar kuyucuk diffüzyon” yöntemine göre test edildi. Bu amaçla ülkemizde yaygın bulunan 8’i çiçekli, 23’ü kara yosunu olmak üzere toplam 31 farklı bitkiye ait sulu ve metanol ekstraktları (700-750 µg/mL konsantrasyonlarında) test edildi (Şekil 27, Tablo 18).



Şekil 27. Bazı izolatların 12 farklı bitki ekstraktlarına karşı antimikrobiyal etkinlik görüntüleri.

Test edilen bitkilerin tümünde en az bir suşa karşı antibakteriyel aktivite gözlemlendi. Geleneksel ve moleküler yöntemlerle *Bacillus* sp. ve *Paenibacillus* sp. olarak tanımlanan suşlarda bitki ekstraktlarına olan duyarlılıklarının az olduğu, ancak *Paenibacillus larvae* olarak tanımlanan suşlarda etkinliğin daha iyi olduğu gözlemlendi. Bitkilerin sulu ekstraktları, metanol ekstraktlarına (metanol ekstrakt etkinliğinin, yosunlardansa çiçekli bitkilerde daha iyi olduğu) göre daha düşük antimikrobiyal etkinliğe sahip oldukları belirlendi. Antimikrobiyal etkinlik sulu ekstraktlarda özellikle *S. ruralis var. ruraliformis*'de, metanol ekstraktlarda ise *Thymus cilicicus*, *T. spicata* ve *Clinopodium umbrosum*'da en iyi oldukları belirlendi (Tablo 18).

Tablo 18. Bitki ekstraktlarının bakteriyel izolatlar karşı agar kuyucuk yöntemine göre antimikrobiyal etkinlik zon çapları.

Bitki isimleri	Bakteriyel (PB) İzolatlar ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)																				
	PB1a1	PB1a2	PB1b	PB1c	PB2a	PB2b	PB2c	PB2d	PB3.3a1	PB3.2a	PB3.1a	PB3.2b2	PB3.3b	PB3.3b1	PB4	PB5a	PB5b	PB6a	PB6b	PB9a	PB9b
<i>*Thymus cilicicus</i>	>20	10	>25	7	>25	6	8	15	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>*T. spicata</i>	>20	16	>25	25	>25	20	8	22	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>*Clinopodium umbrosum</i>	>20	-	>25	-	>25	-	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>*Petrorhagia saxifraga</i>	10	-	12	-	15	8	-	13	-	-	10	15	-	10	14	20	20	20	25	-	-
<i>*Dichistidium capillosum</i>	-*	-	-	-	-	-	10	7	-	-	-	12	-	-	15	20	>25	25	20	-	6
<i>*Ziziphora clinopodias</i>	12	-	-	10	-	-	-	-	ND	-	ND	15	-	-	15	ND	22	>20	20	-	-
<i>*Sideritis libanotica</i>	15	-	10	φ	12	-	-	-	20	>25	>25	20	20	15	18	18	>25	>25 ^φ	>25	10	-
<i>**Gypsophila glandulosa</i>	12	-	6	-	15	-	-	-	15	22	16	15	9	12	14	15	25	20	24	-	6
<i>Polytrichum formosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10	>25	>25	10	-	8	15	15	>25	>25	15	-	-
<i>P. commune</i>	22	-	10	-	24	-	8	6	29	>25	>25	>25	>25	18	24	>25	>25	>25	>25	22	-
<i>Calliergonella cuspidata</i>	12	-	-	8	12	-	-	-	15	>25	>25	10	6	20	15	15	>25	>25	15	-	6
<i>C. lindbergii</i>	24	-	20	-	26	6	-	6	20	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	30	14
<i>Metzgeria conjugata</i>	13	-	6	-	-	-	-	6	17 ^φ	>25	>25	18	12	-	16 ^φ	16	>25	>25 ^φ	>25	-	-
<i>Isothecium alopecuroides</i>	6	-	6	-	10	-	-	6	10	>25	>25	10	6	18	15	15	>25	>25	15	-	6
<i>Eurhynchium striatum</i>	8	6	25	10	25	-	6	8	-	-	15	15	15	12	18	15	>25	25	25	-	10
<i>Syntrichia calcicola</i>	12	-	-	-	-	6	-	-	15	>25	>25	12	6	12	15	15	>25	>25	12	-	6
<i>S. virescens</i>	-	-	-	6	-	-	6	10	-	-	15	15	12	12	15	15	>25	25	25	-	6
<i>S. laevipila</i>	-	-	-	φ	10	10	φ	12	-	-	-	15	-	6	15	25	18	25	25	-	-
<i>S. intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	15	6	8	12	-	-	8	8	18	12	14	-	-
<i>S. ruralis var. ruraliformis</i>	-	-	-	10	-	-	10	-	ND ^φ	φ	ND	12	-	-	10 ^φ	ND ^φ	20 ^φ	25 ^φ	20	-	-
<i>Tortella densa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10	>25	>25	10	-	-	12	14	>25	>25	12	-	-
<i>T. tortuosa</i>	-	-	-	-	-	-	6	6	ND	-	ND	-	-	-	10	ND	12	15	-	-	-
<i>T. humulis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	12	-	-	10	ND	25	18	10	-	-
<i>Grimmia orbicularis</i>	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	10	-	-	15	15	>25	25	15	-	10
<i>Grimmia alpestris</i>	-	-	-	-	-	-	25	-	15	12	20	12	-	-	15	30	>25	25	25	-	-
<i>Schistidium popillosum</i>	φ	φ	-	7	-	-	-	-	ND	-	ND	12	-	-	12	ND	18	>20	15 ^φ	-	-
<i>S. trichodon</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	10	-	-	10	ND	22	24	18	-	-
<i>Diplophyllum taxifolium</i>	-	-	-	-	10	8	-	10	-	-	15	20	-	-	15	10	>25	25	20	-	6
<i>Leucobryum glaucum</i>	-	-	-	6	-	-	-	-	ND	-	ND	8	-	-	12	ND	12	>20	15	-	-
<i>Dicranum majus</i>	12	-	-	12	-	-	-	-	ND	-	ND	φ	-	-	18	ND	18	>20	10	-	-
<i>Hedwigia ciliata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	10	-	-	-	ND	22	12	15	-	-

*Lamiaceae ve **Caryophyllaceae Familyalarına Ait Çiçekli Bitki, Diğerleri Yosun, (-): Etkinliği yok, (ND): Test edilemedi, (>): Büyük, φ: Sulu ekstraktlarında etkinlik var, *: inhibisyon yok.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı, arı larva hastalıkları içerisinde oldukça bulaşıcı, dünyanın her tarafında yaygın olarak görülen, önemli ve en tehlikeli bakteriyel hastalıklarından biridir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bu durum aynıdır ve bulaşıcı hastalıklar arasında baş sıralarda yer almaktadır. Etken Gram pozitif bir bakteri olan *Paenibacillus larvae* (White) olduğu ve enfekte larvaların her birinde bir milyardan üzerinde spor meydana getirebildiği bildirilmektedir. Zamanında tedbir alınmazsa koloninin ölümüne, hatta tüm kolonilerin ve diğer arıların sönmesine neden olabilir.

Çalışmada AFB hastalığı şüpheli petek örneklerinde AFB etkeni mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu (geleneksel ve moleküler), etken bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları ve bu hastalık etkenine etkili bitki ekstraktlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Rize ve Samsun'dan temin edilen toplam 9 örnek laboratuvara ulaştırıldı (Tablo 9). Örneklerin yalnızca birinde saf kültür şeklinde tek bir suş izole edilirken, 6'sında (%66,6) 2-3 farklı *Paenibacillus* sp. şüpheli etken izole edildi (Şekil 18). Örneklerden ikisinde ise herhangi bir bakteriyel izolat elde edilemedi. Bu iki örneğin AFB diye temin edilmesine rağmen herhangi bir bakteri kolonisi gözlenmemesi bu örneklerin zirai ilaça maruz kaldığı kanısını ortaya koymuştur. AFB hastalığı bildirim zorunlu bir hastalık olması, bildirimden sonra hastalıklı kovanların yakma zorunluluğu ve sağlıklı kovanların da 3 ay hareket kısıtlaması getirilmesi nedeniyle arıcılar tarafından bildirilmemektedir. Bu da örnek sayımızın az olmasına neden olmuştur. Çalışmamızda AFB şüpheli olarak temin edildiğinden örneklerde %66,6 AFB etkeni bakteri izolasyonu gerçekleşmiştir.

Yaşar vd. (2002), Karadeniz Bölgesi'nde bulunan bal arısı kolonilerinin Yavru Çürüklüğü bulaşıklık oranının %18.33 olduğunu bildirmişlerdir. 2002-2007 yılları arasında yapılan çalışmada Breziya'nın farklı bölgelerinden toplanan bal, petek ve polen örneklerinden elde edilen 80 izolat analiz için seçilmiş ve sonuç olarak 77 suşun *P. larvae* olduğunu, fakat 3 suşun yetersiz sonuç gösterdiğini bildirmişlerdir (Chagas, 2012). Hatay yöresinde yapılan bir araştırmada 2003 yılı Eylül/Ekim tarihleri arasında 11 ilçe ve 51 köyde 89 arıcının toplam 5730 kolonisi önemli arı hastalık ve parazitleri yönünden incelenmiştir. Araştırmada Hatay yöresinde bulunan bal arısı

kolonilerinin %38'nin Varroa paraziti, %0,22'nin Yavru Çürüklüğü hastalığı, %0,01'nin ise Kireç hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Şahinler ve Gül, 2005).

Antunez vd. (2004), Uruguay'da, ülke genelinde (2001-2002 yılları) alınan toplam 103 bal örneğinin, %73'ünde (0,5-819 cfu/g aralığında) *Paenibacillus larvae* sporlarının varlığını bildirmişlerdir. Pohorecka ve Bober (2008), 2005 ve 2007 yılında yaptıkları çalışmada 242 AFB şüpheli örneğin %56'sında *P. larvae* pozitifliğini bildirmişlerdir. Yalçınkaya, (2008) tarafından yapılan çalışmada ise 2006-2007 yılları ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde Adana'da 97 yavrulu petek ve 3880 ergin bal arısı; Hatay'da 88 yavrulu petek ve 3520 ergin arı örneği toplanmıştır. Yapılan laboratuvar analizleri sonucunda, ergin arı örneklerinde Varroasis, Nosemosis tespit edilirken, il ve ilçelerin tümünde Yavru Çürüklüğü hastalıkları gözlenmiştir. Tüm örneklerin incelenmesi sonucunda, %29 oranında AFB ve %19 oranında Avrupa Yavru Çürüklüğü olduğu bildirilmiştir.

