

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ ŞÜPHELİ ARI (*Apis mellifera*)  
VE ARI ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF  
BAKTERİLERİN KARAKTERİZASYONU, ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIKLARI VE *Paenibacillus larvae* İZOLATLARININ  
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

**MÜBERRA PINARBAŞ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU**

**2. DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. ELİF SEVİM**

**TEZ JÜRİLERİ**

**PROF. DR. SABRİYE ÇANAKÇI**

**YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ**

**YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**






**RİZE-2017**

**Her Hakkı Saklıdır**

**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ ŞÜPHELİ ARI (*Apis mellifera*) VE ARI  
ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF BAKTERİLERİN  
KARAKTERİZASYONU, ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE *Paenibacillus*  
*larvae* İZOLATLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında Müberra PINARBAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/08/2017 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Üyeleri</b>	<b>Ünvanı Adı Soyadı</b>	<b>İmzası</b>
Başkan	: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI	
Üye	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Elif SEVİM	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU	

  
Doç. Dr. Ferhat KALEYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



## ÖNSÖZ

Amerikan yavru çürüklüğü şüpheli arı (*Apis mellifera*) ve arı ürünlerinden izole edilen gram pozitif bakterilerin karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları ve *Paenibacillus larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği araştırıldığı bu çalışma, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yıllardır arıcıların çok fazla sayıda koloni kayıpları vermelerine neden olan en büyük bakteriyel hastalıklardan biri olan Amerikan yavru çürüklüğü hastalığı konusunda yeni çözüm yolları bulunmasına yardımcı olacak bu çalışmayı yapmama olanak sağlayan, yüksek lisans eğitimim boyunca, tez çalışmamın her anında önerileri ve paylaşımlarıyla yardımını ve desteğini esirgemeyen, bir danışmandan çok yeri geldiğinde bir anne, kimi zaman bir abla gibi hayat tecrübelerinden faydalandığım çok değerli danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na ve Doç. Dr. Elif SEVİM'e teşekkürlerin en büyüğünü borç bilirim.

Numune temininde Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı çalışanlarına ve Veteriner Dr. Rahşan AKPINAR'a, ayrıca bölgemizin duyarlı arıcılarına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca, attığım her adımda desteklerini her zaman arkamda hissettiğim maddi ve manevi olarak yanımda olan canım ailem; babam Mehmet, annem Melahat, ağabeylerim Süleyman ve Şeref, ablam Nurcan, can yoldaşım kardeşim Büşra ve minik elleriyle hayatıma anlam katan yeğenlerim Fatih ve Yunus Emre'ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezinin izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları RTEÜ BAP tarafından 2015.53001.102.03.04 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Müberra PINARBAŞ**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Amerikan Yavru Çürüklüğü Şüpheli Arı (*Apis mellifera*) ve Arı Ürünlerinden İzole Edilen Gram Pozitif Bakterilerin Karakterizasyonu, Antibiyotik Duyarlılıkları ve *Paenibacillus larvae* İzolatlarının Genetik Çeşitliliği” 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. 22/08/2017



Müberra PINARBAŞ

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

## ÖZET

# AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ ŞÜPHELİ ARI (*Apis mellifera*) VE ARI ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF BAKTERİLERİN KARAKTERİZASYONU, ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE *Paenibacillus larvae* İZOLATLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ

Müberra PINARBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Bu çalışmada, Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı şüpheli arı ve arı ürünlerinden izolen edilen Gram-pozitif bakterilerin karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları ve *Paenibacillus larvae* izolatlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 64 izolatın fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin yanında moleküler tanımlama için 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi metodu kullanıldı ve mikroorganizmaların tür tayini yapıldı. İzolatların 18'i *Paenibacillus larvae*, 15'i *P. dentrificiformis*, 1'i *P. alvei*, 8'i *Bacillus subtilis*, 3'ü *B. pumilus*, 2'si *B. licheniformis*, 1'i *B. amyloliquefaciens*, 3'ü *Staphylococcus warneri* olarak tür düzeyinde tanımlandı. İzolatların 10'u *Bacillus* sp., 2'si *Kocuria* sp. olarak sadece cins seviyesinde tanımlandı. Çalışmada izole edilen 63 izolatın 54'ünün (%86) kullanılan antibiyotiklerden en az birine dirençli olduğu tespit edildi. İzolatların 38'i (%60) kullanılan iki ve daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu ve çoklu direnç taşıdıkları tespit edildi. Diğer yandan tanımlanan *Paenibacillus larvae* izolatlarının genetik çeşitliliğini belirlemek için BOX A1R ve MBO REP1 primerleri vasıtasıyla rep-PZR DNA parmak izi yöntemi kullanıldı. Yapılan rep-PZR sonuçlarına göre 18 izolatın 8'i (%53) Ab genotipinde iken, 7'si (%39) Aβ, 2'si (%11) AB ve 1'i (%6) ab genotipinde olduğu tespit edildi. Çalışmada izole edilen 18 *P. larvae* izolatının her birinin 1 adet plazmit DNA içerdiği tespit edildi. Aynı zamanda tetrasiklin ve oksitetrasiklin dirençli olan 8 *P. larvae* izolatında *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* ve *tet(W)* genleri, plazmit DNA'lar kalıp olarak kullanılarak tarandı. Yapılan çalışmada 7 izolatın *tet(W)* geni yönünden pozitif olduğu tespit edilirken, 8 izolatın *tet(M)* geni yönünden pozitif olduğu tespit edildi.

**2017, 101 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ), *Paenibacillus larvae*, rep-PZR DNA parmak izi, tetrasiklin direnç genleri.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION AND ANTIBIOTIC SENSITIVENESS OF GRAM POSITIVE BACTERIA ISOLATED FROM AMERICAN FOULBROOD SUSPECT BEE (*Apis mellifera*) AND BEE PRODUCTS, WITH GENETIC DIVERSITY OF *Paenibacillus larvae* ISOLATES

Müberra PINARBAŞ

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

In this study, it was aimed to determine the characterization of Gram-positive bacteria which were isolated from bee and bee products suspected the American Foulbrood disease, their susceptibility to antibiotics and the genetic diversity of *Paenibacillus larvae* isolates. In addition to the physical and biochemical properties of 64 isolates, the 16S rRNA gene sequences were used for molecular identification and species identification of the isolates were performed. The isolates were identified at species level as *Paenibacillus larvae* (18 isolates), *P. dentrificiformis* (15 isolates), *P. alvei* (1 isolate), *Bacillus subtilis* (8 isolates), *B. pumilus* (3 isolates), *B. licheniformis* (2 isolates), *B. amyloliquefaciens* (1 isolate) and *Staphylococcus warneri* (3 isolates). Ten isolates were identified *Bacillus* sp. and two isolates were identified as *Kocuria* sp. at genus level. It was determined that 54 of the 63 isolates (86%) used in this study were found to be resistant to at least one of the antibiotics used. It was found that 38 isolates (60%) were resistant to two or more antibiotics used and had multiple resistance. On the other hand, the rep-PCR DNA fingerprinting method was used to determine the genetic diversity of the identified *Paenibacillus larvae* isolates via BOX A1R and MBO REP1 primers. According to the rep-PCR results, it was determined that 8 of 18 isolates (53%) were Ab genotype, 7 (39%) were Ab, 2 (11%) were AB and 1 (6%) was ab genotype. It was determined that each of 18 *P. larvae* isolates used in the study contained 1 plasmid DNA. At the same time, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* and *tet(W)* genes were screened using plasmid DNAs as template DNA in 8 *P. larvae* isolates which were resistant to tetracycline and oxytetracycline and the *tet(W)* gene was detected in 7 isolates while *tet(M)* gene was detected in 8 isolates.

**2017, 101 pages**

**Keywords:** American Foulbrood, *Paenibacillus larvae*, rep-PCR DNA fingerprinting, tetracycline resistance genes.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bal Arısı Taksonomisi.....	3
1.3. Bal Arısı Biyolojisi.....	4
1.4. Bal Arısı Morfolojisi.....	4
1.5. Arı Ürünleri.....	5
1.5.1. Bal.....	5
1.5.2. Balmumu.....	5
1.5.3. Polen.....	6
1.5.4. Propolis.....	6
1.5.5. Arı Sütü.....	7
1.5.6. Arı Zehiri.....	7
1.6. Arı Hastalıkları.....	8
1.7. Bal Arısı Larvalarında Görülen Bakteriyel Hastalıklar.....	10
1.7.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ).....	10
1.7.1.1. <i>Paenibacillus larvae</i> 'nin Genel Özellikleri.....	11
1.7.1.2. <i>P. larvae</i> 'nin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	12
1.7.1.3. <i>P. larvae</i> 'nin Kültürel Özellikleri.....	13
1.7.1.4. <i>P. larvae</i> 'nin Biyokimyasal Özellikleri.....	13
1.7.1.5. <i>P. larvae</i> ' da Antibiyotik Kullanımı.....	14
1.7.1.6. Hastalığın Bulaşma Şekli ve Hayat Evresi.....	15
1.7.1.7. Hastalığın Belirtileri.....	15
1.7.1.8. AYÇ Hastalığının Önlenmesi.....	17

1.7.1.9.	AYÇ Hastalığının Tedavisi.....	17
1.7.1.10.	AYÇ ile Mücadele Yöntemleri.....	18
1.7.2.	Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ).....	19
1.7.3.	Pudramsı Hastalık (Powdery Scale).....	21
1.8.	Literatür Özeti.....	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Materyal.....	24
2.1.1.	Çalışma Grubu.....	24
2.1.2.	Kullanılan Besiyerleri.....	24
2.1.2.1.	Mueller-Hinton Broth, Yeast Extract, Potasyum Fosfat, Glukoz, Sodyum Pirüvat, Agar ve Broth Besiyerleri (MYPGP).....	24
2.1.2.2.	Mueller Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	25
2.1.2.3.	Nutrient Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	25
2.1.2.4.	İndol Besiyerinin Hazırlanması.....	25
2.1.2.5.	Nitrat Besiyerinin Hazırlanması.....	26
2.1.2.6.	Jelatin Besiyerinin Hazırlanması.....	26
2.1.2.7.	Voges Proskauer Besiyerinin Hazırlanması.....	26
2.1.2.8.	Lesitinaz Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	27
2.1.2.9.	Sitrat Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	27
2.1.2.10.	Dihidroksiaseton Besiyerinin Hazırlanması.....	27
2.1.2.11.	Karbonhidratlardan Asit Üretim Testi.....	28
2.1.2.12.	Oksidaz Testi.....	28
2.1.2.13.	Katalaz Testi.....	28
2.1.2.14.	Antibiyogram Besiyeri.....	29
2.1.3.	Kullanılan Boyalar ve Ayıraçlar.....	29
2.1.3.1.	Gram Boyama Seti.....	29
2.1.3.2.	Nitrat Ayıraçları.....	30
2.1.3.3.	Voges-Proskauer Ayıraçları Hazırlanması.....	30
2.1.3.4.	Fehling Solüsyonu'nun Hazırlanması.....	30
2.1.3.5.	Kovaks Ayırıcının Hazırlanması.....	30
2.2.	Metod.....	31
2.2.1.	Numunelerin Toplanması.....	31
2.2.2.	Numunelerin Hazırlanması.....	31



2.2.3.	MYPGP ve Nutrient Agar Besiyerlerine Ekim .....	32
2.2.4.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması .....	32
2.2.5.	Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	32
2.2.5.1.	Gram Boyama .....	32
2.2.5.2.	Katalaz Testi.....	33
2.2.5.3.	Oksidaz Testi.....	33
2.2.5.4.	Lesitinaz Testi .....	33
2.2.5.5.	Nitrat Redüksiyon Testi .....	34
2.2.5.6.	Voges-Proskauer Testi (VP).....	34
2.2.5.7.	Jelatin Testi .....	35
2.2.5.8.	Sitrat Kullanım Testi.....	35
2.2.5.9.	Dihidroksiaseton Testi .....	36
2.2.5.10.	Karbonhidratlardan Asit Üretme Testi.....	36
2.2.5.11.	İndol Testi .....	36
2.2.6.	İzolatların 16S rRNA Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi .....	37
2.2.6.1.	Genomik DNA İzolasyonu .....	37
2.2.6.2.	Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi .....	37
2.2.6.3.	16S rRNA Geninin PZR ile Arttırılması .....	38
2.2.6.4.	Veri Analizi .....	39
2.2.7.	Antibiyogram Testi .....	39
2.2.8.	<i>P. larvae</i> İzolatlarının Genetik Çeşitliliği.....	40
2.2.9.	<i>P. larvae</i> İzolatlarının Plazmit DNA İzolasyonları .....	41
2.2.10.	<i>P. larvae</i> İzolatlarında Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi .....	41
3.	BULGULAR.....	43
3.1.	İzolatların Morfolojik ve Fiziksel Özellikleri .....	44
3.2.	İzolatların Biyokimyasal Özellikleri .....	48
3.3.	İzolatların Moleküler Tanımlanması .....	49
3.4.	İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	59
3.5.	<i>Paenibacillus larvae</i> İzolatlarının Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi.....	66
3.6.	<i>Paenibacillus larvae</i> İzolatlarında Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi .....	67
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR .....	69

5. ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ .....	100



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bal arısının gelişim evreleri.....	4
Şekil 2.	Bal arısı morfolojisi.....	5
Şekil 3.	Arı Ürünleri .....	8
Şekil 4.	<i>Paenibacillus larvae</i> 'nin sırasıyla vejetatif,spor-vejetatif ve spor formlarının görünümü .....	11
Şekil 5.	Amerikan yavru çürüklüğü hastalığına yakalanmış larva görüntüleri.....	16
Şekil 6.	Sırasıyla AYÇ'li peteğin ve kapalı gözlerin görüntüsü .....	16
Şekil 7.	Amerikan yavru çürüklüğü hastalıklı larvalarda ipliksi görünüm.....	17
Şekil 8.	Avrupa yavru çürüklüğü hastalığından ölmüş larva görüntüleri .....	20
Şekil 9.	Örnekleme alanları .....	31
Şekil 10.	İzolatların spor ve vejetatif hücre görünümleri .....	48
Şekil 11.	<i>P. larvae</i> izolatların petrideki koloni morfolojisi görünümleri.....	48
Şekil 12.	<i>Paenibacillus</i> izolatların filogenetik ağacı.....	52
Şekil 13.	<i>Bacillus</i> izolatların filogenetik ağacı.....	56
Şekil 14.	Gram-pozitif kok izolatların filogenetik ağacı .....	58
Şekil 15.	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının BOXA1R ve MOBREP1 rep-PZR sonuçları.....	65
Şekil 16.	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının genetik çeşitliliğinin yayılımı .....	66
Şekil 17.	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının <i>OtrA</i> ve <i>OtrB</i> geni agaroz jel görüntüsü .....	67
Şekil 18.	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının <i>tet</i> genleri agaroz jel görüntüsü.....	68

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Arıcılık yapan bazı ülkelerinin 2013 yılı koloni sayıları ve bal verimleri ..	2
<b>Tablo 2.</b>	Bal arısında görülen hastalık ve etkenleri .....	9
<b>Tablo 3.</b>	Test edilen antibiyotiklerin isimleri, kısaltmaları, doz içerikleri, dahil oldukları antibiyotik grupları ve etkinlik zon çapları .....	40
<b>Tablo 4.</b>	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnç genlerini çoğaltmak için kullanılan primerler. ....	42
<b>Tablo 5.</b>	AYÇ şüpheli örneklerin numaraları, alındıkları yerler, örnek orijinleri ve elde edilen izolat numaraları.....	43
<b>Tablo 6.</b>	Çalışmada izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	46
<b>Tablo 7.</b>	<i>Paenibacillus</i> izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri.....	50
<b>Tablo 8.</b>	<i>Paenibacillus</i> cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları.....	53
<b>Tablo 9.</b>	<i>Bacillus</i> izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri.....	53
<b>Tablo 10.</b>	<i>Bacillus</i> cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları.....	57
<b>Tablo 11.</b>	Gram-pozitif kok izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri.....	57
<b>Tablo 12.</b>	<i>Staphylococcus</i> ve <i>Kocuria</i> cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları.....	58
<b>Tablo 13.</b>	Çalışmada izole edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri.....	61
<b>Tablo 14.</b>	<i>Paenibacillus larvae</i> dışındaki izolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri.....	63
<b>Tablo 15.</b>	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profili.....	64
<b>Tablo 16.</b>	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının genetik çeşitliliği.....	65
<b>Tablo 17.</b>	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının plazmit içerikleri.....	66
<b>Tablo 18.</b>	<i>Paenibacillus larvae</i> izolatlarının tetrasiklin direnç geni içerikleri.....	68

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AvYÇ	Avrupa Yavru Çürüklüğü
AYÇ	Amerikan Yavru Çürüklüğü
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz Çifti
Cfu	Koloni Oluşturabilen Birim
cm	Santimetre
CMC	Karboksi Metil Selüloz
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diaminotetraasetik Asit
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EtOH	Etil Alkol
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
G	Gram, Dünyanın Yerçekimi İvmesi
Kg	Kilogram
MAYBİR	Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MYPG	Mueller-Hinton Broth, Maya Özütü, Sodyum Pirüvat, Glukoz
NCBI	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
Ng	Nanogram

NJ	Neighbor-Joining
OTB	Ordu Ticaret Borsası
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
rep-PZR	Tekrarlayan Element PZR Parmak İzi
PFGE	Değişken Alanlı Jel Elektroforezi
RFLP	Retriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
pH	Hidrojen İyon Konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Sn	Saniye
T	Oksitetrasiklin
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tetrasiklin
TUIK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Ünite
UV	Ultra Viyole
ÜTB	Ünye Ticaret Borsası
V	Volt
vb	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Arıcılığın geçmişi insanların mağara hayatı sürdükleri binlerce yıl öncesine kadar uzanmaktadır. M.Ö. 7000 yıllarına ait olduğu düşünülen mağaraların duvarlarına yapılan resimler, çok eski medeniyetlere ait arı fosilleri bu bilgileri doğrular niteliktedir. İlk insanlar ağaç kovukları ya da kaya oyuklarına yuva yapan arıları öldürerek ballarından faydalanmışlardır. Tarihi gelişim süresince taş devrinden itibaren; önce mantar ve ağaç kütüklerinden sonra ise toprak ve kilden yapılmış kovan benzeri kaplar kullanılmış ve bugün kullanılan modern kovanlar geliştirilmiştir. Gerçek arıcılık, insanların ağaç kovukları içinde koloni oluşturan arılara zarar vermeden bir miktar bal alırken, bir miktar balı da arılara yem olarak bırakmaları ile başlamıştır. Arıların gen merkezleri Orta Doğu ülkeleri olduğu için arıcılığın ilk başlangıcında bu ülkelerde olmuştur. Bunun yanısıra M.Ö. 1300 yıllarına ait olduğu düşünülen Hititler devrinden kalma Boğazköy'deki taş yazıtlarda arılardan söz edilmesi arıcılığın Anadolu'da da çok eski tarihlerde yapıldığını göstermektedir (URL-1).

Son birkaç yıla kadar ilkel olarak yapılan arıcılık, birçok bilimsel çalışma ve gelişmelerin ışığında günümüzde yapılan modern arıcılığa kadar gelişme evresi geçirmiştir. Günümüz arıcılığına gelmesinde; 1787 yılında ana arının havada çiftleştiğinin tespiti, 1845 yılında arı üreme biyolojisinin açıklanması, 1851 yılında çerçevesiz fenni kovanın keşfi, 1857 yılında temel petek kalıplarının bulunması, 1865 yılında bal süzme makinesinin icadı, 1882 yılında larva transfer yöntemiyle ana arı yetiştirme tekniğinin keşfi ve 1926 yılında ana arılarda yapay döllemenin bulunması gibi icatlar bu gelişmeye önemli katkıda bulunmuştur. Milattan önceki dönemlere kadar uzanan arıcılık her çağda insanların ilgisini çekmiştir. Arılardan elde edilen ürünlerin insan sağlığına faydalı, hayat kalitesini artırıcı etkileri ise arılara olan ilgiyi arttırmıştır. Son dönemlerde ise arıcılık sektörü büyük bir gelişme göstererek insan hayatında özel bir yer almıştır. Özellikle Uzak Doğu ülkelerinde apiterapi sektörünün gelişmesi arıcılığın ulusal ekonomilerindeki payını arttırmıştır. Günümüzde arıcılık, tüm dünyada yapılan en yaygın tarımsal faaliyetlerden birisidir. Bugün dünyada yaklaşık 65,4 milyon arı kovanı bulunmakta ve 1,5 milyon ton civarında bal üretilmektedir. Üretilen balın

%25'i ticarete konu olmakta ve bal ithalatının %90'ı 20 dolayındaki büyük bal üreticisi ülkelerden tedarik edilmektedir. Dünya sıralamasında en çok kovana sahip (65 milyon) ve bal üreten (211 bin ton) ülke Çin'dir. Kovan başına ortalama dünya bal verimi 20 kg civarında olup bu rakam Çin'de 33, Arjantin'de 40, Meksika'da 27, Kanada'da 64, Avustralya'da 55, Macaristan'da 40 ve Türkiye'de 16 kg civarındadır (Tablo 1). Bu ülkeler aynı zamanda dünyada en çok bal ihraç eden ülkeleridir (URL-2).

**Tablo 1.** Arıcılık yapan bazı ülkelerinin 2013 yılı koloni sayıları ve bal verimleri (FAOSTAT, 2013; TUİK, 2016).

Ülkeler	Koloni Sayısı	Ülkeler	Bal Üretimi (ton)	Ülkeler	Verim (kg)
1.Çin	7 407000	1.Çin	303 220	1.Kanada	56,68
2.Türkiye	4 825596	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 970000	5.Meksika	55 459	5.Meksika	30,18
6.Tanzanya	2 700 000	6.Etiyopya	44 000	6.ABD	28,03
7.Kenya	2 500000	7.İran	36 000	7.Arjantin	27,27
8.İspanya	2 500 000	8.Brezilya	34 747	8.Romanya	18,81
9.ABD	2 400000	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 014820	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

Türkiye'de arıcılık, çiçeklenme dönemlerinin neredeyse tüm yıla yayılmış olması, kovan üretimi için yeterli miktarda ağaç bulunması, arıya ve ürünlerine geleneksel bir önem verilmesi, arıcılığa aktarılabilir iş gücünün bulunması, yüksek meblağ gerektirmeyen bir yatırım olması, toprağa bağlı kalmadan yapılabilmesi ve daha bir çok olumlu katkısından dolayı yıllar boyunca yapılmaktadır (ÜTB, 2014). Türkiye kovan sayısı, bal ve balmumu üretimi bakımından birçok ülkeden ileridedir ve üretilen ballar dünyanın en kaliteli balları arasındadır. Ancak bütün bunlara rağmen ülkemizde kovan başına ortalama bal verimi 16 kg civarında olup dünya ortalaması olan 20 kg'ın altındadır. Bununla birlikte, Türkiye'nin dünya bal ticaretinde %1,87'lik bir payla 10.



sırada yer alışı sahip olunan kovan varlığı ve bal üretimiyle uyum sağlamamaktadır. Hem dünya bal ticaretindeki payımız hem de koloni başına bal verimimiz ele alındığında malesef ülkemizin sahip olduğu mevcut arıcılık potansiyelinden yeterli düzeyde faydalanamadığı ortaya çıkmaktadır (URL-3).

Balın haricinde; polen, propolis, balmumu ve arı sütü gibi diğer arı ürünlerinin de dünyada ticareti yapılmaktadır. Öte yandan tarımı gelişmiş ülkelerde arıcılık, arı ürünleri üretimi yanında hatta daha önemli olarak, bitkisel üretimde miktar ve kalitenin artırılması amacıyla yapılmaktadır. Ülkemizde ise, bal haricinde arı ürünlerinin üretimi ve bal arılarının bitkisel üretimde yeterli tozlaşmanın sağlanması ve verimi arttırmak amacıyla kullanılmaları yaygın değildir (URL-4).

## 1.2. Bal Arısı Taksonomisi

Dünyada 100.000 civarında böcek türü taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Bu 100.000 tür içinde yaklaşık 23.000 arı türü bulunmaktadır. Bal arıları evrimleri süresince diğer böcek türlerinden farklılık göstererek kendilerine has morfolojik ve anatomik yapılarını geliştirmişlerdir. Örneğin bal arılarında polen toplamaya yarayan polen sepetçiklerinin oluşması bu gelişmelerden en tipik olanlarıdır. Hayvanlar aleminin böcekler sınıfında yer alan bal arısının taksonomisi aşağıda verilmiştir (URL-5).

Alem	: Animalia (Hayvanlar)
Şube	: Arthropoda (Eklembacaklılar)
Alt Şube	: Antennata (Antenliler)
Sınıf	: Insecta (Böcekler)
Takım	: Hymenoptera (Zar kanatlılar)
Aile	: Apidae (Arılar)
Cins	: <i>Apis</i> (Bal Arıları)
Tür	: <i>Apis mellifera</i> (Bal Arısı)

Ülkemizde en sık yetiştiriciliği yapılan arı alt türlerinden bazıları; *Apis mellifera ligustica* (İtalyan arısı), *Apis mellifera carnica* (Karniyol arısı), *Apis mellifera caucasica* (Kafkas arısı) ve *Apis mellifera cyriaca* (Kıbrıs arısı)'dır.

### 1.3. Bal Arısı Biyolojisi

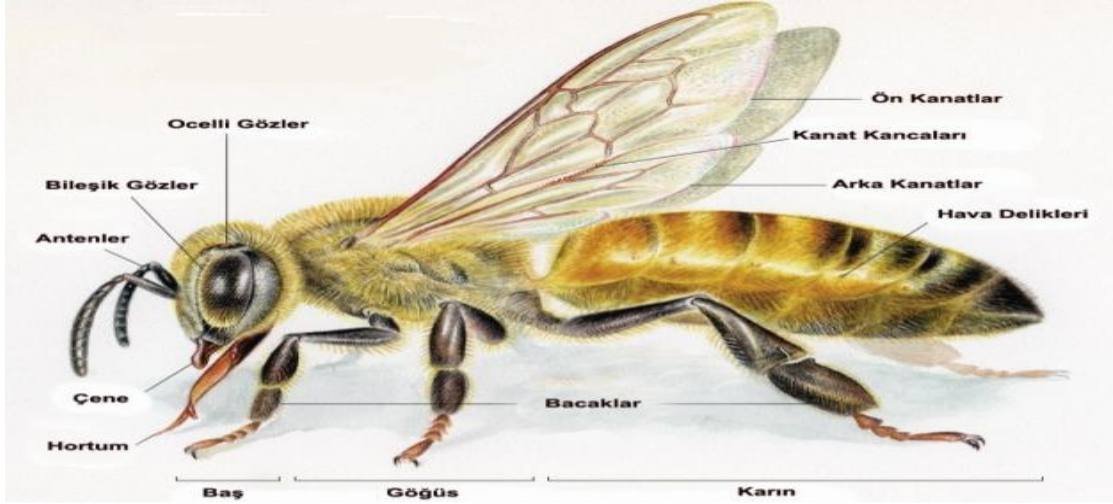
Bal arıları tam başkalaşım geçirmektedirler. Hayatlarına bir yumurta olarak başlarlar. Ana arının petek gözlerine bıraktığı döllenmiş yumurtalardan işçi arılar ve ana arılar, döllenmemiş yumurtalardan ise erkek arılar meydana gelmektedir. Bal arısı yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere 4 farklı gelişme dönemi geçirmektedir (Şekil 1). Gelişme dönemleri işçi, ana ve erkek arıda aynıdır fakat bu evreleri geçirme süreleri ana arıda 16, işçi arılarda 21, erkek arılarda da 24 gün sürmektedir (URL-6).



Şekil 1. Bal arısının gelişim evreleri (URL-7).

### 1.4. Bal Arısı Morfolojisi

Yaşamına bir yumurta olarak başlayan bal arısının vücudu gelişme döneminin sonunda baş, göğüs, karın olmak üzere üç temel kısımdan oluşur (Şekil 2). Dış iskeleti kitinden yapılmış, altı bacağı ve bir çift anteni olan bir böcektir. Bal arıları, zar kanatlılar takımının içinde yer alır. 4 adet zar kanadı, çiğneme ve emme işlevine sahip ağız parçaları bulunur. Tam başkalaşım geçirme özelliklerine sahiptir (URL-8).



Şekil 2. Bal arısı morfolojisi (URL-9).