Hatay yöresinde 2010-2011 yılında yapılan bir diğer çalışmada, altı değişik kışlatma alanında 30 farklı arılıktan kış salkımı erken bozulan kolonilerde paraziter ve bakteriyel patojenlerin araştırılmıştır. Otuz farklı arılıktan alınan 900 koloninin tamamında *Varroa destructor*'a (%100), 90'nında Nosema sporlarına (%10) ve 72'sinde Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı etkeni olan *P. larvae*'ya (%8) rastlanıldığı bildirilmiştir (Muz vd., 2012). Ayoub vd. (2013), Irak'ta 7 farklı bölgeden aldıkları toplam 80 örnekten 13 (%16,2)'ünde *P. larvae*'yı belirlemişlerdir. Türkiye sınırından alınan örneklerde ise %33 oranında hastalık etkeni gözlemişlerdir.

Çalışmada elde edilen izolatların geleneksel yöntemlerle karakterizasyonu için çeşitli kaynaklardan (Holt ve Krieg, 1984; Koneman vd. 1997; Bilgehan 2004; Shimanuki ve Knox, 2000; Vallat vd., 2012; URL-10) yararlanılarak bir dizi morfolojik, fiziksel (Tablo 10) ve kimyasal (Tablo 11) testleri yapıldı. İzolatların tümünün Gram pozitif özelliği ve spor konumu belirlendi. Spor konumuna göre 2'sinin sentral, 5'inin terminal, diğerlerinin ise subterminal olduğu gözlemlendi (Şekil 19). İzolatların %57'si hareketli ve %100'ünün 40 °C'de üreme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Yalnızca bir suş (PB2d) 55°C'de üreme özelliğine sahiptir.

P. larvae suşları için belirtilen kaynaklarda katalaz negatif fakat oksidaz testi hakkında bilgi verilmemiştir (Tablo 6) ancak; verilerimizde tüm suşlarda oksidaz pozitif olarak gözlemlendi (Tablo 11). Buna rağmen katalaz testi suşların 12'sinde pozitif olarak belirlenmiştir. Suşların nişasta hidroliz testine (Şekil 20) bakıldığında yalnızca iki (PB1a1 ve PB2d) suşta pozitif olduğu gözlemlendi. *P. larvae* nitrat indirgenmesi testi değişken olarak bildirilmekte olup izolatların tümünde pozitif olarak belirlendi. *P. larvae* ve *P. alvei* arasında ayırt edici bir özellik olan dehidroksiaseton üretimi ve Voges proskauer testlerine bakıldığında suşların yalnızca ikisinde (PB2c ve PB3.3a1) dehidroksiaseton üretimi negatif olduğu (Şekil 21), beş izolatta Voges proskauer testi pH 6,0'nın üstünde değişken olduğu gözlemlendi (Tablo 11). Gerek morfoloji gerekse biyokimyasal test sonuçları kaynaklarda (Holt ve Krieg, 1984; Koneman vd. 1997; Bilgehan 2004; Shimanuki ve Knox, 2000; Vallat vd., 2012; URL-10) belirtilen sonuçlarla uyumlu olduğu tespit edildi.

Paenibacillus tanısının geleneksel yöntemlerle yapılmasında karbohidratlardan asit üretme testi önemli bir test olarak bilinmektedir (Krieg ve Holt, 1984). Bu amaçla çalışmada glukoz, maltoz, laktoz, trehaloz, ksiloz karbohidratları kullanılarak izolatlar test edildi. *P. larvae* mannitol, glukoz ve trehaloz kullanıp asit üretirken; arabinoz ve ksiloz'u kullanamaz ve sonuçta asit üretemez (Tablo 6, Tablo 11, Şekil 22). Suşların ikisinde (PB1a2, PB3.2b2) glukoz negatifliği gözlenirken tümünde Trehaloz pozitifliği belirlendi. PB3.3b1 suşunun test edilen tüm şekerleri hidroliz edebildiği belirlendi. Çalışmamızda da 6 adet suşun laktoz pozitifliği (PB1b, PB2a, PB2c, PB2d, PB3.3b ve PB4) gösterdiği, dolayısıyla laktoz fermente edebilen operon sistemine sahip olduğu, laktozdan glukoz ve galaktoz üretebildiği belirlendi.

Geleneksel test yöntemleri bakteriyal izolatların tanımlanmasında uzun yıllardır kullanılan bir metottur. Bu testler bakterilerin karakterizasyonu ve tanımlanması yanı sıra morfolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmamız da bu amacı benimsenmekte olup izole edilen *Bacillus* ve *Paenibacillus* sp. türlerinin karakterizasyonu ile tür tanısı yapılmıştır. Çalışma numuneleri 80 °C'ye maruz bırakıldığından dolayı yalnızca sporlu basiller izole edilmiştir. Geleneksel yöntemlerle yapılan tür tanısına göre 21 izolatın 15'i (%71,4) *Paenibacillus*, 6'sı (%28,6) ise *Bacillus* olarak cins düzeyinde tanımlanmış, *Paenibacillus*'ların 9'u

(%42,8) *Paenibacillus larvae* olarak tanımlandı (Tablo 12). Arı, bal ve petek örneklerinde yaygın olarak *Bacillus* sp. türleri rastlanması doğal olup AFB şüpheli örneklerde de benzer şekilde etken mikroorganizma yanısıra *Bacillus* ve diğer *Paenibacillus* sp. türleri sıklıkla izole edilmektedir. Sosyal topluluk olarak yaşayan bal arılarında (*Apis mellifera*) önemli karakteristik özelliğe sahip bir bağırsak mikrobiyotasına sahiptir. Bu nedenle bağırsak mikrobiyotası, arının büyümesinde, gelişmesinde, patojenlerin önlenmesinde ve çevreye uyum sağlamasında önemli rol oynar. Yetişkin arılarda Gram pozitif, Gram-negatif ve Gram değişken bakteriler ile mantar ve bazı durumlarda mayalar bulunmaktadır (Alippi vd., 2002; Buczek ve Glinski, 2003).

Rusenova ve Parvanov (2014), tarafından yapılan bir çalışmada 103 *P. larvae* suşlarının tanımlanması 16S rRNA ve metalloproteinaz gen bölgesi karakterizasyonu ile yapılmış, bir dizi biyokimyasal özellikleri incelemiştir. Suşları nitratı indirgeme, mannitol ve salisin kullanımını yetenekleri göz önüne alınarak 7 biyotip içine dağıtılmıştır. *P. larvae* suşlarının trehaloz metabolizasyonu %100 belirlenirken, glukozun metabolizasyonu AB genotiplerde %90, ab genotiplerde ise %100 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda da *P. larvae* izolatlarında trehaloz metabolizasyonu tümünde pozitif olarak belirlenirken glukoz yalnızca 2 (%9,5) suшта negatif olarak gözlenmiştir. Bu sonuç izolatlarımızın da farklı genotiplere sahip olduğunu düşündürmekte olup bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Mikroorganizmanın (*P. larvae*) izolasyonu genellikle mikrobiyal tanımlama için altın standart olsa da, moleküler tanı, hastalığın klinik belirtileri göstermeden önce erken saptanmasını izin veren ve zamanında uygun kontrol önlemleri alınmasını sağlayabilen önemli bir yöntemdir. Bu nedenle moleküler tanı, mikrobiyolojik test sonuçları arasında kesin sonuç veren, doğrulayan ve güven sağlayan bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada bal örneklerinin *P. larvae*, kültür yöntemleri ile % 57 gözlenirken moleküler yöntemlerle % 91 gözlenmiştir (Lauro vd., 2003).

Geleneksel yöntemle yapılan tür tanısının moleküler yöntemle doğrulanması amacıyla 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi yapıp (Şekil 23-24) Gen Bank'ta var olan diğer bakterilerin genleriyle karşılaştırılarak yüzde benzerlikleri tespit edildi (Tablo 13) ve suşlar %99-100 aralığında benzerlikle tanımlanarak filogenetik ağaç oluşturuldu

(Şekil 25). İzolatların 19'unun moleküler tanımlaması yapıldı ve 9 izolatin (%47.4) AFB etkeni olan *Paenibacillus larvae* olduğu tespit edildi (Tablo 14). Çalışmamızda direkt hastalık etkeni olan örneklerde araştırıldığından dolayı oran daha yüksek gibi görülmekle birlikte diğer çalışmacılarınkine benzer oranlarda *Paenibacillus larvae* varlığı tahmin edilmektedir. PB4 örneği dışında 6 örnekte iki ve daha fazla (en fazla 6 izolat) elde edilmiştir. İzolatların moleküler tanısı bazılarında aynı olmasına rağmen geleneksel yöntemlerle yapılan testlerde farklı özellikler taşıdığı dolayısıyla farklı suşlar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç ise aynı örnekte birden fazla AFB etkeni suşun bulunduğunu da göstermektedir. PB3 nolu örnekte 6 izolat elde edilmiş bunların 4'ü *P. larvae* iken 2'si *Paenibacillus* sp. olarak tanımlanmıştır.

Geleneksel yöntemle yapılan tür tanısını ile moleküler yöntemle yapılan tür tanısı arasında karşılaştırma yapıldığında moleküler yöntemle tanımlanan 19 suşun 14'ü (%73.7) geleneksel yöntemle aynı tanımlandığı gözlemlendi.