## 1.5. Arı Ürünleri

### 1.5.1. Bal

Türk Gıda Kodeksi 2000/39 sayılı Bal Tebliğinde "Bal; bal arılarının çiçek nektarlarını, bitkilerin canlı kısımları salgıları veya bitkiler üzerinde yaşayan bazı canlıların salgılarını topladıktan sonra, kendine has bazı maddelerle karıştırarak değişikliğe uğratıp, içerisindeki su içeriğini azaltarak petek gözlerine depoladıkları tatlı madde" olarak tanımlanmıştır (Şekil 3a). İçeriğinde %16-18 su, %35-40 fruktoz, %30-35 glukoz, %7-10 maltoz, %1-2 sakkaroz, %0,04 nitrojen ve %0,2 kül bulunmaktadır. Balda K, S, Cl, Ca, P, Mg, SiO, Cu, I, Fe ve Zn mineralleri ile B, C, E ve K vitaminleri, hormonlar, bakterisit maddeler bulunmaktadır. Balın pH'sı 3,5-4,5 arasında değişmektedir. Bal insan vücut tarafından kolay ve çabuk bir şekilde sindirilir. Balın besleyici özelliğinden harici olarak kan şekerini yükseltici, fiziksel ve zihinsel yorgunluğu giderici, enerji verici, canlılık kazandırıcı, bazı yaraların iyileştirilmesi, mide, astım, dolaşım, tansiyon, solunum ve damar hastalıklarını giderici faydaları bulunmaktadır (URL-10).

### 1.5.2. Balmumu

Balmumu 12-18 günlük işçi arıların karın halkalarının alt yüzünde bulunan balmumu salgı bezleri tarafından salgılanmaktadır. Ham maddesi baldır. Saf balmumu

ilk salgılandığında beyaz renkli, ince ve saydam görünmektedir (Şekil 3c). Daha sonra polenden geçen ve yağda çözünen karotenoid pigmentleri nedeniyle rengi sarıya dönüşür ve katılaşır. Kendine has spesifik bir kokusu vardır. Balmumu temel petek, tıp, ilaç, kozmetik alanında, diş hekimliği ve marangozlukta kullanılmaktadır (URL-11).

### **1.5.3. Polen**

Polen 21 günlük işçi arılar tarafından petekteki arıların protein ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla toplanmaktadır (Şekil 3b). Arılar polenleri, çiçeklerin açtığı ve hava sıcaklığının 10°C'nin üzerinde olduğu ilkbahar mevsiminde toplarlar. Polenin kimyasal yapısı değişiklik gösterebilir yaklaşık olarak %21 ham protein, %32 karbonhidrat, %5 yağ, %3 kül, %11 su ve %28 diğer maddelerden oluşmaktadır. Polen; hücre yenileyici, sindirimi kolaylaştırıcı, canlılık verici, iştah artırıcı, hemoglobini yükseltici, seksüel aktivite artışı yanında soğuk algınlığı, sinirsel ve ülser hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (URL-12).

### **1.5.4. Propolis**

Propolis, çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk ve benzeri kısımlarından işçi arılar tarafından toplanan, reçineli ve mum kıvamında olan, hoş kokulu, suda çözünmeyen, oda sıcaklığında yarı katı halde bulunan bir maddedir (Şekil 3d). Arı bu maddeyi polenle, başı ile toraksı arasında bulunan bezlerden salgılamış olduğu aktif enzimlerle karıştırmaktadır. Propolisin rengi ve içeriği toplandığı kaynağına göre değişmekte ve kovanda arılar tarafından kovanın iç duvarlarını düzeltmek, peteklerin ağızlarını kapatmak ve başka canlıların içeriye girmesine engel olmak gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Propolis; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitripanosomal, antiinflamatuvar antioksidan, antitümoral gibi birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Bu nedenle propolis, diyabet, kalp rahatsızlıkları ve kanser gibi hastalıkların önlenmesi için gıda ve içeceklerde kullanılmaktadır (Albayrak ve Albayrak, 2008).

### **1.5.5. Arı Sütü**

Arı sütü farklı arı ırklarından sağlanmakla birlikte yapı bakımından sabittir. Arı sütünün ana maddeleri: su, proteinler, şekerler, lipitler ve minerallerdir. Su içeriği yaklaşık taze arı sütünün 2/3'ü kadar olup, kuru kısımda proteinler ve şekerler (fruktoz ve glukoz) en önemli fraksiyonlardır (Şekil 3e). Arı sütünün yapısında yaklaşık %66 su, %12,34 protein, %5,46 yağ, %12,49 şeker, %0,82 mineraller (P, Na, K, Ca, Mg vd.) ve vitaminler (C, D, E ve B vitaminlerinin tamamı) ile diğer bilinmeyen maddeler bulunmaktadır. Arı sütü ilaç ve kozmetik sanayinde, öğrenme kapasitesinin artırılmasında, cinsel sorunlarda, hücre yenilenmesinde, kolesterol ve damar sertliği tedavisinde, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (URL-13).

### **1.5.6. Arı Zehiri**

İşçi arıların zehir bezlerince üretilip zehir torbasında depolanır. Erginliğe yeni ulaşmış arıların zehir üretme yetenekleri çok az olup 12 günlük olduklarında en yüksek üretim kapasitesine ulaşırlar ve 20 günlük olduklarında zehir üretme yeteneklerini kaybederler. Fakat kışlayan arılarda bu yetenek yok olmaz. Bir işçi arı, ömrü boyunca 0.3 mg dolayında zehir üretir. Sokma sırasında iğnesini sokulan canlı üzerinde bırakan arı, daha sonra ölür (Şekil 3f). Arı zehiri; romatizmal rahatsızlıklar, kanserin bazı tipleri, adale ağrıları, eklem ve sinirsel iltihaplar, boğaz ağrısı, migren, astım, kolesterolün düşürülmesi, genel bağışıklık uyarıcı, adet öncesi sendromunda kullanılmaktadır (URL-14).



**Şekil 3(a-b-c-d-e-f).** Arı Ürünleri (a: Bal, b: Polen, c: Balmumu, d: Propolis, e: Arı sütü, f: Arı zehiri), (URL-15).

### 1.6. Arı Hastalıkları

Ülkemizde arıcılığın önemine paralel olarak bal arılarında görülen paraziter, bakteriyel, viral ve mantar kökenli hastalıklar da sektör açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle özellikle ekonomik verim kayıplarına yol açan bu hastalıkları saptamaya yönelik günümüze kadar ülkemizde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Balkaya vd., 2016).

Bal arısı hastalık ve zararlıları, arıcılığın gelişmesini yavaşlatan ve üretimi kısıtlayan en önemli faktörlerden biridir. Arının gelişme dönemi pek çok hastalık etkeni ve zararlısı için uygun ortamlar oluşturmaktadır (Aydın vd., 2003). Arılar, insanlar da dahil olmak üzere tüm hayvanlar gibi bakteri, virüs ve parazitlere duyarlıdırlar ve bu mikroorganizmalar arılarda kayıplara neden olan önemli hastalıklara yol açmaktadırlar (Tablo 2). Optimum sağlık ve beslenme durumunda, olumsuz faktörlere dirençleri daha yüksektir. Virüslere, bakterilere ve parazitlere bağlı enfeksiyonların kimyasal faktörlerle birleşmesi kovanların sağlık durumunu kötüleştirebilir (URL-16).

**Tablo 2.** Bal arısında görülen hastalık ve etkenleri (Uygur ve Girişgin, 2008; Shimanuki ve Knox, 2000).

<b>Hastalık Adı</b>	<b>Etken</b>	<b>Etken Grubu</b>
<b>Bal Arısı Yavrularında</b>		
Amerikan Yavru Çürüklüğü	<i>Paenibacillus larvae</i>	Bakteri
Avrupa Yavru Çürüklüğü	<i>Melisococcus pluton</i> <i>Paenibacillus (Bacillus) alvei</i> <i>Bacillus laterasporus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Bakteri
Pudramsı Hastalık	<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 Yavru Çürüklüğü	<i>Marator aitatulas</i>	Virüs
<b>Bal Arısı Erginlerinde</b>		
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

Arı hastalık ve zararlıları; koloni popülasyon gelişimini engelleyen, verimi azaltan, arı ve insan sağlığına doğrudan etki eden, gerekli önlemler alınmadığında ise koloni ölümlerine yol açan çok önemli bir problemdir. Bu yüzden arıcıların hastalık ve zararlılarını tanıyabilmeleri, kolonilerde yapacağı olumsuz etkileri önleyici yöntemleri bilmeleri ve bu konudaki bilgi ve birikimlerini artırmaları gerekmektedir. Arı hastalık ve zararlılarıyla mücadele de uygun olmayan zamanda bilinçsiz ve uygun dozda olmayan ilaç kullanımı sonucu bal üzerinde ilaç kalıntılarına rastlanmaktadır (URL-17).

Bunların haricinde gezgin arıcılık da hastalık ve zararlıların ülke içindeki hızlı şekilde yayılışında önemli bir faktördür. Arı hastalıkları, yavru yetiştirme dönemlerinde beklenmeyen olumsuz hava koşulları nedeniyle özellikle ilkbahar aylarında çok fazla 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).

## 1.7. Bal Arısı Larvalarında Görülen Bakteriyel Hastalıklar

### 1.7.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ)

Hastalık hakkındaki ilk araştırmalar ABD’de yapıldığı için Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) olarak adlandırılmıştır. Amerikan yavru çürüklüğü, bal arısı *Apis mellifera* ve diğer *Apis* türlerinin larva evresini etkiler, son derece tehlikeli ve ölümcüldür. Hastalığın etkeni *Paenibacillus larvae* olarak adlandırılan, 2,5-5 µm boyunda, 0,5-0,8 µm eninde Gram pozitif (+) sporlu bir basildir. Etken organizma olan *Paenibacillus larvae*, her bir enfekte larvada bir milyardan üzerinde spor oluşturabilen bir bakteridir. *P. larvae*’nin vejetatif ve spor olmak üzere iki formu bulunmakta olup genç hücrelerin içinde spor gözlenirken yaşlanmış hücrelerde vejetatif kısım kaybolarak sadece spor formu gözlenir. Vejetatif formun, ne ergin arı ne de larvalar için bir tehlike oluşturmadığı bildirilmekte ancak bu hücreler de yaşlandığında genellikle spor formuna dönüşür. Spor formu inaktif yapı olup fiziksel şartlar açısından dünyanın en dayanıklı canlılık formudur (Şekil 4). Sporlar ısıya ve kimyasal maddelere aşırı derecede dirençli, uzun yıllar kovan, ürün ve teçhizatlar da canlı kalabilir (Genersch, 2010).

AYÇ, larvalarda *P. larvae* ile kontamine gıda enjeksiyonun birinci ve ikinci gününde (yumurtadan çıktıktan 48 saat sonra) meydana gelir (Crailsheim ve Riessberger-Galle, 2001). Enfeksiyonun 12. saatinden sonra *P. larvae* sporları çimlenir ve larva bağırsağında yeni vejetatif hücreler çoğalmaya başlar (Yue vd., 2008). Enfeksiyondan birkaç saat sonra larvalarda bakteriyemi sebebiyle ölümler meydana gelir. Bal arılarının larvayı besleme seviyesine bağlı olarak bakteri hücresi bölünmesi devam eder ve besin kıtlığında spor oluşturmaya başlar (Ashiralieva ve Genersch, 2006; Lindström vd., 2008). AYÇ’ye karşı larvalarda yaşa bağlı farklı direnç söz konusu olmakta ve larvanın yaşı 32 saatlik olduğunda, hastalığa duyarlılığında azalma meydana gelmektedir. Larva yumurtadan çıktıktan 53 saat sonra *P. larvae* larvalarda hastalık oluşturmamaktadır. Yumurtadan yeni çıkmış 1 günlük larvayı enfekte etmek için 1 adet *P. larvae* sporu yeterlidir. Bal arısı larvalarında LD50 dozu yaklaşık 35 adet *P. larvae* sporu olarak bildirilmektedir (Morse ve Flottum, 1997). Hastalık oluşumu larva bulaşıklığı olan gıdayı aldıktan yaklaşık bir gün sonra *P. larvae* sporları ventrikulusta çoğalmaya başlar. Bakteri ventrikulusta üreyerek çoğalır ve bağırsak duvarını oluşturan



peritropik zarı deler ve vücut boşluğunu dolduran hemolenfe geçer. Enfekte ölü larvada ortalama 2.5 milyon spor bulunmaktadır (Morse ve Flottum, 1997; Morse ve Nowogrodzki, 1990).

#### 1.7.1.1. *Paenibacillus larvae*'nin Genel Özellikleri

*Paenibacillus larvae*'nin sistematikteki yeri (Ash vd., 1993).

Alem : Bacteria

Şube : Firmicutes

Sınıf : Bacilli

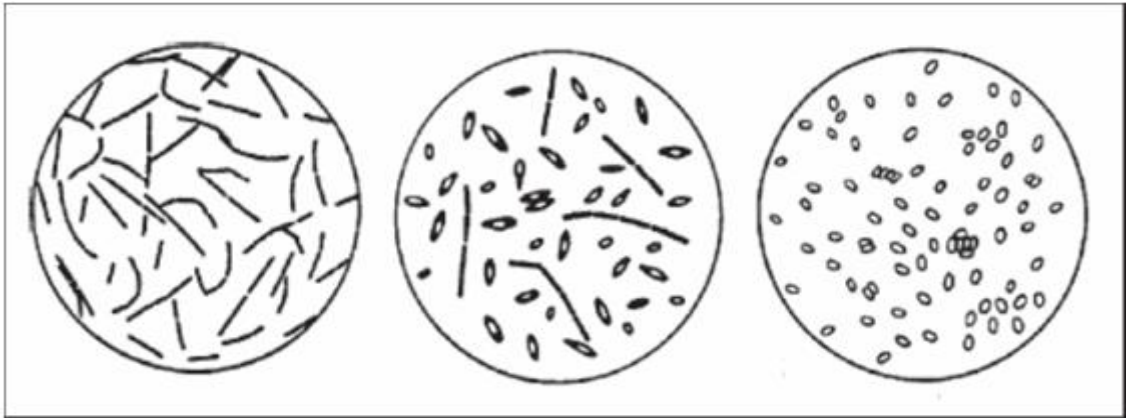
Takım : Bacillales

Aile : Paenibacillaceae

Cins : *Paenibacillus*

Türler : *P. larvae*, *P. alvei*, *P. amylolyticus*, *P. dendritiformis*, *P. lactis*

*Paenibacillus* fakültatif anaerob, endospor oluşturan Gram pozitif bir bakteri olup, *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 x 0,6 µm boyutunda ve şişkindir (Şekil 4). Karbol fuksin ile boyandığında sporların ortası berrak kalırken duvarları kırmızı-mor renge boyanır. Kültürlerinde kolonileri 3-4 mm çapında, küçük, opak, beyaz-gri renkte görülür (Breed vd., 1957; Shimanuki ve Knox, 2000).



**Şekil 4.** *Paenibacillus larvae*'nin sırasıyla vejetatif, spor-vejetatif ve spor formlarının görünümü (Shimanuki ve Knox, 2000).