Türk ballarının dünya piyasalarındaki yeri her geçen gün gelişme göstermekle birlikte bazı olumsuzlukları da beraberinde taşımaktadır. Bu olumsuzlukların başında, balda veteriner ilaçlarının kalıntısı problemi gelmektedir ki ihracatta da önemli engel teşkil etmektedir. Bal arılarında görülen çeşitli hastalıkların önlenmesi maksadıyla kullanılan çeşitli ilaçların, bal örneklerinde kalıntı problemine neden olduğu bilinmektedir. Bu durum, ülkemizin özellikle Avrupa ve Amerika'ya bal ihracatında çok önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (Sunay, 2006). Besin değeri olan hayvanlarda, yasaklanmış veya tüketimine yasal olarak müsaade edilmiş antibakteriyel ilaçların, bilinçsizce ve suiistimal derecesinde kullanımı sonucunda halk sağlığı açısından ciddi sakıncalar oluşturabileceği anlaşılmıştır. Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece et, süt, yumurta, bal gibi gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunmasının önemi güncelliğini koruyacaktır (Kaya, 2005). Örneğin oksitetrasiklin (Saridaki-Papakonstadinou vd., 2006) ve kloramfenikol kalıntısı gibi (Ortelli vd., 2004). Tetrasiklin grubu olan Oksitetrasiklin geniş spektrumlu antibiyotik olup değişik enfeksiyonlarda kullanılır ve hayvanlarda gelişmeyi (büyüme hormonu) tetikler. Kemik ve diş gibi kalsiyumca zengin organlara zarar verebilir. Gebe annelerin veya 7 yaşından küçük çocukların bu ilaca maruz kalması durumunda ise dişlerin kahverengi lekelenmesine neden olur. Kloramfenikol, bakteriyostatik antimikrobial olup

veteriner tıpta sık kullanılan bir ilaçtır. Ampisilin, penisilin türevi beta-laktam antibiyotiği olup sığır, domuz, bal arıları ve kümes hayvanlarında yaygın kullanılan bir antibiyotiktir. Eritromisin birçok gram-pozitif organizmalara karşı etkili makrolid antibiyotik olup insanlarda ve hayvanlarda kullanılmaktadır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, elde edilen izolatların, Gram pozitif panel antibiyotiklere karşı sahip oldukları antibakteriyal direnç profillerinin tespit edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla seçilen 12 farklı antibiyotik (Tablo 7) disk difüzyon yöntemiyle test edildi (Tablo 15, Şekil 26). Elde edilen zon çapları EUCAST kriterleri ile karşılaştırılarak duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) şeklinde tespit edildi (Tablo 16).

Sonuçlar incelendiğinde antibiyotik duyarlılığı en güçlü ilaçların Seftazolin, Amoksisilin/Klavunat, Penisilin ve Ampisilin (%100) olduğu gözlemlendi. Direnç profiline bakıldığında sırasıyla Amikasin %57 (12), Eritromisin %38 (8), Gentamisin %33 (7), Ceftazidim- Sefuroksim, Trimetoprim/Sulfametoksazol %24 (5), Kloramfenikol %14 (3) ve Tetrasiklin %10 (2) olarak belirlenmiştir (Tablo 17). Özellikle Tetrasiklin direnci varlığı önemli bulunmuştur. Zira AFB hastalığında tetrasiklin grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Tüm test edilen antibiyotiklere karşı duyarlı olan 2 (%9,5) suşun (*P. larvae* PB3.2b2 ve PB5b suşları) var olduğu, bir suşun (*Paenibacillus* sp. PB2a) ise yalnızca eritromisine dirençli olduğu, diğer suşların (%90,5) ise çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlendi. Çoklu antibiyotik direnci en az iki en fazla 4 farklı antibiyotiğe karşı olduğu gözlemlendi.

Geleneksel ve moleküler yöntemlerle *P. larvae* (PB3.1a, PB3.2a, PB3.3a1, PB4, PB5a, PB6a, PB6b) olarak tanımlanan suşların antibiyotik direnç profiline bakıldığında tümünün sadece gentamisin ve amikasine dirençli olduğu, yalnızca bir suşun (PB4) Trimetoprim/Sulfametoksazol orta dirençli olduğu belirlendi. Bu veriler göstermektedir ki *P. larvae* suşlarında henüz AFB etkeni için yasaklı olmasına rağmen zaman zaman kullanılan tetrasikline karşı direncin henüz düşük (%10'larda) olduğunu göstermektedir. Bu alanda daha çok çalışma yapıp bu verilerin ortaya konması, arıcılar arasında yasaklı olmasına karşı kullanımı var olan bu antibiyotiklere olan ilgiyi azaltacağı düşünülmektedir.

Eleoner vd. (2001)'e rapor ettiği çalışmada antibiyotik arasında kloramfenikol direnci sıklığı az gözleendiği, ancak yeni çalışmalarda *Paenibacillus* sp. suşlarında bu antibiyotiğe karşı direncin arttığı bildirilmektedir. Çalışmamızda kloramfenikol direnci izole edilen üç adet *Bacillus* sp. suşlarında gözlenirken, *Paenibacillus* sp. suşlarında gözlenmemiştir. Tüm bu verilere bakıldığında örnekleme sayımızın düşük olmasıyla birlikte bölgeden izole edilen suşlarda henüz antibiyotik direncinin çok olmadığı ancak her bir suşun iki farklı antibiyotiğe dirençli olması da bunun böyle kalmayacağı sonucunu düşündürmektedir. Bu konuda daha fazla çalışmalara gereksinim bulunmakta ve *P. larvae* enfeksiyonlarından korunmak için sektöre sunulacak yeni antibiyotik etkili doğal ürünlerin araştırılması gerekmektedir.

Hatay'da yapılmış bir çalışmada arıların arı hastalıklarının kontrol ve tedavisinde kullandıkları ilaçları tespit etmişlerdir. Kolonilerideki *Varroa* paraziti için %45,3'nün Rulamit VA, %31'nin Mavrik, %15,3'nin Kenaz, %8,4'nün Perizin kullandıkları, Yavru Çürüklüğü hastalıklarına karşı, %47,3'nün Terramisin ve Neoterramisin, %43,5'nin Apimisin ve Apivesin kullandıkları, %8,6'sının ise her hangi bir ilaç kullanmadıkları belirlenmiştir (Şahinler ve Gül, 2005). Sıralı ve Doğaroğlu (2005), Trakya bölgesinde yaptığı bir anket çalışmasında yavru çürüklüğüne karşı ilaç kullanan arıların %57,50'sinin Eritromisin, %30,66'sının Oxitetrasiklin ve %1,36'sının da Oxitetrasiklin+Neomisin etkili maddeye sahip ilaçların kullandığı belirlenmiştir

Evans ve Armstrong (2006), tarafından arıların florasında bulunan dirençli bakterilerin bal arılarıdaki pirimer patojen olan, *P. larvae*'ye karşı durdurucu etkilerini araştırılmışlardır. Sonuç olarak yararlı ve simbiyot bakterilerin (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus cereus* ve *Brevibacillus formosus*) böcekler arasında bireysel ve koloni seviyesinde patojenleri engelleyici özelliği olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da AFB etkeni bakteri izolasyonunda benzer şekilde farklı, muhtemelen de patojen olmayan üç adet *Bacillus* sp. suşları izole edilmiştir. Bu suşlarda antibiyotik direnci bakıldığında üçünde de ikinci (sefuroksim) ve üçüncü (seftazidim) kuşak sefalosporinlere dirençli oldukları, iki suшта (PB1a2 ve PB2b) ise ayrıca protein sentezi inhibitörü olan kloramfenikol'e ve iki suшта (PB2b ve PB2c) da amikasin'e direnci tesbit edildi. Bu sonuçlar antibiyotik direncinin

varlığını ve antibiyotik kullanımını devam edilirse direncin artmasına neden olacağını göstermektedir.

Özkırım vd. (2007)'e yayınladıkları bir araştırmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen *Paenibacillus larvae larvae*'nin farklı suşlarının, 6 adet antibiyotiğe karşı duyarlılığını araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar duyarlılık düzeyinin çeşitlilik gösterdiğini göstermiştir. En az aktivite gösteren antibiyotikler, azitromisin ve tobramisin olmuştur. Eritromisin orta derecede etkili bir antibiyotik olarak tanımlanmıştır. Rifampin, amoksisilin klavunolik asit ve sülbaktam ampisillin ise en etkili antibiyotikler olarak saptanmıştır. Ancak, rifampin tüberküloz hastalığına karşı kullanıldığından, bu bileşiğin tarımsal alanda kullanılması uygun değildir.

Soundarapandian (2013)'e yaptığı bir çalışmada 13 antibiyotikten 11'ine dirençli olan *Paenibacillus* sp. suşunun Tetracycline, Penicillin ve Kloramfenikol direnç genlerini taşıdığı ve bu direnç genlerini "Konjugatif Plazmid" aracılığıyla aktarabildiğini bildirilmişlerdir. Çalışmamızda TE direnci olan suşlarında TE direnç geni taşıyıp taşıyamalarının daha ileri çalışmalarda belirlenmesi gerekmektedir.

Türk Gıda Kodeksi'ne göre ballarda sülfonamid türevi antibiyotik kalıntısının bulunmasına izin verilen herhangi bir kalıntı düzeyi verilmemiştir. 2006 yılında 22 farklı yöreden direkt arıcılardan toplanan numuneler üzerinde sulfa grubuna ait 12 farklı antibiyotik (Sulfaguanidine, Sulfanilamid, Sulfacetamid, Sulfadiazine, Sulfathiazol, Sulfamerazine, Sulfmethoxyridazine, Sulfadoxine, Sulfamethoxazol, Sulfadimethoxine, Sulfaquinoxaline ve Sulfadimidin), tetra grubu antibiyotikler ve strepto grubu antibiyotikler araştırılmıştır. Sonuç olarak ülkemiz ballarında rastlanan sulfa grubu antibiyotik yalnızca sulfadimidin olduğu ve 2006 yılının ilk yarısında analiz edilen 1714 adet numunenin sonucuna göre arıcıların %10'u halen sulfadimidin içerikli antibiyotik kullandıkları görülmüştür. Strepto grubu antibiyotiklerde ise 2006 yılının ilk yarısında analiz edilen 91 numuneden %5'inde 17,7 ppb'den yüksek oranlarda streptomisin kalıntısına rastlanıldığını belirtmişlerdir. Arıcıların %5-10'u halen streptomisin veya dihidrostreptomisin içeren antibiyotik kullanmaktadır ve ballarındaki kalıntı miktarı aşırı yüksek (>200 ppb.) çıkmıştır (Sunay, 2006).

Erdoğdu vd. (2011), 2007, 2008 ve 2009 yıllarında toplanan 536 bal örneklerinde sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametaksazol, sülfadimetoksin kalıntı analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 2 örnekte (ortalama) 102,45 µg/kg sülfanilamid, birinde 24,86 µg/kg sülfadiazin, 108'inde 597,34 µg/kg sülfametazin, 9'unda 25,01 µg/kg sülfametaksazol, 6'sında 157,25 µg/kg sülfadimetoksin kalıntısı tespit edilmiştir. Örneklerin tümünde sülfanilamid ile kirlenme sıklığı %0,37, sülfadiazin ile kirlenme sıklığı %0,19, sülfametazin ile kirlenme sıklığı %20,15, sülfametaksazol ile kirlenme sıklığı %1,68, sülfadimetoksin ile kirlenme sıklığı %1,12 olarak bildirilmiştir.

Pestisitler, genellikle bitkilere sprey, toprağa püskürtme şeklinde uygulanmakta, ayrıca tohum koruyucu olarak da yaygın bir şekilde kullanılabilen ve böylece bitkilerde kalıntı oluşturmaktadır. Pestisitlerin doğrudan uygulanması sırasında veya nektar, polen ve bitkilerdeki salgı balında bulunan aktif pestisit kalıntısı ile arılarda zehirlenmelere neden olabilmektedir. Analizlerde 15 insektisit, 6 naftalen, 3 herbisit, 1 fungusit, 1 antiseptik/dezenfektan ve 1 adet büyüme hormonu tespit edilmiştir. Sonuç olarak arılarda, peteklerde ve diğer numunelerde saptanan pestisitlerin, arıların ölümlerinde önemli rol oynayabileceği kanısına varılmıştır (Ünal vd., 2010). Çalışmamızda ele alınan iki (PB7 ve 8) örnekte hiçbir bakteriyel etkenin ürememesi pestisit kullanılmış olma ihtimaline bağlanmıştır.

Bitkilerin tedavi amaçla kullanılmaları çok eski yıllardan beri süregelen bir uygulamadır. Dünya ülkelerinde olduğu gibi Ülkemizde de deneme yanılma yöntemiyle bulunmuş, halk arasında şifalı bitkiler olarak anılan birçok bitki, hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kırbağ, 1999). Son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar çok olması, bilim adamlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya itmiştir (Dürger vd., 1999). Şifalı bitkiler farklı olarak kullanılan antimikrobiyal maddelerin etkili ve güçlü ilaçlar oluşturmada zengin bir kaynağı temsil ederler.

Özellikle bitkilerin alkaloidleri önemli biyoaktif maddelerdir. Bu amaçla tıbbi bitkilerin farklı bölümleri; kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve kullanılmaktadır.

Bunlardan bazıları küçük miktarları bazıları ise büyük miktarlarda hasat edilir ve ilaç endüstrisine ham madde oluşturur. Bu nedenle çalışmamızın son aşamasında AFB ya da EFB etkenlerine karşı doğal bitkisel ürünlerin araştırılması planlandı ve bu amaçla 31 farklı bitkinin hem sulu hem de metanol ekstraktları araştırıldı (Tablo 18, Şekil 27). Yosun olan *S. ruralis var. ruraliformis* sulu ekstraktının etkinliğinin diğerlerine göre en iyi olduğu ancak metanol ekstraktlarının ise etkinliğinin düşük olduğu gözlenmiştir. Metanol ekstraksiyonunda en iyi antimikrobiyal etkinlik *Thymus cilicicus* ile *T. spicata* ait olduğu ve test edilen tüm suşlara etkinliğin varlığı belirlendi. *Clinopodium umbrosum*, *Sideritis libanotica* ve *Gypsophila glandulosa* türleri çiçekli bitki olup metanol ekstraktları seçici bir etkinliğe sahip *Paenibacillus* sp. ve *P. larvae* suşlarına karşı oldukça iyi sayılabilecek antibakteriyel etkinlik gözlenmiştir (Tablo 18). Bu sonuçlar bal arılarının normal vücut florasında bulunan *Bacillus* suşlarını etkilemeden hastalık etkeni *P. larvae* ve diğerlerini engellemede bir ışık olacağı düşünülmektedir. Ancak bu konuda çok sayıda çalışma yapılması bu bitkilerin ekstraktları saflaştırılıp etken maddelerin belirlenmesi ve in vivo çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bitki ekstraktlarından *Thymus* türleri çokça çalışılmış, antimikrobiyal etkinliği varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmekte, ancak içeriğindeki toksik maddelerin varlığından dolayı kullanımda sıkıntıların olduğu bildirilmektedir (Ultee vd., 2000; Lambert vd., 2001; Ultee vd., 2002; Mevy vd., 2007). Çalışmamızda da benzer sonuçlar alınmış, bu cins bitki üyelerine ait ekstraktların, en etkili ekstraktlar olduğu belirlenmiştir.

Yosun ekstraktlarına genel olarak bakıldığında özellikle *P. larvae* suşlarına oldukça iyi etkililiğe sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 18). *Polytrichum formosum*, *S. intermedia* ve *Tortella densa* türlerine ait metanol ekstraktları seçici olarak *P. larvae*'ye karşı güçlü sayılabilecek etkinliklerinin varlığı belirlendi.

Klouček vd. (2008), in vitro olarak yaptıkları çalışmada, *Armoracia rusticana* en güçlü aktivite belirlenirken *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* ve *Satureja hortensis* bitkilerinin uçucu yağları da güçlü etkinliğe sahip ekstraktlar olarak bildirilmiştir.

Rada vd. (2009), farklı bitki ekstraktlarını *P. larvae* suşlarına karşı inhibitör aktivitesi için test etmişler. *Melia azadirachta*, *Cinnamomum verum* ve *Cymbopogon citratus*'a ekstraktlarını en etkili ekstraktlar olarak bildirmişlerdir.

González ve Marioli (2010)'a yaptıkları çalışmada on bitkinin kaynatılarak hazırlanan ekstraktlarından 8'i, dört ayrı yerden temin edilen *P. larvae* suşlarının büyümesini inhibe ettiği, sadece *O. vulgare* ve *T. vulgaris* CS ve B-IV'nin aktivite gösteremediği belirlendi. Yedi bitkiden elde edilmiş esansiyel yağların (*A. saturoioides*, *Ch. ambrosioide*, *E. cinerea*, *M. verticillata*, *O. vulgare*, *T. minuta* ve *T. vulgaris* gibi) ve *E. cinerea*, *M. verticillata* tüm *P. larvae* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Gende vd. (2010), tarafından yapılan bir araştırmada tetrasiklin hidroklorid ve tarçının (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) esansiyel yağı Arjantinde izole edilen altı farklı *P. larvae*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi test edildi. Tetrasiklin hidroklorid etkinliği tüm suşlarda 2-6 µg/mL'de gözlenirken *Cinnamomun* etkinliği 25-66 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Roussenova (2011), yılında yayınlanan bir araştırmada *Paenibacillus larvae* (15 adet saha suşu ve iki tane referans suş BCCM/LMG 9820) karşı onbir adet esansiyel yağların antibakteriyal aktiviteleri, disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Yüksek aktivite *Cinnamon*, *Thyme*, *Clove*, *Peppermint*, *Lemongrass*, *Sage* ve *Oregano*, en düşük inhibe aktivite turuncgil esansiyel yağları göstermiş olup bunlar *Mandarin* ve *Grapefruit* yağlarıdır. Marjoram ve *Tea tree* ise değişken aktivite sergilemiştir.

Marghitaş (2011), tarafından yapılan çalışmada *Ocimum basilicum*, *Urtica dioica*, *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium*'un ekstraktları elde edilerek *P. larvae* karşı test edilmiş ve *Urtica dioica*'da en etkili olduğu belirlenmiştir. Boligon vd. (2013)'e yaptığı bir araştırmada, Rhamnaceae familyasına ait *Scutia buxifolia* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi ait farklı *Paenibacillus* sp. suşuna karşı test edilmiştir. Tüm suşlara karşı antimikrobiyal aktivite varlığı belirlenmiştir. Tüm suşlar içinde en az etkinlik *P. larvae*'ya gözlenmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki çalışmamızda olduğu gibi farklı suşların bitki ekstraktlarına karşı farklı düzeyde etkinliği bulunabilmektedir.

Kuzyšinová vd. (2013), iki farklı çevreden alınan kovanlarından izole edilen iki *P. larvae* (CCM4488 ve PL02) suşlarına karşı bir dizi bitki ekstraktı test edilmiştir. *P. larvae* PL02 suşunda yapılan testlerde *Thymus vulgaris* ve *Origanum vulgare*'in etkili olduğunu gözlenirken, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinum officinalis* ve *Chamomilla recutita* gibi esansiyel yağların ise hiç etki etmediğini gözlemlemiştir. *P. larvae* CCM4488 suşu ise PL02 suşu ile benzerlik göstermiş fakat PL02 suşun aksine *Foeniculum vulgare* ve *Pimpinella anisum*'a karşı duyarlılığı olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar alınmış olup tüm bitki ekstraktları test edilen tüm suşlara karşı aynı oranda etkili belirlenememiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada AFB şüpheli örneklerde *P. larvea* izolasyonu gerçekleştirilmiş, geleneksel yöntemlerle karakterize, moleküler yöntemle tanımlama yapılmıştır. Bu sonuç bize arı hastalıklarında AFB etkenlerinin var olduğunu, sektörün daha iyileştirilmesi ve arıcıların yeterince bilinçlendirilmesi açısından bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Doğal ekosistemde yaşayan ve hastalık şüphesiyle alınan arı (ve arı ürünleri) örneklerinde, AFB etkeni olan ve olmayan sporlu bakteriler izole edilmiştir. Bu bakterilerde insanlarda önemli hastalıkların tedavisinde kullanılan 12 adet Gram pozitif panel antibiyotikine karşı test edilmiş, bazılarına karşı önemli (%10-57) sayılabilecek düzeylerde dirençli bulunmuş, özellikle çoklu antibiyotik direncinin varlığı, ekosisteme yayılmış direnç genlerini işaret etmektedir. Ekosistemde yaşayan arılarda bulunan sporlu bakteri florasında antibiyotik direncinin gözlenmesi, sadece arıcılara mal edilmemesi gerekmektedir. Arıların yaşam alanlarında, yoğun antibiyotik kullanımı potansiyeline sahip olan insanların varlığı dirençli bakteri popülasyonlarının oluşumuna da sebep olmaktadır. Ayrıca hayvansal (balık yetiştiriciliği, tavukçuluk, vb.) üretim çiftliklerinde de kullanılan antibiyotikler doğal ortama yayılmakta ve arı florasına bulaşmış olabilmektedir. Arı florasında antibiyotik dirençli bakterilerin bulunması nedenlerinin araştırılması için çok daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Arılar ekosistemde doğal antimikrobiyal, anti tümör ve anti oksidan maddelerden beslenmekte ve hastalıklara karşı doğal direnç geliştirebilmek için hammaddelerle direkt temas etmektedirler. Bir kısım hastalıklarını, bu sayede kendi kendilerince tedavi edebilmektedirler. Bu açıdan çalışmamızda da arı ürünleri temel kaynağı olan bitkilerin

arı bakteriyel hastalıklarına çözüm olabilir mi konusunda araştırma yapılmak istenmiş, 31 farklı bitki ekstraktı antibakteriyel aktivite yönünden taranmıştır. Alınan sonuçlara bakıldığında bu bitkisel ekstraktların arı bakteriyel hastalıklarında yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak bu konuda daha detayli araştırmaların (ekstraktların kimyasal içerikleri, arıya, larvalara, bala ve insana etkileri), multidisipliner çalışmaların yapılması gerekmektedir.