Hastalık oluşturan 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, 116°C sıcaklıkta ise 20 dakikada öldüğü bilinmektedir. Bu sporlar yaklaşık olarak kovanda 33 yıl, temel petekte 45 yıl ve toprakta 60 yıl canlı kalabilmektedirler (Öncüer ve Benlioğlu, 1998).

#### **1.7.1.2. *P. larvae*’nın İzolasyonu ve Tanımlanması**

*P. larvae* bakterisi değişik çevresel koşullarda su, toprak, rizosfer, bitkisel materyaller, yem ve böcek larvalarında, hatta klinik örneklerden de izole edilmiştir (Lal ve Tabacchioni, 2009; McSpadden Gardener, 2004; Montes vd., 2004; Ouyang vd., 2008). *Paenibacillus*’un izolasyonu, vejetatif mikroorganizmaların ısıyla muamele edilerek öldürülmesinden sonra yapılmaktadır. Bu aşama ısıya dayanıklı olmayan mikroorganizmaların elemine edilmesi amacıyla yapılmaktadır. *P. larvae*’nın farklı genotiplerinin üreme yetenekleri farklıdır (de Graaf vd., 2013).

AYÇ etkeninin izolasyonu ve kültürü için temel besiyeri olarak MYPG adı verilen Muller Hinton içeren zenginleştirilmiş besiyeri kullanılmaktadır. İnkübasyon için CO<sub>2</sub> gerekmemekle birlikte %5 CO<sub>2</sub> varlığının üremeye önemli ölçüde katkı sağladığı bildirilmektedir. Kültür ortamında görünür koloniler inkübasyonun 2. gününden sonra gözlenir; ancak bazen daha fazla süreye (4-14 gün) de ihtiyaç duyabilmektedir (de Graaf vd., 2013).

*Paenibacillus larvae*’nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bazlı identifikasyonu önerilmekte ve bu amaçla birçok metod tanımlanmaktadır. 16S rRNA genine dayalı tanı metodu daha çok tercih edilmektedir. *Paenibacillus larvae* suşlarının farklı tanımlanmalarının standart tekniklerin belirlenmesi, AYÇ 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 (de Graaf vd., 2013).

Bakteriler hem geleneksel (morfolojik ve biyokimyasal testlerle) hem de

moleküler yöntemlerle (16S rRNA gen dizilerinin 27F ve 1492R primerleriyle PZR ile çoğaltılarak sekans analizleriyle) tanıları yapılabilmektedir. İzolatların farklılıklarının belirlenmesinde genotip analizleri (ERIC primerleri, MOB-Rep 1 ve BOX AIR primerleri) PZR ile yapılabilmektedir (Rusenova vd., 2013; de Graaf vd. 2013). 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).

#### **1.7.1.3. *P. larvae*'nin Kültürel Özellikleri**

*P. larvae*'nin sporulasyonu ve vejetatif büyümesi için anerobik koşullar gerekmektedir. *Bacillus* ve *Paenibacillus*'un diğer cinslerden ayrılması için temel karakteristik özelliği basit besi ortamlarında (nutrient broth veya nutrient agar) gelişmemesidir. Başlıca büyüme ortamları ise; bal arısı özütü ortamı, nutritive broth/agara %10 tavşan ya da at serumu eklenmesi ile oluşan ortam, %0,01 tiaminhidroklorid veya sodyum piruvat ilaveli Brain Heart Infusion (BHI) veya Mueller Hinton (MH) gibi zengin besi yerleri gerekmektedir. Sıvı ortamda kültürel karakterizasyonunda ise dipte üreme, sadece yüzeyde üreme veya hertarafa homojen üreme şeklinde gözlenmektedir. Bazı şuşlarında ise sıvı besiyeri yüzeyinde ince şeffaf film tabakası oluşturduğu gözlenebilir. Katı ortamda kültürel karakterizasyonu; küçük, 1-2 mm çapında krem, açık sarı, R-tipi, kum tanesi görünümlü koloniler oluştururlar. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde birçok Gram negatif ve pozitif bakterilere karşı (spor oluşturma evresinde) antimikrobiyal etkili maddeler üretmesinden dolayı geniş, mukoid, opak koloniler oluştururlar. Bazı genotipleri parlak turuncu pigmentli koloniler oluşturabilirler (URL-18; Shimanuki ve Knox, 2000).

#### **1.7.1.4. *P. larvae*'nin Biyokimyasal Özellikleri**

Mikroorganizmalarda biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi, türlerin geleneksel tanımlanmasında yaygın kullanılan bir metoddur. *P. larvae*'nin tanımlanmasında kullanılan bazı biyokimyasal özellikler; gliserol, glukoz ve trehalozdan asit üreterek hidroliz etmesi, kazein ayrıştırması, jelatini sıvılaştırması, lipaz üretimi, H<sub>2</sub>S oluşturmaları ve eskulin hidrolizi pozitifliğidir. Ayrıca nişasta hidrolizi, fenilalanin, indol, voges-

proskauer, katalaz, dihydroxyacetone üretimleri ve sitrat kullanımı testleri negatifliği tür tanısında önemli kriterlerden bazılarıdır. Nitratı nitrite dönüştürme, alkalın fosfataz, asit fosfataz, mannitol ve salisinden asit üretme testleri ise değişkenlik göstermektedir (URL-18; Shimanuki ve Knox, 2000). Kazeini hidrolizi özellikle sporulasyon evresinde güçlü proteolitik enzimleri ürettiğinin bir göstergesidir (Schuch vd., 2001).

#### **1.7.1.5. *P. larvae*' da Antibiyotik Kullanımı**

AYÇ hastalığının yayılmasını önlemek ve kontrolünü sağlamak için pek çok ülkede farklı uygulamalar yapılmaktadır. Avrupa ve ülkemizde hastalığın “ihbarı mecburi” hastalıklar grubunda yer alması, arı hastalıklarının tedavisinde izin verilmiş antibiyotik olmaması ve hastalıklı kovanların imhasını içeren kanuni düzenlemeler bunlardan bazılarıdır. Buna karşı ABD başta olmak üzere bazı ülkelerde ise antibiyotik kullanımına izin verilmektedir. Antibiyotik olarak genelde oksitetrasiklin hidroklorür, tilosin veya sulfatiazol kullanılmaktadır (Evans, 2004; Yoshiyama ve Kimura, 2009). Oksitetrasiklin, Kanada’da (Thompson vd., 2007) ve Arjantin’de (Alippi vd., 2007), tetrasiklin ile tilosin ise ABD’de (FDA-CVM, 2016) streptomisin ve sulfonamidler Meksika’da, kloramfenikol ise Çin’de hastalığa karşı en sık kullanılan antibiyotiklerdir.

Antibiyotiklerin kullanımı ile ilişkili çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiklerin larva, ergin arı ve ana arılar üzerinde olumsuz etkilerinin oluşturduğu (Peng vd.,1992), patojenlerin zaman içerisinde başta sulfathiazole ve tetrasiklin olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Evans, 2004; Lodesani ve Costa, 2005; Miyagi vd., 2000). Bazı ülkelerde oksitetrasiklin antibiyotiğinin arı üreticileri tarafından AYÇ’de yoğun ve bilinçsiz kullanımı, *P. larvae* izolatlarında tetrasiklin ve oksitetrasiklin direncinin oluşmasıyla sonuçlanmıştır. Direncin genomik olmayan (plazmid veya konjugant transpozon tarafından) horizontal yolla aktarıldığı ve hatta tetrasiklinin sub-inhibitör konsantrasyonlarda varlığının direncin artmasına neden olduğu görülmüştür. *P. larvae*’nın yüksek dirençli fenotipleri *tetK* ve *tetL* genlerinin dahil olduğu farklı tetrasiklin direnci taşıyan doğal plazmidlerin varlığının belirlenmesiyle ilişkilidir (de Graaf vd., 2013).

### 1.7.1.6. Hastalığın Bulaşma Şekli ve Hayat Evresi

Hastalığın bulaşma yolları çok sayıda olup bunların başlıcaları; sterilize edilmemiş temel peteklerin kullanımı, arıcıların kendileri, arıcı alet ve ekipmanları, hastalıklı kovanlardan diğer kovanlara çerçeve transferleri, oğul arıların hastalıklı petekteki kolonilerle birleştirilmesi, hastalık taşıyan ergin arıların varlığı, bulaşık kovanların nakilleri, kontamine ballarla arıların beslenmesi, yağmacılık, sağlam arıların hastalıklı bölgelere girmesi, hastalık bulaşmış ana arı, hastalık etkeni ile bulaşık olan eski kovanların kullanılması gibi pek çok bulaş yolu bulunmaktadır (MAYBİR, 2014).

Larva, işçi arı tarafından verilen enfekte gıdayı alarak hastalığa yakalanır. Sporlar yalnızca larvalar için hastalık etkeni olup ergin arılar *P. larvae* sporlarını hastalık etkeni değildir. Larvalar erken larva evresi denilen dönemde enfeksiyona maksimum en yüksek seviyede duyarlıdır. Bu süre boyunca, enfekte larva gıdası yoluyla yaklaşık on spor ölümcül bir enfeksiyon başlatmak için yeterlidir. Yutulan sporlar ön bağırsağa geçer ve sindirildikten 12 saat sonra orta bağırsak lümeninde çimlenir (Bamrick, 1967; Yue vd., 2008). Larvalar pupa dönemine geçerken sporlar sindirim organlarını parçalayarak kana geçer ve yavrular kapalı gözler içinde ölür. Ölen bir yavruda 2-2,5 milyar AYÇ sporu oluşur ve yavru çürüyerek petek gözünün tabanına yapışır. İşçi arılar kapalı gözlerin içinde ölen yavru arıların temizlenmesi için petek gözleri üzerinde ufak delikler açarlar. Kovan temizliği yapan arılar da üzerinde delik bulunan gözleri açarak ölü yavruları temizlemeye çalışırlar. Ölen yavruların dışarı atılması ve petek gözlerinin temizliği sırasında temizlikçi arılar AYÇ sporlarını kovan içerisine taşıyarak hastalığın yayılmasına yol açarlar. Temizlenemeyen ölü larva ve pupalar kuruyarak petek gözlerinin tabanına yapışır. Burada oluşan sporlar larva kalıntıları ve petekler üzerinde uzun yıllar canlılıklarını koruyarak hastalığın çevreye yayılmasına neden olurlar (Ergün, 2003).

### 1.7.1.7. Hastalığın Belirtileri

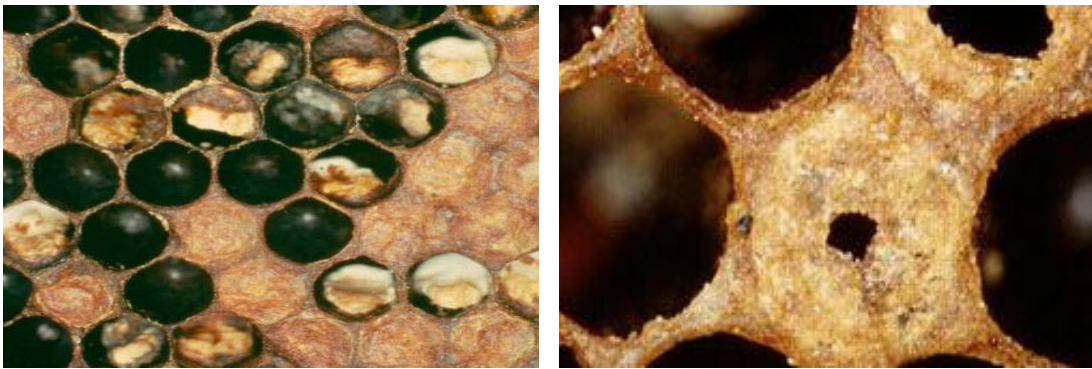
Yeni enfekte olmuş güçlü kolonilerde hastalığın farkına varmak oldukça zordur. Hastalık ilerledikçe arı sayısında bir azalma meydana gelir. Sağlıklı kolonilerde yumurta bırakılan gözlerde yavru dağılımı sık ve hepsi aynı şekilde olduğu halde hasta

kolonilerin dağılımında açık ve kapalı gözlerin karma karışık bir hal aldığı görülür. Aktif ve çalışkan olan arılarda tembellik ve halsizlik oluşmaya başlar. Ölü larvaların atılması ile boşalan gözler terk edilmiş durumdadır. Kovan kapağı açıldığında, ısıtılmış tutkal kokusu veya pis bir koku yayılabilir. Ölü larvalar ilk başta mat beyaz, açık kahve, koyu kahve ve en sonunda siyah renge döner (Şekil 5). Sağlıklı bir larva, inci beyazı görünüşünde, petek gözünde dik vaziyette bulunur. AYÇ enfekte bir larva, önce petek gözünün tabanında “C” harfi şeklinde daha sonra hücreyi dolduracak şekilde yukarı doğru gelişerek dik pozisyonda ölür (URL-19).



Şekil 5. Amerikan yavru çürüklüğü hastalığına yakalanmış larva görüntüleri (URL-20).

AYÇ ile enfekte olmuş petek ve gözleri, enfekte larva kalıntılarını içeren açık ya da boş gözlerden oluşan alacalı karakteristik bir görünüme sahiptir. Enfekte larvaların bulunduğu petek gözleri; iç bükey, koyu renkli ve sümüksü görünümündedir. Kapalı gözlerde kapağın rengi solmuş, içeriye doğru çökmüş, ayrıca delinmiş durumdadır. Enfeksiyon ilerledikçe petek gözlerinin kapaklarında düzensiz delikler oluşur (URL-22, Şekil 6).



Şekil 6. Sırasıyla AYÇ'li peteğin ve kapalı gözlerin görüntüsü (URL-21).

Ölü larvaların rengi koyu kahverengi, hatta siyah olabilir. Ölü larva koyu renk olmaya başladığında bir kibrit çöpü sokulup çekilirse, iplik gibi uzar (Şekil 7). Ölü larvaların bulunduğu peteklerde tutkal kokusu veya bozulmuş balık kokusunu andıran bir koku vardır. Ölü pupanın kurumuş kalıntısı işçi arıların temizleyemeyeceği şekilde petek gözünün içine yapışmıştır. (URL-22).