5. ÖNERİLER

Ülkemizde arıcılık tüm dünyada olduğu gibi büyük bir öneme sahiptir. Arıcılık Doğu Karadeniz Bölgesinde ise daha yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Arıcılıkla uğraşan aile sayısı çok olmasına rağmen çalışmamızda yeteri kadar örnek toplanamamıştır. Bunun nedeni olarak arıcıların kovanlıli problemlerini paylaşımlarından çekimser olmalarıdır. Hala bazı arıcılar kovanlarında tehit oluşturan ve bulunması halinde ihbari mecbur olan yavru çürüklüğü hastalıklarını tespit ettikleri halde saklamakta ve kendi çözümleriyle bu hastalıkları kovandan uzaklaştırmaya çalışmaktadırlar. Uzaklaştırmaya çalışırken diğer kovanlarda hastalıkları sıçratmakta ve kaynak israfına neden olmaktadır. Labaratuvarımıza ulaşan örneklerden çıkan sonuçlar bunu doğrulamakta ve kovanlarda buna bağlı olarak petekde, larvada ve arı ürünlerinde Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı etmeni olan *Paenibacillus larvae*'ya ve *Bacillus* cinsi bakterilere rastlanılmıştır. Bu sonuca göre Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın ilgili birimlerindeki sorumlu kişiler, arıcılık araştırma istasyonları, bu konuda araştırma yapmış bilim insanları, arıcıları hastalıklara karşı bilinçlendirmeli, kullandıkları alet ve ekipmanlarının hijyeni konusunda eğitimler, paneller düzenlemelidir.

Yavru Çürüklüğü Hastalığı'na karşı uygulanabilecek herhangi bir ilaç ya da antibiyotik kullanımı WHO tarafından yasaklanmıştır. Yasak olduğu halde bu hastalığa karşı arıcılar ısrarla antibiyotik kullanmakta oldukları bilinmektedir. Bu hastalıkla mücadele için ilaç kullanımı dışındaki yöntemleri tercih etmeleri sorunun çözümü açısından büyük önem taşımaktadır. Varroa gibi hastalıklarda ise yasal izni olan antibiyotikler, arıcılar tarafından kullanılması gereken dozunda kullanılmamakta ya da hastalıklara karşı devamlı antibiyotikler tercih edilmektedir. Devamlı antibiyotik kullanımında arılarda kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oluşturmakta, hem balda hem de diğer arı ürünlerinde kalıntılara neden olmaktadır. Özellikle kanatlı hayvancılıkta (tavuk, hindi vb.) kullanıldığı bilinen bazı ilaçların, arıcılar tarafından kullanımının kalıntı sorunlarına yol açtığı tahmin edilmektedir. Yaptığımız çalışmada hastalıklı arı florasından izole edilen sporlu basillere karşı, antibiyotik dirençi oluşmuş olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotikler Amikasin, eritromisin, gentamisin, ceftazidim, sefuroksim, trimetoprim sulfametoksazol, kloramfenikol, tetrasiklin şeklinde gözlenmiştir.

Türkiye bitki çeşitliliği açısından oldukça zengin bir ülkedir. Alternatif tıp adı altında çeşitli hastalıklara karşı bitkisel ilaçlar ya da ürünlerin kullanımı yada araştırılması, son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda ortaya çıkmaktadır ki arı hastalıklarına karşı, bitkisel ilaçların denenmesi bir nebze de olsa çözüm getireceği yolundadır. Zaten bitkisel ürünlerden üretilen bala, bitki ekstraktlarından oluşturulacak olan ilaç ya da ürünün herhangi bir kalıntı sorununa yol açmayacağı, insan sağlığını etkileyemeyeceği düşünülmektedir. Hali hazırda piyasada buna benzer bitkisel ürünler bulunmakta ancak yeterince çözüme katkı sağlamamaktadır. Bu nedenle tüm dünyada bitkisel ürünlerin tedavi veya destek tedavi (fitoterapi) için araştırmaları yapılmakta ve her geçen gün yeni bir ürün piyasaya sürülmektedir.

Yavru çürüklüğü etkenine karşı yaptığımız bitki ekstaktı denememiz (hem metanol hem sulu ekstrakt) bize bunun olabilirliğini göstermektedir. Bu bitki sayısı ve çeşitliliği artırılıp geliştirilmeli, etken maddeleri saflaştırıp daha spesifik kullanıma sunulmalı, bu ekstraktların arı ve insan metabolizması üzerine olum/olumsuz etkileri detaylı olarak araştırılmalıdır. Zira arıcılıkta dünyada önemli yere sahip olan ülkemizde arı ölümlerinin de yoğun görüldüğü, verimin düşük olduğu bir gerçektir. Bunu önlemek ve zararı daha aza çekebilmek için bu alanda çok sayıda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bilgiler ışığında dikkate sunulması gereken öneriler;

1. Bilgi ve tecrübe olmadan sıradan arıcılık yapmak mümkün değildir. Bilgi ve tecrübeden yoksun olarak yapılacak arıcılık neticesinde kazanç yerine kaynak israfı elde edilmiş olunacaktır. Arıcılığa başlarken, bölge, iklim şartları, bitki örtüsü çok iyi analiz edilmeli arıcılık için uygunluğu belirlendikten sonra faaliyete başlanmalıdır (Ordu TB, 2013).
2. Bölge ve ülke genelinde arı hastalıkları ile ilişkili araştırma merkezlerin artırılması, bu alanda uzman kişilerin yetiştirilmesi ve Arıcılar Birliği ile bu merkez/uzmanların daha fazla sorunun çözümüne yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

3. Öncelikle AFB ve EFB hastalıklarının bildirim zorunlu hastalıklar listesinden çıkarılması için yetkililerin daha detaylı olarak bilgilendirilmesi gerekmektedir. Hastalık gizlendikçe arıcılar arasında bilinçsiz mücadele yöntemleri ele alınmakta ve bulaşın artmasına, yayılmasına sebebiyet verilmektedir.
4. Arı hastalıkları arasında önemli yeri olan bakteriyel hastalıkların hızlı teşhisi yapılmalı, üreticilere bulaşın önlenmesi konusunda maddi ve bu konuda araştırma yapan üniversitelere de bilimsel destekler verilmelidir.
5. Hastalıklara dirençli arı ırklarının islahı çalışmaları arttırılmalı, dirençli ırklar geliştirilmelidir.
6. Bölge ve ülke genelinde bakteriyel arı hastalıkları insidansı ve prevalansı belirlenmeli, hastalık etkenlerinin yaygın olduğu bölgelerde güçlü arı ırkları kullanılmalıdır.
7. Bakteriyel (AFB, EFB vb.) arı hastalıkları daha detaylı çalışılmalı, mevcut veya muhtemel hastalık etkenleri belirlenmeli, etiyolojik (sebeplerine yönelik) çalışmalar yapılmalıdır.
8. Çok sayıda farklı etken mikroorganizmalar izole edilerek bunların antibiyotiklere olan direnç profilleri belirlenmeli, gerekirse arıcıya etkene yönelik antimikrobiyal tedavi önerilmelidir.
9. Ülkemiz bitki örtüsünce çok zengin olup bölgesel arı hastalıklarına çözüm olabilecek fitoterapi etkenleri (antimikrobiyal etkili bitkisel ürünler) test edilmeli ve arıcıların hizmetine sunulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akpınar, Ş., 2011.** Gıda Güvenliği ve Balda Kalıntı. Arıcılık Araştırma Dergisi, 3(6), 26-29.
- Alippi, A. M., Lopez, A. C. and Aguilar, O. M., 2002.** Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and Restriction Fragment Analysis of genes encoding 16s Rna. Applied Environment Microbiology, 68, 3655-3660.
- Alippi A. M., 1999.** Bacterial diseases. In: Colin, M. E., Ball, B. V., Kilani, M. (ed.). Bee disease diagnosis. Zaragoza: CIHEAM, (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 25) p. 31-59.
- Alippi, A.M., Ringuet J. A., Cerimele E. L., Re M. S. and Henning C. P., 1996.** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against *Paenibacillus larvae*, the Causal Agent of American Foulbrood Disease. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 4 (2), 9-16.
- Anonim, 2001.** YAYÇEP-Arıcılık, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Serisi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Yayın no:33, Ankara, Türkiye.
- Antunez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., and Zunino, Pablo., 2004.** *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. Journal of Invertebrate Pathology, 86, 56-58. DOI: 10.1016/j.jip.2004.03.011.
- Antunez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M. and Zunino, P., 2008.** Efficacy of natural propolis extract in the control of American foulbrood. Veterinary Microbiology, 131, 324-331.
- Arbia, A. and Babbay B. 2011.** Management strategies of Honey bee Diseases. Journal of Entomology, 8 (1), 1-15.
- Arslangündoğdu, Z., 2011.** Bal arısı (*Apis mellifera* L., 1758). ACTA TURCICA Çevrimiçi Tematik Türkoloji Dergisi, Sayı 1/1, 1-12.
- Ash, C., Priest, F. G. and Collins, M. D., 1993.** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie Van Leeuwenhoek, 64, 253-260.
- Aydın, L., Çakmak, İ., Güleğen, E. ve Korkut, M., 2003.** Güney Marmara Bölgesi arı hastalıkları ve zararlıları anket sonuçları. Uludağ Arıcılık Dergisi, 3(1), 37-40.
- Ayoub, Z. N., Saeed, A. Y. and Vandame, J., 2013.** Detection of American Foulbrood Disease in the Apiaries of Duhok Province, Kurdistan Region, Iraq. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS), 6(3), 18-21.