**Şekil 7.** Amerikan yavru çürüklüğü hastalıklı larvalarda ipliksi görünüm.

#### **1.7.1.8. AYÇ Hastalığının Önlenmesi**

Hastalıkla mücadelede istenilen çözüme ulaşmak için hijyen kurallarına tüm arıcıların titizlikle uyması gerekmektedir. Bunun yanısıra, arıcıların temiz kovan ve malzeme kullanması, el demirini her kovana inceledikten sonra mutlaka körük içerisinde yakarak steril etmeleri gerekmektedir. Böylece kovanlar arası hastalık yayılımı engellenmiş olur. Kovanlar düzgün bir şekilde incelenmeli, bu sırada yağmalamaya ve arıların kovanları karıştırmalarına müsaade edilmemeli, kovanlar kontrol edildiğinde mutlaka yeterli bal ve besin kaynağının olmasına dikkat edilmelidir. Yavru bırakılmış petek gözlerinde farklı renklerin oluşup oluşmadığına dikkat edilmeli, hastalık son derece ilerlemiş ise, hastalıklı kovanlar arıları ile birlikte bir çukur kazılarak içerisinde yakılmalı ve tedbir alınması gerekmektedir. Kontrol edilmemiş ve sertifikalı olmayan arıcılık ekipmanlarını satın almamaya ve kullanmamaya dikkat edilmelidir (Kandemir, 2010).

#### **1.7.1.9. AYÇ Hastalığın Tedavisi**

Amerikan yavru çürüklüğü bir çok 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 bildirilmelidir. Arıcılıkta AYÇ'yi kontrol altına almanın en etkili yolu, hastalığı erken dönemde belirlemekten geçer. Klinik bulgular, hastalığın teşhisinde önem taşısa da, kesin teşhis için hastalıklı madde alınarak laboratuvar muayenelerinin ve gerekli testlerinin yapılması gereklidir. Arıcılar şüphelendikleri kovanlardan bal, petek ve larva örnekleri alarak ilgili teşhis laboratuvarlarına gönderebilirler (URL-23).

AYÇ için tedaviler mevcuttur fakat hiçbiri kesin olarak çare değildir. İlaçlar, yalnızca semptomları baskılar ve semptomlar yeniden ortaya çıktığında kovan bir kez daha enfekte olur. Tetrasiklin AYÇ tedavisi için kullanılan bir antibiyotiktir fakat bakterileri öldürmede etkilidir, sporları etkilemez. Yine tylosin ve oksitetrasiklin de tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerdendir fakat sadece bakteriyostatik etki göstermektedirler. Aynı zamanda gereksiz ilaç kullanımı arılarda mantar enfeksiyonlarını da tetiklemektedir. Bu sebeple başta Avrupa Birliği'ne üye ve Türkiye gibi üye adayı 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).

#### **1.7.1.10. AYÇ ile Mücadele Yöntemleri**

Ülkemizde 2017 Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü genelgesine göre Arıların AYÇ hastalığı “İhbarı Mecburi” bir hastalık olup, “Tazminatlı” bir hastalık değildir. Ayrıca Avrupa Birliği'ne üye ve ülkemiz gibi üye adayı ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede antibiyotiklerin tedavi ya da koruma maksatlı kullanımı yasaktır. Dünyanın bazı ülkelerinde (ABD, Kanada ve Meksika) yasal olarak, Türkiye'de ise yasak olmasına rağmen bazı arıcılar tarafından tedavi ve koruma amaçlı antibiyotik kullanılmaktadır. Sadece arıcılık alanındaki antibiyotikler değil hayvan ve insan hastalıklarında kullanılan antibiyotikler de arıcılıkta kullanılmaktadır; ancak kullanılan bu antibiyotikler bakterinin sadece vejetatif formuna etkilidir. Hastalığın ana etkeni bakteri sporlarıdır. Antibiyotik uygulaması geçici olarak belirtileri baskılayabilir, ancak sonra tekrar hastalık ortaya çıkabilir. Yavru çürüklüğü



için kullanılan antibiyotiklerin koruma amaçlı ve sürekli kullanılması bir taraftan ballarda kalıntı problemlerine neden olmakta diğer yandan ise kullanılan antibiyotiğe karşı direnç geliştirilmesini sağlamaktadır (Genersch, 2010).

Alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bunlardan bazıları ise; enfekte bal ve kovanın imha edilmesi, enfekte arıların temiz ve boş bir kovana aktarılması, gamma ışını uygulaması, enfekte kovanın arıları petekleri ve balı yakıldıktan sonra ahşap kovan ve uygun alet ve ekipman 10 dakika süreyle ısıtılmış 160 °C'deki sıvı parafine daldırılmasıdır. Bu yöntemlerle öncelikle amaç hastalık bulaşmamış diğer kolonileri kurtarmak ve hastalığın yayılmasını engellemektir. (Anonymous, 2007; Arbia ve Babbay, 2011; Dobbelaere vd., 2001; Hansen ve Broodsgaard, 1997; Guzman vd., 2011; Parvanov vd., 2006).

Gama ışını ve sıvı parafin yönteminin 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).

Bunların haricinde bazı kimyasallar ile mücadele yöntemleride kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasallar ise ; etilen oksit, metil bromür, küllü su, potasyum hipoklorit, zefiran, hidrojen peroksit, kloramin, kalsiyum siyanit fumigasyonu vd. Fakat bu kimyasalların yarar ve zarar mukayyesi yapıldığında hastalığı önlerken farklı problemlere yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (URL-24).

### **1.7.2. Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ)**

Avrupa yavru çürüklüğü de AYÇ gibi bakteriyel bir larva hastalığıdır, fakat AYÇ kadar tahribatı yüksek değildir. Etmeni, *Melissococcus plutonius*'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*

*plutonius* olarak adlandırmışlardır.

*Melissococcus plutonius*, gram-pozitif bir bakteridir. *Paenibacillus larvae*'nin aksine spor formu bulunmayan *M. plutonius*' un vejetatif hücreleri tek başına, çiftler halinde veya çeşitli boyutlarda zincir şeklinde bulunabilir (Genersch vd., 2010).

AvYÇ kovan kapağı açıldığında kokmuş et ya da balık kokusunu andıran spesifik bir kokuya sahiptir. Açık gözlerdeki ölmüş larvalar koyu kahverengi ve siyaha yakın renktedir ve larvadaki renk değişimi önemli bir belirtidir. Koloniler çok yoğun şekilde enfekte olduklarında kapalı yavru gözlerinde de renk değişimleri görülebilir. Ölü larvalar bir çöple çekildiğinde Amerikan yavru çürüklüğünde olduğu gibi ipliksi uzama görülmez, kolayca petek hücresinden çıkartılabilir. Genellikle, Amerikan yavru çürüklüğü kapalı yavrularda görülürken Avrupa yavru çürüklüğü açık yavrularda görülür (Şekil 8).



Şekil 8. Avrupa yavru çürüklüğü hastalığından ölmüş larva görüntüleri (URL- 25).

Bu hastalığa diğer bakteri türleri de (*Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*) etken olur, ancak bunlar doğrudan hastalık oluşturmazlar. Özellikle bunlardan *Paenibacillus alvei*'nin ortamda bulunması ölen yavruların çürümesine ve uzamasına sebep olduğundan AYÇ ile bu hastalığın karıştırılmasına neden olurlar.

*Paenibacillus alvei*, gram pozitif, normal koşullarda larva bağırsağında üreyemeyen ancak hastalıklı kolonilerdeki larval kalıntılarda aerobik ortamda, saprofitik

olarak üreyebilen sporlu bir mikroorganizmadır (Bailey, 1983). Sporlanabilmesi zor koşullarda hayatta kalmasını ve germinasyon ile ölü arı üzerinde kolayca üreyebilmesini sağlamaktadır (Shimanuki ve Knox, 2000).

*Brevibacillus laterosporus*, *P. alvei* gibi sporlu bir bakteridir. Bundan dolayı *P. alvei* gibi larval kalıntılar üzerinde üreyebilen, ancak daha az rastlanılan bir mikroorganizmadır (Bailey ve Ball, 1991). *Melissoccus plutonius* 'un, enfekte larva ve bakteri arasındaki besin rekabetinden dolayı larvanın besin yetersizliğinden ölmesine neden olduğu düşünülmüştür. Ancak yapılan in vitro enfeksiyon deneylerinde, enfekte larvanın fazla besin alması sağlandığı halde, hastalık semptomlarının görüldüğü ve ölümün gerçekleştiği saptanmıştır. Bu sonuca bağlı olarak, ölümün sadece açlık kaynaklı olmadığı, ikincil enfeksiyonlar tarafından peritrofik membranın işgal edilmesine ve doku penetrasyonuna bağlı hasarların da etkili olabileceği düşünülmektedir (McKee vd., 2003). İkincil enfeksiyonların AvYÇ'deki patogenezi ve rolü tam olarak anlaşılmamakla beraber (Shimanuki ve Knox, 2000) AvYÇ, peritrofik membrana yerleşen ve besinlerin emilimini engelleyen bir sindirim sistemi enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Bailey, 1983; Shimanuki ve Knox, 2000).

### 1.7.3. Pudramsı Hastalık (Powdery Scale)

Etkeni *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* (*Bacillus pulvifaciens*)' dir. Çok az görülen bir hastalıktır. Parlak kahverengiden sarıya dönen ölü larvalardan izole edilir. Larvaların üstlerine dokunulduğunda ufalanan ele alındığında toz heline gelen bir görüntüye sahiptir. *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* vejetatif yapısı 0,3-0,6 x 1,5-3,0 µm boyunda, spor yapısı ise 1,0 x 1,3-1,5 µm boyutlarındadır. Glukoz agar ortamında iyi ürerler. Nutrient agarda 20°C'de üreyebilmesi ve Browni hareketi negatif olmasıyla *P. larvae*'den ayırt edilir. İlk izolasyonlarda kırmızı kahverengi pigment üretir, sonraki pasajlarında bu özelliğini kaybedebilir (Shimanuki ve Knox, 2000).

## 1.8. Literatür Özeti

Antunez vd. (2004)'nin Uruguay'da yaptığı çalışmada incelenen toplam 103 bal örneğinin, %73'ünde (0,5-819 cfu/g aralığında) *Paenibacillus larvae* sporlarının

varlığını bildirmişlerdir. Pohorecka vd. (2008)'nin, 2005 ve 2007 yılları arasında yaptıkları çalışmada 242 AYÇ şüpheli örneğin %56'sında *P. larvae* pozitifliğini bildirmişlerdir. Gillard vd. (2008)'nin AYÇ bulgusu olan ve olmayan kovanlarda yaptığı çalışmalarda 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 bildirilmiştir.

Kılıç vd. (2010)'nin yaptıkları çalışmada *P. larvae* şüpheli kovanlardan alınan bal ve balmumu örnekleri kültür ve PZR yöntemi ile teşhis edilmiştir. *P. larvae* DNA'sını tespit etmek amacıyla en duyarlı AF6 ve AF7 primer çifti kullanılmıştır. Bu amaçla, hastalıktan şüphelenilen 25 farklı işletmeden alınan 100 adet bal ve bal mumu örneği incelenmiş, PZR pozitif 8 örneğin 7'sinde kültür yöntemi ile *P. larvae* teşhisi yapılmıştır. 8 adet balarısı larvası PZR ile pozitif bulunmuş, kültürü negatif olan bir şüpheli örnek ise PZR ile pozitif bulunmuştur. Direkt bal ve balmumu PZR denemelerinde 1 tane balmumu, 7 adet bal örneğinde pozitiflik saptanmıştır.

Genersch ve Otten (2003)'nin Almanya'da yaptıkları bir çalışmada Rep PZR yöntemi ile BOX A1R, MBO REP1 ve ERIC primerleri kullanılarak *P. larvae* nin dört farklı genetik alt tipini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Peters vd. (2006)'nin yaptıkları çalışmada, Almanya'nın Arnsberg idari bölgesinde bal ve petek örneklerinden, AYÇ hastalığının etiyolojik ajanı olan *Paenibacillus larvae* bakterisini izole ettiklerini, 176 *P. larvae*'nin BOX A1R, MBO REP1 ve ERIC primerleri kullanılarak yapılan Rep PZR yöntemi ile 5 farklı genotipini (AB, Ab, ab, aß, AB) belirlemişlerdir. Ayrıca 3 arı örneğinde birden fazla genotip ve iki genotipin bir kombinasyonu aynı kovanın bal örneklerinden iki kez izole edildiği (ab/aß ve Ab/ab) belirtilmiştir.

Loncaric vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada, Avustralya'da 214 *Paenibacillus larvae* suşunun Rep PZR yöntemi ile MBO REP1, BOX A1R ve ERIC (ERIC I ve ERIC II) primerleri kullanılarak genotip tiplendirmesini yapmışlar ve 5 farklı genotip (ab, aB, Ab, AB, αB) bulmuşlardır. Bulunan aB ve αB genotiplerinin yeni olup daha önce aynı yöntem ile yapılan çalışmalarda henüz bildirilmediğini rapor etmişlerdir.

Rusenova vd. (2013)'nin yaptığı çalışmada, BOX A1R, MBO REP1 ve ERIC primerlerini kullanarak tekrarlayan element polimeraz zincir reaksiyonu (Rep-PZR) ile *Paenibacillus larvae* izolatlarının moleküler tiplemesi yapılmıştır. PZR sonucunda izole edilen *P. larvae*'ların genetik epidemiyolojisi incelendiğinde, Bulgar suşları için ab ve AB olmak üzere iki genotipin yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Genersch vd. (2005) ve de Graaf vd. (2013)'nin yaptıkları epidemiyolojik araştırmalarda sadece ERIC I ve ERIC II' nin Amerikan yavru çürüklüğü hastalıklı kolonilerinden sıklıkla izole edildiğini göstermişlerdir. Her ikisi de dünya çapında rapor edilmiş olmasına rağmen, ERIC II genotipinin daha kısıtlı olduğunu *Paenibacillus larvae* ERIC I genotipinin en sık görülen genotip, ERIC III ve IV genotiplerinin yıllardır tanımlanmış oldukları fakat kültür koleksiyonlarında az sayıda izolat olarak mevcut olduklarını bildirmişlerdir.

Shimanuki vd. (2000) ve de Graaf vd. (2013)'nin yaptıkları çalışmalarda *P. larvae*'nın da dahil olduğu çoğu *Paenibacillus* türlerinde yüksek tetrasiklin hassasiyeti bulmuşlardır. *P. larvae*'nin varlığı kültür ortamında 0.02 µg/ml konsantrasyonlarında tetrasiklin ilavesiyle önlediğini, alternatif olarak 5 µg'lık oksitetrasiklin diski bakteri suşlarında geniş (yaklaşık 50 mm) inhibisyon zon çaplarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Piccini ve Zunino (2001)'nin Uruguay'da 17 *P. larvae* izolatında oksitetrasiklin diskleri (5 µg) ile yaptıkları bir çalışmada, 45-55 mm inhibisyon (etkinlik) zon çapına ve <2.5 µg/ml MIC değerine sahip oldukları bildirilmiştir.