- Bailey, L., 1983.** *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 65-69.
- Bailey, L. and Ball B.V., 1991.** *Honey Bee Pathology*, Academic Press, London, Second Edition.
- Baily, L. and Collins, M. D., 1981.** Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Microbiology*, 53(2), 215-217.
- Ben-Jacob, E., Schochet O., Tenenbaum, A., Cohen, I., Czirok, A. and Vicsek, T., 1994.** Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature*, 368(6466), 46-49.
- Bogdanov, S., 2009.** Beeswax: Production, Properties Composition and Control. *Bee Product Science, Beeswax Book*. Chapter 2. Mizrahi, A and Lensky, Y. (Eds.) Springer Science+Business Media, LLC, NewYork, p.15-27
- Boligon, A. A., de Brum, T. F., Zadra, M., Piana, M., dos Santos Alves, C. F., Fausto, V. P., dos Santos Barboza Júnior, V., de Almeida Vaucher, R., Santos, R. C. V. and Athayde, M. L., 2013.** Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 105–107.
- Borum, E., 2014.** Arıların Yavru Çürüklüğü İnfeksiyonlarında Doğru Teşhis, Mücadele ve Korunma Yöntemleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14(1), 44-55.
- Breed, R. S., Murray E. G. D. and Smith N. R., 1957.** *Bacillaceae*. 613-634 s. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1957, The Williams & Wilkins Company, ISBN: 57-11183, 1094 s.
- Buczek, K. And Glinski, Z., 2003.** Response of Apoidea to fungal infections. *Apiacta*, 38, 183- 189.
- Chagas, S. S., Vaucher, R. A. And Brandelli, A., 2012.** Characterization of *Paenibacillus larvae* isolates from Brazil. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(2), 79-83.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W., (1986).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, vol. 2, Sneath, P. H. A., Mair, N. S., . Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (ed.), 1105–1139.
- de Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., Foster, L. J., Fünfhaus, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K., Poppinga, L., Spivak, M., vanEngelsdorp, D., Wilkins, S., and Genersch, E., 2013.** Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-27. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11.

- Dingman, D. W. And Stahly, D. P., (1983).** Medium promoting sporulation of *Bacillus* larvae and metabolism of medium components. *Applied Environment Microbiology*, 46, 860-869.
- Dobbelaere, W., De Graaf, D.C., Reybroeck, W., Desmedt, E., Peeters, J.E. and Jacobs F.J., 2001.** Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae subsp. larvae* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 212-216.
- Dürger, B., Ceyhan, M., Alitsaous, M. ve Uğurlu, E., 1999.** *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Journal Of Biology*, 23, 377-384.
- Eleoner, A., Tendencia, L. and D de la, P., 2001.** Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195, 193-204.
- Erdoğdu, A. T., Coşkun, Y. ve İspirli Güven, S., 2011.** Tüketime Sunulan Ballarda Sülfonamid Türevi Antibiyotiklerin Kalıntılarının Belirlenmesi. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 33(47), 37-44.
- Ergün, N., 2003.** Arıcılık. Hasad yayıncılık LTD. ŞTİ., ISBN-975-8377-26-4, 119 s.
- Erkan, C. ve Aşkın, Y., 2001.** Van ili Bahçesaray İlçesinde Arıcılığın Yapısı ve Arıcılık Faaliyetleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 11(1), 19-28.
- Evans, J. D. and Armstrong, T. N., 2006.** Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BioMed Center Ecology*, 6 (4), 1-9
- Fırath, Ç. ve Genç, H. V., 1995.** Dünya Arıcılığı ve Türkiye' nin Yeri. Türkiye II. Teknik Arıcılık Kongresi, Ankara, 8-9 Şubat 1994, 20-28.
- Fırath, Ç., Genç, H. V., Karacaoğlu, M., Gürel, F. ve Koç, A. U., 2010.** Türkiye Arıcılığının Yapısal Analizi. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara, 11-15 Ocak 2010.
- Forsgren E., Budge G. E., Charriere J. D. and Hornitzky M. A. Z., 2013.** Standard methods for European foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1),1-14.
- Fries I. and Nordström, S., 2001.** Examination Of Honey and Adult Bees for Early Detection Of *Paenibacillus larvae larvae*. *APIMONDIA*, 1-6.
- Genç, F. ve Dodoloğlu, A., 2002.** Arıcılığın Temel Esasları. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ders Yayınları. No: 166. Erzurum.
- Gende L. B., Flori I., Fritz R. And Eguaras M. J., 2008.** Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components

against *Paenibacillus larvae* from Argentine. Bulletin of Insectology, 61(1), 1-4.

- Gende, L. B., Maggi, M. D., Fritz R., Eguaras M. J., Bailac P. N. and Ponzi M. I. 2009.** Antimicrobial Activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* Essential Oils Against *Paenibacillus larvae*. Journal of Essential Oil Research, 93(21), 91-93.
- Gende, L. B., Fernandez, N., Buffa, F., Rutu, L., Satta, A., Fritz, R., Eguaras, M. J. and Floris, I., 2010.** Susceptibility of *Paenibacillus larvae* Isolates to a Tetracycline Hydrochloride and Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Essential Oil Mixture. Bulletin Of Insectology, 63(2), 247-250.
- Gende, L. B., Satta, A., Ligios, V., Rutu, L., Buffa, F., Fernandez, N., Churio, S., Eguaras, M. J., Fiori, M. and Floris, I., (2011).** Searching For an American Foulbrood Early Detection Threshold By The Determination Of *Paenibacillus larvae* Spore Load in Worker Honey Bees. Bulletin Of Insectology, 64 (2), 229-233.
- Gillard, M., Charriere, J. D. and Belloy, L., (2008).** Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis.- Journal of Invertebrate Pathology, 99, 92-95.
- Girardin, H., Albagnac, C., Dargaignaratz, C., Nguyen, C. and Carlin, F., 2002.** Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. Journal Food Protection, 65, 806-813.
- González, M. J. and Marioli, J. M., 2010.** Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology, 104, 209-213. DOI:10.1016/j.jip.2010.04.005.
- Guzmana, Z. M., Cervanciab, C. R., Dimasuaya, K. G. B., Tolentinoa M. M., Abrerara G. B., Cobara, M. L. C., Fajardo A. C., Sabinob N. G., Manila-Fajardob A. C. and Chitho P. F., 2011.** Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. Applied Radiation and Isotopes, 69(10), 1374–1379.
- Günaydın, G., 2008.** Türkiye’de Arıcılığın Ekonomik ve Politik Analizi. 1.Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, 25-27 Kasım 2008, 3-10.
- Hansen, H. and Brodsgaard C.J., 1997.** The spread and control of American foulbrood. Bees for Development Journal, 76, 12-13.
- Hışıl, Y. ve Börekçioglu, N., 1986.** Balın Bilesimi ve Bala Yapılan Hileler. Gıda, Gıda Teknolojisi Dernegi Yayın Organı, 11(2), 79–82.
- Holt, J. G. And Krieg, N. R., 1984.** Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology., Ninth, Volum 2, Lippincott Williams and Wilkins (ed), 1105-1138.

- Kaftanoğlu, O., 2000.** Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Hastalıkları Koloniler Üzerindeki Etkileri ve Kontrol Yöntemleri. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi, Adana.
- Kaftanoğlu, O., Yeninar, H., Kumova, U. ve Ozkok, D., 1995.** Epidemiology and control of honeybee (*Apis mellifera* L.), diseases in Turkey. TUBİTAK Project No VHAG-925, TUBİTAK Publication No: 92-0054, Final Report. Ankara, 93 s.
- Kandemir, İ., 2010.** Pratik Arıcılık Bilgileri. Temel Petek Arıcılık Evi, 106 s.
- Karacaoğlu, M., 2012.** Türkiye Arıcılığının Yapısal Analizi. Standart Ekonomik ve Teknik Dergisi. Türk Standartlar Enstitüsü yayını, 51(601), 26-33.
- Kaya, S., 2005.** Besinlerdeki Veteriner İlaç Kalıntıları, Bilimsel ve Yasal Denetim. Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Ankara, 22-24 Eylül 2005, 12-24.
- Kevan, P. G., Hannan, M. A., Ostiguy, N. and Guzman, E., 2006.** A summary of the Varroa-virus disease complex in honeybees. American Bee Journal, 146, 694-697.
- Kılıc, A., Simsik, H. ve Kalender, H., 2010.** Dtection of American Foulbrood Disease (*Paenibacillus larvae*) By the PCR and Culture. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(5), 841-845.
- Kırbağ, S., 1999.** *Hypericum perforatum* L. 'un Değişik Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri. Journal of Qafqaz University, 2(1), 102-108.
- Klouček, P., Flesar, J., Kokoska, L., Nedorostová, L. and Titera, D., 2008.** Activity of essentials oils vapoure phase against *Paenibacillus larvae*. Planta Medica, 74, 1038.
- Konak, F., (2012).** Türkiye'de Arıcılığın Gelişimi ve Verimlilik Çalışmaları. Standart Ekonomik ve Teknik Dergisi. Türk Standartlar Enstitüsü yayını, 51(601), 34-39.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C., 1997.** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, New York, 1296-1395.
- Kuzyšinová K., Mudroňová, D., Toporčák, J., Nemcová, R., Molnár, L., Mad'ari, A., Vaníková, S. and Kožár, M., 2014.** Testing of inhibition activity of essential oils against *Paenibacillus larvae* the causative agent of American foulbrood. Acta Veterinaria Brno, 83, 9–12. DOI: 10.2754/avb201483010009
- Lal, S. and Tabacchioni, S., 2009.** Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*. Indian Journal Microbiol, 49, 2-10.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. and Nychas, G. J. E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91, 453.