Reynaldi vd. (2008) tilmikosini, *P. larvae*'ye in vivo ve in vitro olarak test edilen ilk çalışmayı yapmış olup kolonide dozu 1000 mg/koloni olarak hesaplamış, ancak arı, larva, pupa ve balda kabul edilebilir farmakolojik kalıntı dozlarının çalışılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Alpay Karaoğlu vd. (2014) ve Sevim vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmalarda Doğu Karadeniz bölgesindeki antibiyotik direncinin azımsanamayacak seviyelerde olduğu, 29 *P. larvae* suşunda 16 farklı antibiyotik test edilmiş, sadece streptomisine dirençli suş

belirlenemezken en yüksek direnç gentamisine %39, oksitetrasikline %29 ve tetrasikline %4 olarak belirlemişlerdir.

Yapılan bir çok çalışmada (Peng vd.,1992; Evans, 2004; Lodesani vd., 2005; Miyagi vd., 2000) antibiyotiklerin larva, ergin arı ve ana arılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu, patojenlerin zaman içerisinde başta sulfathiazole ve tetrasiklin olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir.

## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Çalışma Grubu**

Bu çalışma 2014-2016 yılları arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi. Çalışmalarımız Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden gelen hastalık şüpheli petek, bal, larva ve temel petek örneklerinden izole edilen mikroorganizmalarla yapılmıştır.

#### **2.1.2. Kullanılan Besiyerleri**

##### **2.1.2.1. MYPGP Agar ve Broth Besiyerleri (Mueller-Hinton Broth, Maya Özütü, Sodyum Pirüvat, Glukoz,)**

Mueller-Hinton Broth	10 g
Maya Özütü	15g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
Glukoz	2 g
Sodyum piruvat	1 g
Agar	14 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda hassas terazi yardımı ile tartılarak

1000 ml distile suda çözüldü. 1,1 atm basınçta, 121°C'de 20 dakika otoklav edildi. Otoklavlanan besiyeri, 90 mm'lik steril petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü. Besiyerleri 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 tüplerde saklandı. Kullanılacağı süreye kadar oda sıcaklığında bekletildi (Dingman ve Stahly, 1983; Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013).

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

#### **2.1.2.2. Mueller Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Ticari (Merck) olarak temin edilen hazır besiyerinden 27 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldü ve 121°C'de 1,1 atm basınçta 20 dk otoklavda steril edildi. Steril edilen besiyeri, steril petri kaplarına 25 ml olacak şekilde döküldü. Petrilere donduktan sonra buzdolabında +4°C'de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi (Bilgehan, 2004). Hazırlanan besiyeri genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

#### **2.1.2.3. Nutrient Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Ticari (Merck) olarak temin edilen hazır besiyerinden 20 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldü ve 121°C'de 1,1 atm basınçta 20 dk otoklavda steril edildi. Steril edilen besiyeri, steril petri kaplarına herbirine 25 ml olacak şekilde döküldü. Petrilere donduktan sonra kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi. Hazırlanan besiyeri genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

#### **2.1.2.4. İndol Besiyerinin Hazırlanması**

Pepton	2 g
NaCl (Sodyum Klorür)	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda hassas terazi yardımı ile tartılıp üzerine 1000 ml distile su ilave edilerek çözüldü. 121°C’de 1,1 atm basınçta, 20 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

#### **2.1.2.5. Nitrat Besiyerinin Hazırlanması**

Beff Ekstrakt	3g
Pepton	5 g
KNO <sub>3</sub> (Potasyum Nitrat)	1g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Yukarıda verilen maddeler belirtilen oranlarda hassas terazi yardımı ile tartılıp üzerine 1000 ml distile su ilave edilerek çözüldü. 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 (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). Nitrat besiyeri, bakterilerin nitratı indirgeyebilme yeteneğini ölçmek için kullanıldı.

#### **2.1.2.6. Jelatin Besiyerinin Hazırlanması**

Nutrient sıvı besiyerine % 10 jelatin ilave edilerek kaynar suda eritildi ve 1,1 atm basınçta 121°C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. 2 ml’lik Ependorflara aktarılarak kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997).

#### **2.1.2.7. Voges Proskauer Besiyerinin Hazırlanması**

Pepton	7 g
Glukoz	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml (pH: 6.9)

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda hassas terazi yardımı ile tartılıp



1000 ml distile su ilave edilerek çözüldü. Çözünen besiyerinin pH'ı 6.8' e ayarlandı, 4 ml miktarında tüplere aktarıldı ve 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).

#### **2.1.2.8. Lesitinaz Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Üretici firmanın (Merck) önerileri doğrultusunda 34 g Brain Heart Infusion agar besiyeri hazırlanıp 1,1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilip soğutuldu. İki yumurtanın yüzeyi yıkanıp alkolle dezenfekte edildikten sonra yumurta sarıları falcon tüpüne konulup karıştırıldı ve soğuyan BHI Agar besiyerinin için eklendi. Besiyeri homojen şekilde karıştırıldıktan sonra steril 1 cm çaplı eliza plaklarına dökülerek soğutuldu ve kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi (Rhodehamel ve Harmon, 1995).

#### **2.1.2.9. Sitrata Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Üretici firmanın (Merck) önerileri doğrultusunda 22,5 g granül halindeki besiyeri tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve 121°C'de 1,1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi. 2 ml'lik Ependorf tüplerine dağıtıldı 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.

#### **2.1.2.10. Dihidroksiaseton Besiyerinin Hazırlanması**

Yeast Ekstrakt	1g
Gliserol	1,2 g
Agar	2 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda hassas terazi yardımı ile tartılıp 100 ml distile su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Çözündükten sonra besiyeri 1,1 atm

basınçta 121°C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 6’lı eliza plakalarına döküldü ve kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edildi (Vallat vd., 2012).

#### **2.1.2.11. Karbonhidratlardan Asit Üretim Testi**

Tripton	5 g
Yeast extract	15 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Alkolik bromkrezol moru	% 0.04
dH <sub>2</sub> O	1 L

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda hassas terazi yardımı ile tartılıp 1000 ml distile su ilave edilerek J broth besiyeri hazırlandı. 121°C’de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında muhafaza edildi. Test edilecek karbohidratın %10 ya da %5’lik stok solusyonları distile suda hazırlandı. Filtre ile (0,45 µm por çaplı) steril edildi. Test edileceği zaman 9 ml J broth 1 ml karbonhidrat (maltoz, laktoz, trehaloz, ksiloz, glukoz) stok solusyonu steril şartlarda karıştırılarak 0.5 ml olarak steril Ependorf tüplere aktararak kullanıldı (Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013). Bakterilerin hangi şekerleri kullanabildiklerini öğrenmek için kullanıldı.

#### **2.1.2.12. 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 Ependorf tüplerine 1 ml şeklinde dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar -20°C’de aliminyum folyaya sarılı şekilde bekletildi (Koneman vd., 1997).

#### **2.1.2.13. Katalaz Testi**

Katalaz enzimi üreten bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırılır. Bu nedenle bakterinin katalaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesinde kullanılır

(Koneman vd., 1997). %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanılarak test edilir.

#### **2.1.2.14. Antibiyogram Besiyeri**

Antibiyogram testleri için yukarıda içeriği verilen MYPGP agar ve sıvı besiyeri kullanıldı.

#### **2.1.3. Kullanılan Boyalar, Ayraçlar ve Solüsyonlar**

##### **2.1.3.1. 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 çözüldü ve oda ısısında saklandı.

**Amonyum okzalat solüsyonu (%1'lik) hazırlamak için;** 16 g amonyum okzalat (analitik saflıkta) ve 1600 ml distile su bir ışık geçirmez cam şişede karıştırıldı ve 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 kullanıldı.

**B) Lügol solüsyonu;** 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür havanda birlikte ezilip 300 ml distile su ile homojenize edilerek çözünmesi sağlandı. Karanlık 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 ışık geçirmeyen vida kapaklı şişeye aktarıldı. Üzerine 100 ml distile su ilave edilerek tamamlandı. Bir gün bekletildikten sonra zıt boya olarak gram boyamada kullanıldı (Koneman vd., 1997).

### 2.1.3.2. Nitrat Ayraçları

**A ayracı:** 0,5 g  $\alpha$ -naphthylamine tartılıp 100 ml %30' luk asetik asit içinde çözüldü.

**B ayracı:** 0,8 g sülfanilik asit tartılıp 100 ml %30' luk asetik asit içinde çözüldü.

**C ayracı:** Çinko tozu.

Hazırlanan ayraçlar ışık geçirmeyen şişelerde +4 °C'de buzdolabında saklandı (Koneman vd., 1997).

### 2.1.3.3. Voges-Proskauer Ayraçları Hazırlanması

**A ayracı:** 5 g  $\alpha$ -naphthol % 95'lik 100 ml etil alkol içerisinde çözüldü.

**B ayracı:** 10 g potasyum hidroksit 100 ml distile su içerisinde çözüldü.

Ayraçların her ikisi de karıştırılıp çözüldükten sonra kullanılacağı süreye kadar + 4°C'de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

### 2.1.3.4. Fehling Solüsyonu'nun Hazırlanması

**Solüsyon A:** 10 g sodyum hidroksit, 35 g potastum sodyum tartarat tartılıp 50 ml distile su içerisinde çözüldü.

**Solüsyon B:** 7 g bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) 50 ml distile su içerisinde çözüldü.

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

### 2.1.3.5. Kovaks Ayracının Hazırlanması

150 ml izoamil alkol, 10 g p-dimetilaminobenzaldehit, konsantre HCL ile karıştırılarak ışık geçirmeyen şişeye dolduruldu. Kullanılacağı süreye kadar + 4°C'de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997).

## 2.2. Metod

### 2.2.1. Numunelerin Toplanması

Numuneler Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan gelen Karadeniz Bölgesi'nin 10 ilinden toplanan hastalık şüpheli petek, bal, larva ve temel petek örneklerinden oluşmaktadır (Şekil 9). Laboratuvarımıza ulaşan numuneler test edileceği süreye kadar oda ısısında bekletildi. Ekim için peteklerin kararmış gözeneklerinden larva, ergin arı ve bal örnekleri toplandı.



Şekil 9. Örnek alanları (URL-26).

### 2.2.2. Numunelerin Hazırlanması

**Larva Örneklerinin Hazırlanması:** Steril şartlar altında pens yardımıyla alınan 5 adet larva 5 ml steril distile su içinde karıştırıcı yardımıyla suspense edildi. Katı larva kısımları homojenizatör yardımıyla parçalandı.

**Ergin Arı Örneklerinin Hazırlanması:** Larva safhasını tamamlamış ancak petek gözünden çıkamamış ergin arılar numune olarak kullanıldı. Bu amaçla 5 adet ergin arı %70'lik etanolde 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:** 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 örnekler için aynı yöntemler kullanıldı. 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 Nutrient 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 ve Nutrient Agar Besiyerlerine Ekim**

Isıya maruz bırakılan örneklerden sporlu bakteri (*Paenibacillus* sp.) üretimi için MYPGP ve Nutrient Agar besiyerlerine 100 µl örnek alınıp uygun şartlarda çizgi ekimi yöntemi ile ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan plaklar 37°C'de 3-4 gün %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda (mumlu kavanoz tekniği kullanılarak) etüvde inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.4. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması**

İnkübasyondan sonra MYPGP agar üzerinde üreyen bakteri kolonilerinin morfoloji ve gram boyanma özellikleri incelendi. Gram pozitif sporlu basil ve kok gözlenen kültürler, saf kültür eldesi için MYPGP agar besiyerine tek koloni alınarak pasajları yapıldı ve 37°C'de 3-4 gün %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda etüvde 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 -20 ve -80°C'de ikişer tekrarlı olarak saklamaya alındı.

### **2.2.5. Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin 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 mekanizması olayının bakterilerin hücre çeperi yapısına bağlı olduğu bilinmektedir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları gram negatiflerden farklıdır. Bunlardaki peptidoglikan katmanı daha kalındır. Her bir izolat

için bakteriyel smear hazırlandı ve alevle 3 kez tespit edildi. Hazırlanan smeara 1 dakika kristal violet ile muamele edildi ve dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Daha sonra 1 dakika lugol ile muamele edildi ve aseton-alkol ile renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra renk kaybını önlemek için dH<sub>2</sub>O ile yıkayıp 1 dakika safraninle boyandı ve tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Kurutulan preparatlar mikroskop ile 100x büyütmede immersiyon yağı damlatılarak 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**

Bu test, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen katalaz enzimini (hidrojenperoksit oksidoredüktaz) saptamak amacıyla yapılır ve identifikasyonda kullanılır. Bu enzim ekseri sitokrom ihtiva eden aerobik bakterilerde ve bazı fakültatiflerde bulunur. Bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lam üzerine damlatıldı ve petrilere üreyen kültürlerden 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**

Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidaz enziminin varlığını ortaya koymada kullanılır. Oksidaz reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade eder. Hazırlanan çözültiden 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, herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemesi ise testin negatif olduğunu göstermektedir (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

#### **2.2.5.4. Lesitinaz Testi**

Bu test, yumurta sarısında bulunan lipoprotein komplekslerinin bakteriler

tarafından oluşturulan lesitinaz ve fosfolipaz enzimleri ile hidroliz edebilme durumunu belirlemek için yapılır. MYPG agarda 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve lesitinaz besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı. 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen test besiyerlerindeki koloniler etrafında lesitin hidrolizasyon zonu oluşan açılmalar ve opaklaşmalar pozitif olarak değerlendirildi (Rhodehamel ve Harmon, 1995).

#### **2.2.5.5. Nitrat Redüksiyon Testi**

MYPG agarda 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve nitrat besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı ve 37°C'de her gün üremeleri kontrol edilmek üzere 3-4 gün inkübe edildikten sonra ayıraçları damlatılarak nitratın nitrite, nitritin azot gazına kadar olan indirgenmeleri 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 örneklerle 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 NH<sub>3</sub>, NO ve N<sub>2</sub> gazlarına dönüştürülmüş olduğunu gösterir. Bu durumda bakterilerin nitrat redüksiyon deneyi ise pozitif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

#### **2.2.5.6. Voges-Proskauer Testi (VP)**

Bu test, bazı mikroorganizmaların glukozu fermente ederek, nötral bir ürün olan aseton meydana getirme yeteneğini tayin etmede ve özellikle Enterobacteriaceae familyasındaki bazı bakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılır. Özel ayıraçlarla



ortaya çıkarılan bu ürünü oluşturan bakteriler Voges-Proskauer pozitif olarak kabul edilir. pH 6,8 olarak ayarlanan Voges-Proskauer besiyerine MYPG agarda 37°C’de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınıp MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarlanan kültürlerden 3-5 µL damlatıldı. 37°C’de 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonları tamamlanan kültürlerle Voges-Proskauer ayırıcılarından ilk olarak yaklaşık 0,6 ml A ayırıcı ( $\alpha$ -naftol) ve hemen arkasından 0.2 ml B ayırıcı (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. Jelatin Testi**

Bu test bakterilerin jelatini hidroliz eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. MYPG agarda 37°C’de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve jelatin besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı ve 37°C’de 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. Üreme olan örnekler 1 saat buzdolabında bekletildi. Jelatinin hidroliz edildiği durumlarda buzdolabından çıkarılan örneklerin sıvı halde olduğu ve katılaşmadığı görüldü. Bu durum jelatin testi için pozitif kabul edilirken, jelatinin katılaşması negatif olarak kabul edildi (Nizar vd., 2015).