- Lauro, F. M., Favaretto, M. and Covolo, L., 2003.** Rapid detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 195-201.
- Lindström, A., Korpela, S. and Fries, I., 2008.** Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie*, 39, 515–522. DOI: 10.1051/apido:2008032.
- Mărghitaş, L., Dezmirean, D., Chirilă, F., Fiţ, N. and Bobiş, O., 2011.** Antibacterial Activity of Different Plant Extracts and Phenolic Phytochemicals Tested on *Paenibacillus Larvae* Bacteria. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 94-99.
- MAYBİR, 2014.** Arı Sağlığı ve Hastalıkları. Muğla, Türkiye, 12 s.
- McSpadden Gardener, B. B., 2004.** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* in Agricultural Systems. *Phytopathology*, 94, 1252-1258.
- Mevy, J. P., Bessiere, J. M., Dherbomez, M., Millogo, J. and Viano, J., 2007.** Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chemistry*, 101(2), 682-685.
- Montes, M. J., Mercade, E., Bozal, N. and Guinea, J., 2004.** *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *International Journal System Evolution Microbiology*, 54, 1521-1526.
- Morse, R. A. and Hooper, T., 1985.** *Encyclopedia of Beekeeping*, Blandford Press, Link House, U.K. 180-183 pp.
- Muz, M. N., Solmaz, H., Yaman, M. ve Karakavuk, M., 2012.** Kış Salkımı Erken Bozulan Arı Kolonilerinde Paraziter ve Bakteriyel Patojenler. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3), 147-150. ISSN 1308-3651.
- Nafea, E. A., Gumgumjee, N. M., Danial, E. N. and Hajair, A.S., (2014).** Physiochemical and antimicrobial properties of four Egyptian honeys with reference to American foul Brood disease. *Life Science Journal*, 11, 41-46.
- Ordu TB, 2013.** Arıcılık Raporu. Ordu, Türkiye, 34 s.
- Ortelli, D., Edder, P. and Corvi, C., 2004.** Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 59 (1), 61-64.
- Ouyang, J., Pei, Z., Lutwick, L., Dalal, S., Yang, L., Cassai, N., Sandhu, K., Hanna, B., Wiczorek, R. L., Bluth, M. and Pincus, M. R., 2008.** *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. *Annals Clinical Laboratory Sciences*, 38, 393-400.

- Öder, E., 1983.** Balarısı Hastalıkları. Atatürk Üniversitesi Basımevi. Erzurum.
- Öncüer, C. ve Benlioğlu, K., 1998.** Balarısı Zararlıları, Hastalıkları ve Zehirlenmeleri. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları. Yayın no: 3, Aydın.
- Özakın, C., Aydın, L., Çakmak, İ. ve Güleğen, E., 2003.** Hazır ve Eski Peteklerin Bakteriyolojik ve Mikolojik Yönden İncelenmesi. Uludağ Bee Journal, 3, 27-30.
- Özkırım, A., Keskin, N. ve Aktaş, S., 2007.** Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden İzole Edilen *P.Larvae Larvae* Suşlarına Karşı Alternatif Antibiyotiklerin Taranması. Mellifera, 7(13-14), 2-8.
- Özkırım, A., Keskin, N., Kürkçüoğlu, M. ve Başer, K. H. C., 2012.** Evaluation of Some Essential Oils as Alternative Antibiotics Against American Foulbrood Agent *Paenibacillus larvae* on Honey Bees *Apis mellifera* L. The Journal of Essential Oil Research, 24(5), 465-470.
- Parvanov P., Russenova N. and Dimov D., 2006.** Control of American foulbrood disease without antibiotic use. Uludag Bee Journal, 3(1), 97-103.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. and Ruzal, S. M., 1998.** A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. Letters in Applied Microbiology, 27, 9-13.
- Pohorecka, K. and Bober, A., 2008.** Occurrence of *Paenibacillus larvae* Spores in Honey Samples Domestic Apiaries. Journal of Apicultural Science, 52(2), 105-111.
- Pohorecka, K., Skubida, M., Bober, A. and Zdańska, D., 2012.** Screening Of *Paenibacillus Larvae* Spores in Apiaries From Eastern Poland. Nationwide Survey. Bull Vet Inst Pulawy, 56, 539-545. DOI: 10.2478/v10213-012-0095-0
- Rada, V., Havlík, J. and Flesar, J., 2009.** Biologically active substances in the nutrition of bees (In Czech). Research Institute of Animal Production. Praha, Uhřetěves, 27-50.
- Ridderhof, J. C., Woods, G. L., Brown-Elliott, B. A., Desmond, E. P., Hall, G. S., Heifets, L., Pfyffer, G. E., Wallace, R. J., Warren, N. C. and Witebsky, F. G., 2003.** Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS document, M24-A, 23 (18)
- Roussenova, N., 2011.** Antibacterial Activity Of Essential Oils Against The Etiological Agent Of American Foulbrood Disease (*Paenibacillus larvae*). Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 14(1), 17-24.
- Rusenova, N. and Parvanov, P., 2014.** Biochemical Profile of *Paenibacillus larvae* Repetitive Element Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Genotypes in Bulgaria. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20(2), 313-316. DOI: 10.9775/kvfd.2013.9853

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989.** Molecular Cloning A Laboratory Manual, Baskı: 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sammaturo, D. and Avitabile, A., 1998.** The Beekeeper's Handbook, Cornell University Press. p. 190.
- Saridaki-Papakonstadinou, M., Andredakis, S., Burriel, A. and Tsachev, I., 2006.** Determination of tetracycline residues in Greek honey. *Trakia Journal Sciences*, 4(1), 33-36.
- Seven, İ. ve Yeninar, H., 2010.** Elazığ Yöresindeki Arıcılık İşletmelerinin Hastalık, Parazit ve Zararlılar Yönünden İncelenmesi. *New World Sciences Academy Veterinary Sciences*, 5(2), 52-65.
- Shimanuki, H. and Knox, D. A., 2000.** Bacterial Diseases. 3-8 s. *Diagnosis of Honey Bee Diseases*, 2000, Department of Agriculture, Agriculture Handbook Number 690, 57 s.
- Sıralı, R. ve Doğaroğlu, M., 2005.** Trakya Bölgesi Arı Hastalıkları ve Zararlıları Üzerine Anket Sonuçları. *Uludağ Bee Journal*, 5(5), 71-78.
- Silici, S. ve Özkök, D., 2011.** Bal Arısı Biyolojisi ve Yetiştiriciliği. Elif Yayınevi, yayın no: 26, 2. Baskı, ISBN: 978-605-4160-36-5, 236 s.
- Soundarapandian, P. S., Singh, R. and Sowmiya, S., 2013.** Recombination of Plasmid-Borne Drug Resistant *Paenibacillus* sp. Isolated From Crab (*Portunus sanguinolentus*). *Open Access Scientific Reports*, 2(1), 1-4.
- Sunay, A. E., 2006.** Balda Antibiyotik Kalıntısı Sorunu. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 6, 143-148.
- Şahinler, N. ve Gül, A., 2005.** Hatay Yöresinde Bulunan Arıcılık İşletmelerinde Arı Hastalıklarının Araştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 5(5), 27-31.
- Şimşek, D., 2010.** Muğla İli Bal Arılarının (*Apis mellifera L.*) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 100 s.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biological Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tunca, R. İ., ve Çimrin, T., 2012.** Kırşehir İlinde Bal Arısı Yetiştiricilik Aktiviteleri Üzerine Anket Çalışması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2), 99-108.
- Tutkun, E. ve İnci, A., 1992.** Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları. Demircioğlu Matbaacılık, Ankara, 156 s.

- Tutkun, E. ve Boşgelmez, A., 2003.** Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teşhis ve Tedavi Yöntemleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Ultee, A., Bennink, M. H. J. and Moezelaar, R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is the essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68(4), 1561.
- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G. And Smid, E. J., 2000.** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection, 63(5), 620.
- URL- 1, 2014.** <http://saybir55.com/aribank.htm> (03 Aralık 2014).
- URL-2, 2014.** <http://saybir55.com/takso.htm> (05Aralık 2014).
- URL-3, 2014.** www.giresuntarim.gov.tr/tr/dokuman/Arıcılık.pptx (11 Aralık 2014).
- URL-4, 2014.** <http://www.ibb.gov.tr/tr-TR/kurumsal/Birimler/VeterinerHizmetleriMd/Documents/AriYetistiriciligiEgiti mi/BalArisininMorfolojikveFizyolojikOzellikleri.pdf> (13 Aralık 2014).
- URL-5, 2014.** <http://saybir55.com/aribank/kitaplar/anlasilabiliraricilik.pdf> (13 Aralık 2014).
- URL-6, 2013.** http://abs.kafkas.edu.tr/upload/94/ARI_HAST_ATEMUR_oZKAN_2.pdf (20 Mayıs 2013).
- URL-7, 2015.** [https://www.google.com.tr/?gws_rd=ssl#q=ARILARDA+AMER%C4%B0KAN+YAVRU+%C3%87%C3%9CR%C3%9CKL%C3%9C%C4%9E%C3%9C+\(A.Y.%C3%87.\)+HASTALI%C4%9EI+Dr.+Ay%C5%9Fen+BEYAZIT+\(Uzman+Veteriner+Hekim\)+M.Arda+SEY%C4%B0SO%C4%9ELU+\(Veteriner+Hekim\)](https://www.google.com.tr/?gws_rd=ssl#q=ARILARDA+AMER%C4%B0KAN+YAVRU+%C3%87%C3%9CR%C3%9CKL%C3%9C%C4%9E%C3%9C+(A.Y.%C3%87.)+HASTALI%C4%9EI+Dr.+Ay%C5%9Fen+BEYAZIT+(Uzman+Veteriner+Hekim)+M.Arda+SEY%C4%B0SO%C4%9ELU+(Veteriner+Hekim)) (27 Ocak 2015).
- URL-8, 2015.** <http://modernarici.com/amerikan-yavru-curuklugu.html> (27 Ocak 2015).
- URL-9, 2015.** <http://devabal.com/arıcılık.php?id=30> (27 Ocak 2015).
- URL-10, 2015.** <http://www.tgw1916.net/Bacillus/larvae.html> (04 Şubat 2015).
- URL-11, 2014.** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0 (EUCAST), <http://www.eucast.org> (15 Mart 2014).
- URL-12, 2015.** Food and Agriculture Organization of United Nations, FAOSTAT-Agriculture (<http://faostat.fao.org>) (12 Nisan 2015).
- URL-13, 2015.** http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002 (10 Mayıs 2015).