#### **2.2.5.8. Sitrat Kullanım Testi**

Bu test, mikroorganizmaların besi yerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da azot kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada kullanılır. Organizmalar sitratı hücre içine alan enzim olan permeaz ve parçalayan enzim olan sitrat liyaza sahipse Simmon sitrat agarda alkali bir reaksiyon oluşturur. Besiyerinde bulunan bromtimol mavisi ayırıcının yeşil rengi maviye döner.

MYPG agarda 37°C’de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve sitrat besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı. 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. Dihidroksiaseton Testi**

MYPG agarda 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve dihydroxyaceton besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı. 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyeri üzerinde üreyen bakterilere taze hazırlanmış solüsyon A ve solüsyon B bire bir oranında karıştırılıp üremiş koloniler üzerine ilave edildi. Bir iki dakika içinde kolonilerin renginin sarıdan kırmızı bakır rengine dönüşmesi testin pozitif olarak değerlendirdi (Claus ve Berkeley, 1986).

#### **2.2.5.10. Karbonhidratlardan Asit Üretme Testi**

MYPG agarda 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı. Karbonhidrat sıvı besiyerleri 96 kuyucuklu eliza plakalarına üç tekrarlı 100 µL dağıtıldı ve üzerlerine 3-5 µL kültürden damlatıldı. Plaklar 37°C'de yaklaşık 7 gün inkübe edildi. Plaklardaki besiyerlerinin mor olan renginin sarıya dönmesi bakterinin o karbonhidratı kullanıp asit ürettiklerini gösterir ve sonuç pozitif olarak kaydedilir. Eğer sıvı besiyerinde herhangi bir renk değişimi gözükmezse sonuç negatif olarak kabul edilir (Vallat vd., 2012; de Graaf, 2013).

#### **2.2.5.11. İndol Testi**

MYPG agarda 37°C'de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MYPG sıvı besiyerinde çözülerek McFarland 0,5 olarak ayarladı ve indol besiyerlerine 3-5 µL ekildi. 3-4 gün 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bakterilerin bulundukları triptofanaz enzimleri triptofandan indol oluşturmalarının araştırılması temeline dayanan bir testtir. İnkübe edilen tüplere Kovaks ayırıcından 6-8 damla damlatıldı. Birkaç saniye içerisinde tüpün üst kısmında parlak kırmızı bir halkanın

oluşması pozitif sonuç, sarı halka oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi (Alvarado vd., 2013).

## **2.2.6. İzolatların 16S rRNA Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu**

Örneklerden genomik DNA izolasyonu için, izolatlar MYPG sıvı besiyerinde 37°C’de çalkalayıcıda 3-4 günde üretildi ve her bir izolat Ependorf tüpe aktarılarak aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı (Sambrook, 1989).

Kültürler 13.000 rpm’de 3-4 dakika santrifüj edildi. 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. Tüpler 1 saat 37°C’de 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 13.000 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 13.000 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 13.000 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 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı. Kalan pelletlerin üzerine 500 µL %70’lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletler 37°C’de kurutulduktan sonra 75 µL TE-RNaz içerisinde çözüldü.

### **2.2.6.2. Genomik DNA’ların Agaroz Jelde Yürütülmesi**

Genomik DNA’ların görüntülenebilmesi için 1X TAE tamponu içerisinde etidyum bromür kullanılarak %1’lik agaroz jel hazırlandı. 1 gram agaroz tartılarak üzerine 100

mL 1X TAE tamponu eklendi ve mikrodalga fırınında çözüldü. Jel tankı hazırlandı ve kuyucukların oluşması için jel tarağı takıldı. Agaroz jel çözüldükten sonra 50°C'ye kadar soğutulunca içerisine 0,5 µL etidyum bromür (0,5 µg/mL) ilave edildi ve homojen şekilde çözünmesi sağlandı. Soğuyan agaroz jel, jel kalıbına döküldü ve 15-20 dakika donması için bekletildi. Agaroz jel donduktan 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 izolatın 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. Daha sonra DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### **2.2.6.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Arttırılması**

16S rRNA genleri her bir izolattan elde edilen genomik DNA'lardan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ileri ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') geri primerleri kullanılarak PZR yardımı ile çoğatıldı. Primerler Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasından temin edildi.

PZR reaksiyonu 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, son hacimde 1X Taq DNA polimeraz Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP mix, 0,3 pmol/µl ileri ve geri primerlerden, 1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas) kullanılarak hazırlanmıştır. PZR döngüsü ise ilk denetürasyon basamağı 94°C'de 3 dk., daha sonra 35 döngü denatürasyonda 94°C'de 45 sn., primer bağlanma sıcaklığında 45 sn, uzama basamağında 72°C'de 2.5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Son uzama basamağı ise 72°C'de 7 dk. olarak ayarlanmış ve PZR ürünleri 4°C'de korunmuştur.

PZR ürünlerinin etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde UV ışığı altında görüntülenmiştir. Elde edilen PZR ürünleri sekans için Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasına gönderilmiştir.

#### 2.2.6.4. 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 verilerin *Paenibacillus*'lar için 1444 bp'lik kısmı, *Bacillus*'lar için 1346 bp'lik kısmı, Gram pozitif koklar için 1400 bp'lik kısmı 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 1.000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

#### 2.2.7. Antibiyogram Testi

Çalışmada izole edilen sporlu basillerin antibiyotik duyarlılıkları agar disk diffüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (EUCAST, 2016). Çalışmada hayvan (arı) hastalıklarında kullanılabilirliği var sayılan (arılar için kullanımı yasak) 7 adet ve Gram pozitif bakteri paneli için seçilmiş 12 adet olmak üzere toplamda 19 adet antibiyotik diski kullanılmıştır (Tablo 3). Bu antibiyotiklerden 19 tanesi *Paenibacillus larvae* suşlarında, 12 tanesi ise diğer tüm suşlar üzerinde test edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite testleri MYPGP agar besiyerinde 3-4 gecelik kültürlerden yapılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir izolatdan, MYPG sıvı besiyeri içerisinde bulanıklık değeri 0,5 McFarland olacak şekilde sulandırılmaları hazırlandı. Steril MYPG agar besiyeri 12 cm çaplı plastik petrilere 4 mm kalınlığında dökülerek donduruldu. Steril bir eküvyon çubuğu yardımı ile bulanıklılığı ayarlanmış kültürlerin MYPGP agar besiyeri yüzeylerine yayma ekimleri yapıldı. +4°C'de saklanmakta olan antibiyotik diskleri alınarak agar yüzeyine temas edecek şekilde ve disk aralarında en az 24 mm boşluk olacak şekilde yerleştirildi. Petriler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> varlığında 3-4 gece mumlu kavanozda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilme yapıldı. Ölçülen zon çapları EUCAST

(2016) kitapçığındaki ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak, bakteri test edilen antibiyotige karşı "duyarlı" veya "dirençli" olarak değerlendirildi.

**Tablo 3.** Test edilen antibiyotiklerin isimleri, kısaltmaları, doz içerikleri, dahil oldukları antibiyotik grupları ve etkinlik zon çapları (EUCAST 2016).

Grubu	Antibiyotik Adı ve Kısaltması	Doz İçeriği	Dirençli	Orta	Duyarlı
Aminoglikozit	Gentamisin (CN)	10	≤12	13-14	≥15
	Streptomisin (S)	300	≤11	12-14	≥15
	Amikasin (AK)	30	≤14	15-16	≥17
Makrolid	Eritromisin (E)	15	≤13	14-22	≥23
	Tylosin (TY)	15	≤13	14-19	>20
Tetrasiklin	Tetrasiklin (TE)	30	≤14	15-18	≥19
	Oksitetrasiklin (T)	30	≤14	15-18	≥19
	Kloramfenikol (C)	30	≤12	13-17	≥18
Linkosamid	Linkomisin (L)	2	≤10	11-17	≥18
Penisilinler	Penisilin (P)	10	≤14	-	≥15
	Ampilisin (AMP)	10	≤16	-	≥17
Florokinolon	Siprofloksasin (CİP)	5	≤15	16-20	≥21
	Norfloksasin (NOR)	10	≤12	13-16	≥17
3.Kuşak Sefolosporin	Ceftazidim (CAZ)	10	≤14	15-17	≥18
2.Kuşak Sefolosporin	Sefuroksim (CXM)	30	≤14	15-17	≥18
1.Kuşak Sefolosporin	Seftazolin (KZ)	5	≤14	15-17	≥18
B-laktam inhibitör kombinasyonu	Amoksisilin klavunat (AMC)	20/10	≤19	-	≥20
	Trimetoprim-Sulfametoksazol (SXT)	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
Nitrofuran grubu	Furazolidon (FX)	10	≤10	11-16	≥17

### 2.2.8. *P. larvae* İzolatlarının Genetik Çeşitliliği

Çalışmada izole edilen *P. larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği repetitive element PZR (rep-PZR) tekniği ile BOXA1 (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') ve MBO REP1 (5'-CCGCCGTTGCCGCGTTGCCGCCG-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PZR reaksiyonları 25 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, son hacimde 1X Taq DNA polimeraz Buffer, 2.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTPmix, 0,3 pmol/µl primer,

1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas) kullanılarak hazırlanmıştır. PZR döngüsü ise ilk denetürasyon basamağı 94°C’de 15 dk., daha sonra 35 döngü denetürasyonda 94°C’de 1 dk., 53°C’de 1 dk., uzama basamağında 72°C’de 2.5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Son uzama basamağı ise 72°C’de 7 dk. olarak ayarlanmış ve PZR ürünleri 4°C’de korunmuştur.

PZR ürünlerinin etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jelde UV ışığı altında görüntülenmiştir. Çoğaltılan ürünlerin genetik çeşitliliği Geneserch ve Otten (2003) ve Peters vd., (2006) tarafından belirlenen isimlendirme sistemlerine göre değerlendirilmiştir.

### **2.2.9. *P. larvae* İzolatlarının Plazmit DNA İzolasyonları**

İzolatlar MYPG sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyona tabii tutulmuş ve ertesi gün hücreler santrifüj yardımı ile toplanmıştır. İzolatların plazmit DNA’ları QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) kullanılarak ve kit prosedürü uygulanarak elde edilmiştir.

### **2.2.10. *P. larvae* İzolatlarında Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi**

Tetrasiklin ve oksitetrasiklin direncine sahip olan *P. larvae* izolatları Gram pozitif bakterilerde sıklıkla görülen dört farklı tetrasiklin geni ve 2 farklı oksitetrasiklin geni varlığı açısından değerlendirildi. Çalışmada kullanılan tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnç geni primerleri Tablo 4’de verilmiştir.

Tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnç genlerinin tespiti için yapılan PZR reaksiyonu 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. *tet(M)* ve *tet(W)* genleri multipleks PZR, diğer genler ise klasik PZR yöntemi ile tespit edildi. PZR reaksiyonları 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, son hacimde 1X Taq DNA polimeraz Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTPmix, 0,3 pmol/µl her bir ileri ve geri primer, 1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas) kullanılarak hazırlanmıştır. PZR döngüsü ise ilk denetürasyon basamağı 94°C’de 3 dk., daha sonra 35 döngü denetürasyonda 94°C’de 45 sn., primer bağlanma sıcaklığında 45 sn., uzama basamağında 72°C’de 1 dk olacak şekilde

ayarlanmıştır. Son uzama basamağı ise 72°C’de 5 dk. olarak ayarlanmış ve PZR ürünleri 4°C’de korunmuştur. PZR ürünlerinin etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jelde UV ışığı altında görüntülenmiştir.

**Tablo 4.** Tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnç genlerini çoğaltmak için kullanılan primerler.

<b>Gen</b>	<b>Primerler</b>	<b>Sekans(5’-3’)</b>	<b>bp</b>	<b>Kaynak</b>
<i>tet(K)</i>	TetK Fwd	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	718	You vd., 2012
	TetK Rev	GCAAACCTCATTCCAGAAGCA		
<i>tet(L)</i>	TetL Fwd	GTTGCGCGCTATATTCCAAA	788	You vd., 2012
	TetL Rev	TTAAGCAAACCTCATTCCAGC		
<i>tet(M)</i>	TetM Fwd	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	Malhotra-Kumar vd., 2005
	TetM Rev	CGGTAAAGTTCGTACACAC		
<i>tet(W)</i>	TetW Fwd	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	Masco vd., 2006
	TetW Rev	GGGCGTATCCACAATGTAAAC		
<i>OtrA</i>	OtrA Fwd	GAACACGTACTIONGACCGAGAAG	778	Nikolakopoulou vd., 2005
	OtrA Rev	CAGAAGTAGTTGTGCGTCCG		
<i>OtrB</i>	OtrB Fwd	CCGACATCTACGGGCGCAAGC	947	Nikolakopoulou vd., 2005
	OtrB Rev	GGTGATGACGGTCTGGGACAG		



### 3. BULGULAR

Bu çalışma, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı destekleriyle, RTEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Amerikan Yavru Çürüklüğü şüpheli arı ve ürünleri Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma boyunca AYÇ hastalığı şüpheli 28 larva örneği, 26 ergin arı örneği, 9 bal örneği ve 1 temel petek örneği olmak üzere toplamda 64 örnek kullanıldı. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden gelen ilk örnekler "PB" (*Paenibacillus*) şeklinde, daha sonraki örnekler ise "SV" şeklinde kodlanarak numune geliş sırasına göre rakamla, izolat sırasına göre alfabetik harflerle numaralandırıldı (Tablo 5).

Örneklerin kültürleri sonucunda 64 örnekten 35'inde sporlu basil ve kok izole edilirken, 29 örnekten herhangi bir mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilemedi. Üremenin gerçekleştiği 35 örnekten toplam 58 Gram pozitif hızlı ve yavaş spor oluşturan basiller ile 5 Gram pozitif kok izole edildi ve toplamda 63 gram pozitif bakteri çalışma kapsamına alındı (Tablo 5).