- URL-14, 2015.** Foul Brood Disease of Honey Bees. Recognition and Control. Central Science Laboratory National Bee Unit, Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA); United Kingdom (*excellent publication with many pictures*), London. P.10-18 (10 Ocak 2015).
- Uygur, Ş. Ö. ve Girişgin A. O., 2008.** Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. Uludağ Arıcılık Dergisi, 8(4), 130-142.
- Ünal, H. H., Oruç, H. H., Sezgin, A. ve Kabil, E., 2010.** Türkiye’ de 2006-2010 Yılları Arasında, Bal Arılarında Görülen Ölümler Sonrasında Tespit Edilen Pestisitler. Uludağ Arıcılık Dergisi, 10(4), 119-125.
- Vallat, B., Edwards, S. and O’Neill, B., 2012.** Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health (OIE), 1, 365-380.
- Von der Weid, I., Alviano, D. S., Santos, A. L., Soares, R. M., Alviano, C. S. and Seldin, L., 2003.** Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. Journal Applied Microbiology, 95, 1143-1151.
- Yalçınkaya, A., 2008.** Hatay ve Adana Yöresindeki Bal Arılarının (*Apis mellifera* L.) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 104 s.
- Yasar, N., Güler, A., Yesiltas, H.B., Bulut, G. ve Gökçe, M., 2002.** Karadeniz Bölgesi Arıcılığının Genel Yapısının Belirlenmesi. Mellifera, 2-3, 15-24.

EKLER

EK-1. Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen sekansları

> *Paenibacillus* sp. PB1a1

GGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAA
ACGTGGGCTAATAACCGGATAGGCGATTCCTCGCATGAGGGAGTCGGGAAAG
GCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTATGGAG
AGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTTAAACCCGGGGC
TCAACTCCGGGTTCGCATCGGAAACTGCGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAA
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT
GCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCA
TTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGTCCCTAGAGACAGGGCTTCCCTTC
GGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAAT
GGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCCTAAAAAG
CCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATT
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA

> ***Bacillus* sp. PB1a2**

TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACT
TACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATC
GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCT
TGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC
AGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT
CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTA
AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
GCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC

> ***Paenibacillus* sp. PB1b**

GTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAAACGTGGGCTAATA
CCGGATAGGCGATTTCCCTCGCATGAGGGAGTCGGGAAAGGCGGAGCAATCTG
CCTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG

CAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTATGGAGAGTAACTGTTCC
ATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTTAAACCCGGGGCTCAACTCCGGG
TCGCATCGGAACTGCGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAG
GGGTTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGACAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT
CTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAATAACAATGGCTGGTACAAC
GGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGTTC
GGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCCCTC
ACACCACG

> *Paenibacillus* sp. PB2a

TCCTGATGCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTTA
AGACCGGATAACTCACGGAAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTTCCCT
CGCATGAGGGAGTCGGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCT
ACGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGC
CAGGGAAGAACGCTATGGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGA
AGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATGTAAG

TCTGGTGTTTAAACCCGGGGCTCAACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGCGTGA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGT
ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTGATACCCTTGGTG
CCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGTC
CTAGAGACAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTAACTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGTGAAGTCCCGG
ACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGA
GGCGGAGCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

> *Bacillus* sp. PB2b

GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGAGCTAATAACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGA
AAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC

ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGC
TTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT
GCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAAT
CCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGA

> *Bacillus* sp. PB2c

TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGT
TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAG
TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA
GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAG
ATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT

CTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTA
GCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

> *Paenbacillus larvae* PB3.1a

GCCTGTAAGACCGGGATAACTTGC GGAAACGTGAGCTAATACCGGATAGCTG
GTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCACTTACAGA
TGGGCCTGCGGCGCATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAGGCGAC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAG
CTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGGAGTGACG
GTA CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG
GTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCACTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAATTCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGG
CCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGAT
ACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCC
TCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGAGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGCACTCTAA
GATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGTACAACGGG
AAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGATCTCAGTTCGGA
TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCCGTCA

> *Paenibacillus larvae* PB3.2a

GCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTAATACCGG
ATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCAC
TTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGAT
CGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGG
AGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCG
CACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAATTCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGG
TTTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCA
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTG
ACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGAG
ACAGGTGGTGATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGC
ACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTCGGTAC
AACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGATCTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC

> *Paenibacillus larvae* PB3.3a1

CCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTAATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCA
TGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG

AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCA
AGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAA
GAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGT
CTGGTGTTTAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCACTGGAAACTGGGAGA
CTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGA
CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGC
CGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGT
TTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGCACTCTAAGATGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
GCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAG
CGATCCGGAGCCAATCCTCAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA
ACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGG

> *Paenibacillus larvae* PB3.2b2

CACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTA
ATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAAC
CTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGG
CTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTG
CCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGGGGCTCAACCC
CGTTTCGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAAT

TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGT
GTTAGGGGTTTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG
CACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGA
CAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGA
GGTGGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAAGCCG
ATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA

> *Paenibacillus* sp. PB3.3b

ATACGTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAAACGTGGGGCT
AATACCGGATAGGCGATTTCCCTCGCATGAGGGAGTCGGGAAAGGCGGAGCAA
TCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGG
CTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTATGGAGAGTAACTGT
TCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTTAAACCCGGGGCTCAACTCCG
GGTCGCATCGGAAACTGCGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGGCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTT
AGGGGTTTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT

CTTGACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGACAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCA
CTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGTACA
ACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGT
TCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG

> *Paenibacillus* sp. PB3.3b1

TACGTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAAACGTGGGCTA
ATACCGGATAGGCGATTCCTCGCATGAGGGAGTCGGGAAAGGCGGAGCAAT
CTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGG
CTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTATGGAGAGTAACTGT
TCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTTAAACCCGGGGCTCAACTCCG
GGTCGCATCGGAAACTGCGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTT
AGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGACAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCA
CTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGTACA
ACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGT

TCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG

> *Paenibacillus larvae* PB4

AACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTAATACCGGAT
AGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCACTT
ACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCCTGGAG
TGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
AGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCA
CTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTT
TCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTT
TCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGAC
ATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGAGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGCAC
TCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTCGGTACAA
CGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGATCTCAGTT
CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG

> *Paenibacillus larvae* PB5a

ACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTAA
TACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACC

TGTCACCTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGC
TTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGC
CCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCCC
GGTTCGCACTGGAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG
TTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
CAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGACA
GAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGG
TGGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTC
GGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGAT
CTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT

> *Paenibacillus larvae* PB5b

GCTAATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGG
CAACCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTA
ACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTA
ACTGCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC

GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGGGGCTCA
ACCCCGGTTTCGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCT
AGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA
CCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGG
GGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACG
CAGAGGTGGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACA
ATGGTCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAA
GCCGATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAAT
TGCTAGTAATCGCG

> *Paenibacillus larvae* PB6a

CACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTA
ATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAAC
CTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGG
CTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTG
CCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGGGGCTCAACCC
CGGTTTCGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGT
GTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGC

CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG
CACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGA
CAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGA
GGTGGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAGCCG
ATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG

> *Paenibacillus larvae* PB6b

CACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGCGGAAACGTGAGCTA
ATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAAC
CTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGG
CTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTG
CCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCCGGGGCTCAACCC
CGGTTTCGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGT
GTTAGGGGTTTTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG
CACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACCTTTTCCTTCGGGGA
CAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGA
GGTGGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT

GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAAGCCG
ATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC

> *Paenibacillus* sp. PB9a

GGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACT
CACGGAAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTCCTCGCATGAGGGAGTC
GGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCT
AGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACG
CTATGGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCATGTAAGTCTGGTGTAAA
CCCGGGGCTCAACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGCGTGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAAAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAAC
ACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGACAGG
GCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACTTTAGT
TGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGTGAAGTCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTACTACAATGGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAA
TCCTAAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGA
AGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA

> *Paenibacillus* sp. PB9b

GGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACT
CACGGAAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTCCTCGCATGAGGGAGTC
GGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCT
AGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACG
CTATGGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTTAAA
CCCGGGGCTCAACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGCGTGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAAC
ACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGACAGG
GCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACTTTAGT
TGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTACTACAATGGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAA
TCCTAAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGA
AGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GG

ÖZGEÇMİŞ

Yıldız BAŞ, 21/02/1988 tarihinde Rize’de doğdu. İlköğretimini 1998 yılında Rize ilinde Pekmezli İlköğretim Okulu’nda, Ortaöğretimini 2001 yılında Rize ilinde Taşlıdere Gazi İlköğretim Okulu’nda ve Lise öğretimini 2004 yılında Rize ilinde Özel İlgi Lisesi’nde tamamladı. 2006 yılında başladığı lisan eğitimini 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde 2,61 derecesi ile tamamladı. 2011 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü’nde başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. Saruhan Tav. Paz. İnş. Nak. Ltd. Şti kurumunda sorumlu yöneticilik olarak 2011-2014 yılları arasında görev yapmıştır. Orta seviyede İngilizce bilen Yıldız Baş, evli ve 1 çocuk annesidir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

Alpay Karaoğlu, Ş., Yılmaz, Y., Tosun, G., Bozdeveci, A. ve Uzunalioğlu E., 2014. Bal Peteklerinden İzole Edilen Sporlu Basillerin Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

Uzunalioğlu, E., Yılmaz, Y., Bozdeveci, A., Çelik, A., Şahin, R. ve Alpay Karaoğlu, Ş. 2014. Çeşitli Meyvelerinden İzole Edilen Maya Mantarlarının Tanımlanması ve Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

Uzunalioğlu, E., Yılmaz, Y., Günay, B., Atmaca, B. ve Alpay Karaoğlu, Ş. 2014. Çeşitli Meyvelerde Bozulma Etkeni Mikrofungusların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

Alpay Karaoğlu, Ş., Tosun, G., Yılmaz, Y., Bozdeveci, A., Özdemir, T., Terzioğlu S., Akpınar, R., Nispet, C. ve Yaylı, N. , 2014. Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalıklı Örneklerden *Paenibacillus larvae* İzolasyonu, Karakterizasyonu, Antibiyotik ve Bitki Ekstraktlarına Karşı Duyarlılıkları. 4. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, 4-9 Kasım 2014.

Akpınar, R., Alpay Karaoğlu, Ş., Tosun, G., Yılmaz, Y., Bozdeveci, A., Özdemir, T., Terzioğlu, S., Yaylı, N. ve Nispet, C., 2014. Hastalıklı Peteklerden *Paenibacillus larvae*’nin İzolasyonu, Karakterizasyonu, Antibiyotik Ve Bitki Ekstraktlarına Duyarlılıkları. Apimondia 5. Apimedica ve 4. Apiquality Forum, Erzurum, Türkiye, 1-5 septembar.