**Tablo 5.** AYÇ şüpheli örneklerin numaraları, alındıkları yerler, örnek orijinleri ve elde edilen izolat numaraları.

No	Alındığı Bölge	Örnek Türü	İzolat No
1	Rize	Larva	PB11
2	Rize	Larva	PB12b
3	Gümüşhane	Larva	PB13.1b, PB13.2
4	Rize	Larva	PB14a, PB14b, PB14c
5	Rize	Bal	-
6	Rize	Larva	PB16.1b, PB16.2
7	Rize	Larva	PB17
8	Rize	Larva	PB18a
9	Rize	Larva	PB19a, PB19b
10	Rize	Larva	PB20
11	Rize	Larva	-
12	Rize	Bal	PB22b1, PB22d, PB22e, PB22f
13	Rize	Bal	PB23a, PB23b, PB23c
14	Samsun	Larva	PB24a, PB24b
15	Samsun	Larva	PB25b, PB25c
16	Samsun	Bal	PB26a, PB26b, PB26c, PB26d, PB26e
17	Samsun	Larva	PB27b
18	Samsun	Larva	PB28a, PB28b, PB28c, PB28e
19	Samsun	Larva	-

**Tablo 5 (devam).** AYÇ şüpheli örneklerin numaraları, alındıkları yerler, örnek orijinleri ve elde edilen izolat numaraları.

No	Alındığı Bölge	Örnek Türü	İzolat No
20	Samsun	Larva	PB30a, PB30b
21	Samsun	Larva	PB31a, PB31b, PB31c, PB31d, PB31e
22	Rize	Larva	PB32a, PB32b
23	Rize	Bal	PB33
24	Bayburt	Larva	PB34
25	Bayburt	Bal	PB35
26	Rize	Bal	PB36b
27	Rize	Bal	-
28	Samsun	Arı	-
29	Sinop	Arı	SV2
30	Amasya	Arı	-
31	Rize	Arı	-
32	Samsun	Arı	-
33	Giresun	Arı	-
34	Sinop	Arı	-
35	Tokat	Arı	SV8a, SV8b
36	Tokat	Arı	SV9a, SV9b
37	Trabzon	Arı	-
38	Amasya	Arı	SV11a
39	Sinop	Arı	-
40	Trabzon	Arı	-
41	Ordu	Arı	-
42	Ordu	Arı	-
43	Samsun	Arı	-
44	Amasya	Arı	-
45	Giresun	Arı	-
46	Trabzon	Arı	SV19
47	Sinop	Arı	-
48	Giresun	Arı	SV21
49	Rize	Arı	-
50	Rize	Arı	-
51	Samsun	Arı	SV24a, SV24b
52	Tokat	Arı	-
53	Ordu	Arı	-
54	2015-147	Larva	SV27b, SV27c
55	2015-146	Larva	SV28
56	2014-738	Larva	-
57	Samsun	Larva	SV30b
58	2014-548	Larva	-
59	Tokat	Larva	-
60	Samsun	Larva	-
61	2015-6	Larva	-
62	Tokat	Temel Petek	SV35
63	Rize	Bal	-
64	Samsun	Larva	SV37

### 3.1. İzolatların Morfolojik ve Fiziksel Özellikleri

Kültür sonucunda üreyen bakteri kolonileri makroskobik (koloni rengi, tipi ve büyüklüğü) ve mikroskobik (Gram özelliği, bakteri morfolojisi, spor içeriği ve konumu) olarak incelendi.

İnceleme sonucunda izolatların tümünün Gram pozitif bakteri oldukları, büyük bir kısmının krem veya şeffaf, daha azının beyaz (5 tanesi) ve turuncu (9 tanesi) renklere sahip koloniler oldukları belirlendi. Aynı zamanda izolatlar 35'inin R-tipi (Rought), 17'sinin S-tipi (Smooth) ve 9'unun M-tipi (Mukoid) koloni morfolojisine sahip oldukları tespit edildi. İzolatların büyük bir çoğunluğu basil morfolojisine sahipken (59 izolat), bazılarının (PB25c, PB30b, SV19, SV24a, SV27c) ise kok morfolojisine sahip oldukları tespit edildi (Tablo 6).



**Tablo 6.** Çalışmada izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (N:64).

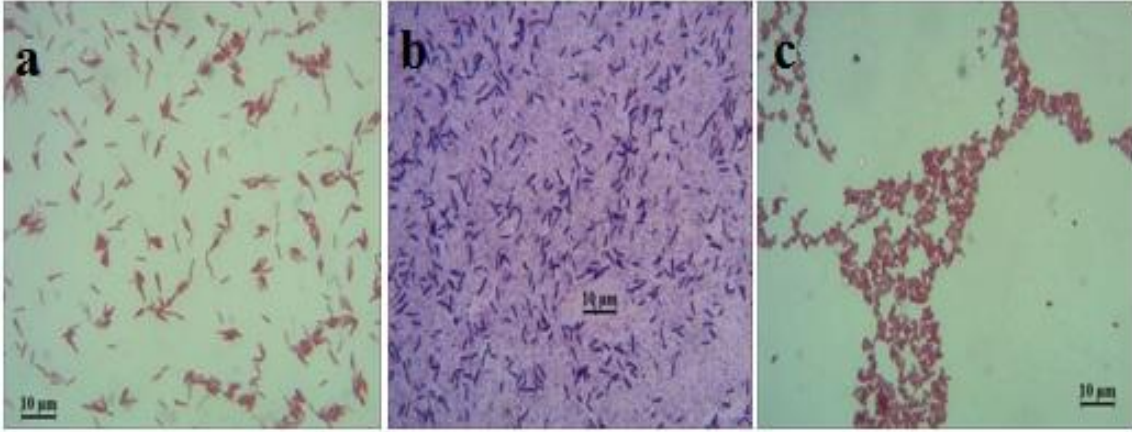
İzolat No	Morfolojik Özellikler					Biyokimyasal Özellikler														
	Gram Özelliği	Hücre Şekli	Koloni Tipi	Koloni Rengi	Spor Konumu	O	Ka	St	L	Ü	İ	J	V	D	N	Gl	Ma	La	Tr	Ks
PB11	+	Basil	S	K	Terminal	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
PB12b	+	Basil	S	T	Santral	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
PB13.1b	+	Basil	S	K	Subterminal	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
PB13.2	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB14a	+	Basil	S	Ş	Terminal	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
PB14b	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
PB14c	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PB16.1b	+	Basil	R	Ş	Terminal	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
PB16.2	+	Basil	S	K	Subterminal	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
PB17	+	Basil	R	K	Subterminal	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
PB18a	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB19a	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
PB19b	+	Basil	M	Ş	Subterminal	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
PB20	+	Basil	S	T	Terminal	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
PB22b1	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PB22d	+	Basil	R	K	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
PB22e	+	Basil	S	K	Subterminal	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
PB22f	+	Basil	M	K	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
PB23a	+	Basil	R	K	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
PB23b	+	Basil	R	T	Subterminal	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
PB23c	+	Basil	S	Ş	Subterminal	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PB24a	+	Basil	S	T	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
PB24b	+	Basil	R	Ş	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
PB25b	+	Basil	R	Ş	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
PB25c	+	Kok	S	B	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
PB26a	+	Basil	S	T	Subterminal	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
PB26b	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PB26c	+	Basil	R	Ş	Santral	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
PB26d	+	Basil	S	K	Subterminal	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
PB26e	+	Basil	S	K	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
PB27b	+	Basil	R	Ş	Terminal	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
PB28a	+	Basil	R	Ş	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

**Tablo 6 (devam).** Çalışmada izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (N:64).

İzolat No	Gram Özelliği	Hücre Şekli	Koloni Tipi	Koloni Rengi	Spor Konumu	O	Ka	St	L	Ü	İ	J	V	D	N	Gl	Ma	La	Tr	Ks
PB28c	+	Basil	R	K	Subterminal	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
PB28e	+	Basil	R	K	Terminal	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
PB30a	+	Basil	R	T	Subterminal	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PB30b	+	Kok	S	B	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
PB31a	+	Basil	S	T	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
PB31b	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
PB31c	+	Basil	R	Ş	Subterminal	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
PB31d	+	Basil	R	Ş	Subterminal	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
PB31e	+	Basil	M	K	Subterminal	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
PB32a	+	Basil	S	T	Terminal	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
PB32b	+	Basil	R	Ş	Terminal	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
PB33	+	Basil	R	K	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
PB34	+	Basil	R	K	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
PB35	+	Basil	R	K	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
PB36b	+	Basil	M	K	Subterminal	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
SV2	+	Basil	M	K	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
SV8a	+	Basil	R	Ş	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
SV8b	+	Basil	R	K	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
SV9a	+	Basil	S	K	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SV9b	+	Basil	R	Ş	Subterminal	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SV11a	+	Basil	R	K	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
SV19	+	Kok	R	K	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SV21	+	Basil	R	K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SV24a	+	Kok	S	K	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
SV24b	+	Basil	R	K	Santral	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
SV27b	+	Basil	R	K	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
SV27c	+	Kok	R	K	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
SV28	+	Basil	R	K	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
SV30b	+	Basil	R	Ş	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SV35	+	Basil	R	Ş	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
SV37	+	Basil	S	K	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-

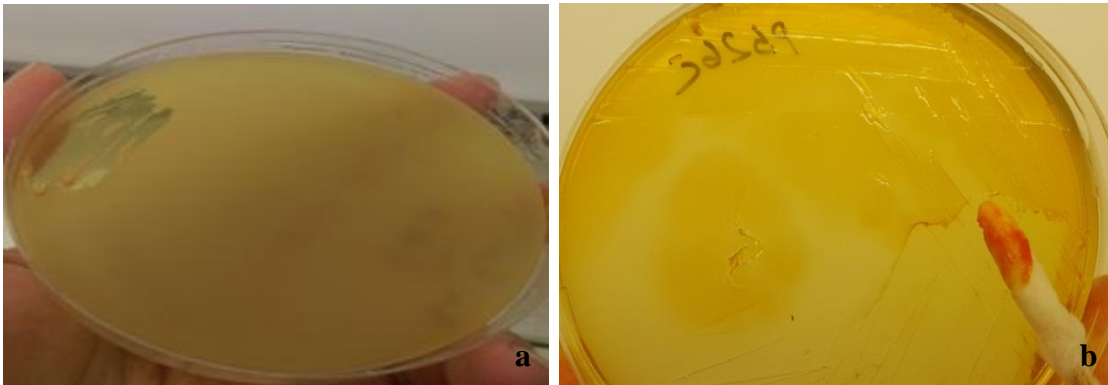
S: S-tipi, M: M-tipi, R: R-tipi, K: Krem, T: Turuncu, Ş: Şeffaf, B: Beyaz, O: Oksidaz, Ka: Katalaz, St: Sitrat, L: Lesitinaz, Ü: Üreaz, İ: İndol, J: Jelatinaz, V: Voges-Proskauer, D: Dihidroksiaseton, N: Nitrat, Gl: Glukoz, Ma: Maltoz, La:Laktoz, Tr: Trehaloz, Ks: Ksiloz, +:Pozitif, -: Negatif.

Çalışmada Gram pozitif basil morfolojisine sahip 59 bakterinin 34'ünün 3-4 günlük kültürlerinde spor oluşturabildikleri tespit edilirken, 25'inde spor gözlenmediği belirlendi. İzolatların 5'nin kok morfolojisine sahip oldukları belirlendi. İzolatlarda hücrenin bir ucunda (terminal), ortaya yakın (subterminal) veya merkezi (santral) şekilde konumlanmış sporlar bulunduğu ve büyük çoğunluğunda subterminal konumlu olduğu gözlemlendi (Şekil 10).



**Şekil 10 (a-b-c).** İzolatların spor ve vejetatif hücre görünüşleri (100X büyütme). a) Terminal sporlar (PB32a), b) Subterminal sporlar (PB13.1b) c) Sporsuz koklar (PB25c).

Çalışmada *Paenibacillus cinsi* olarak tanımlanan izolatların bazıları hızlı üreme ve hareket yeteneğinde olup, tüm petri yüzeyinde yayılma şeklinde üreme özelliği gösterirken, bazı izolatları (9 adet) ise turuncu renkte üreme özelliğine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 11).



**Şekil 11(a-b).** *P. larvae* izolatların petrideki koloni morfolojisi görünüşleri. a) MYPGP agarda krem renkli petriye yayılan koloniler. b) MYPGP agarda turuncu renkte koloniler.

### 3.2. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde bir dizi biyokimyasal testler kullanıldı. Test edilen 64 izolatın 30'unun (%47) oksidaz ve katalaz testleri bakımından pozitif olduğu belirlendi. İzolatların 21'sinin (%33) sitrat kullanımı, 12'sinin (%19) indol, 32'sinin (%50) jelatin hidrolizi, 31'inin (%48) Voges-Proskauer, 29'unun (%45) Dihidroksi aseton üretimi ve 24'ünün (%37) nitrat kullanım testlerinin pozitif olduğu belirlendi. Bunun yanısıra izolatların 17'sinin (%26) lesitinaz ve 18'inin (%29) üreaz testleri bakımından pozitif olduğu tespit edildi (Tablo 6).

Çalışmada izolatların bir dizi karbonhidratları (glukoz, maltoz, laktoz, trehaloz, ksiloz) fermente edebilme özellikleri araştırıldı (Tablo 6). Yapılan fermentasyon deneyleri sonucunda izolatların 53'ünün (%83) glukozu fermente edebilirken, 33'unun (%52) maltozu, 20'sinin (%31) laktozu, 36'sının (%56) trehalozu ve 9'unun (%14) ksilozu fermente edebildikleri gözlemlendi.

### 3.3. İzolatların Moleküler Tanımlanması

Çalışmada kullanılan 64 izolatın tür düzeyinde tanımlanması 16S rRNA gen bölgesinin sekans sonuçlarının işlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesi PZR'ı sonucunda yaklaşık 1600 bp PZR ürünleri elde edildi.

Elde edilen PZR ürünleri dizi analizi için MACROGEN firmasına gönderildi. Gelen diziler Bioedit programı ile işlendi ve dizilerin NCBI GenBank sitesinde var olan diziler ile benzerliği karşılaştırıldı.

#### 3.3.1. *Paenibacillus* izolatlarının Moleküler Tanımlanması

Gen dizileri elde edilen 64 izolatın 35'inin NCBI GenBank'ta var olan diziler ile yüzde benzerliği karşılaştırıldığı zaman *Paenibacillus* cinsine benzer olduğu tespit edildi (Tablo 7).

**Tablo 7.** *Paenibacillus* izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri (N:35).

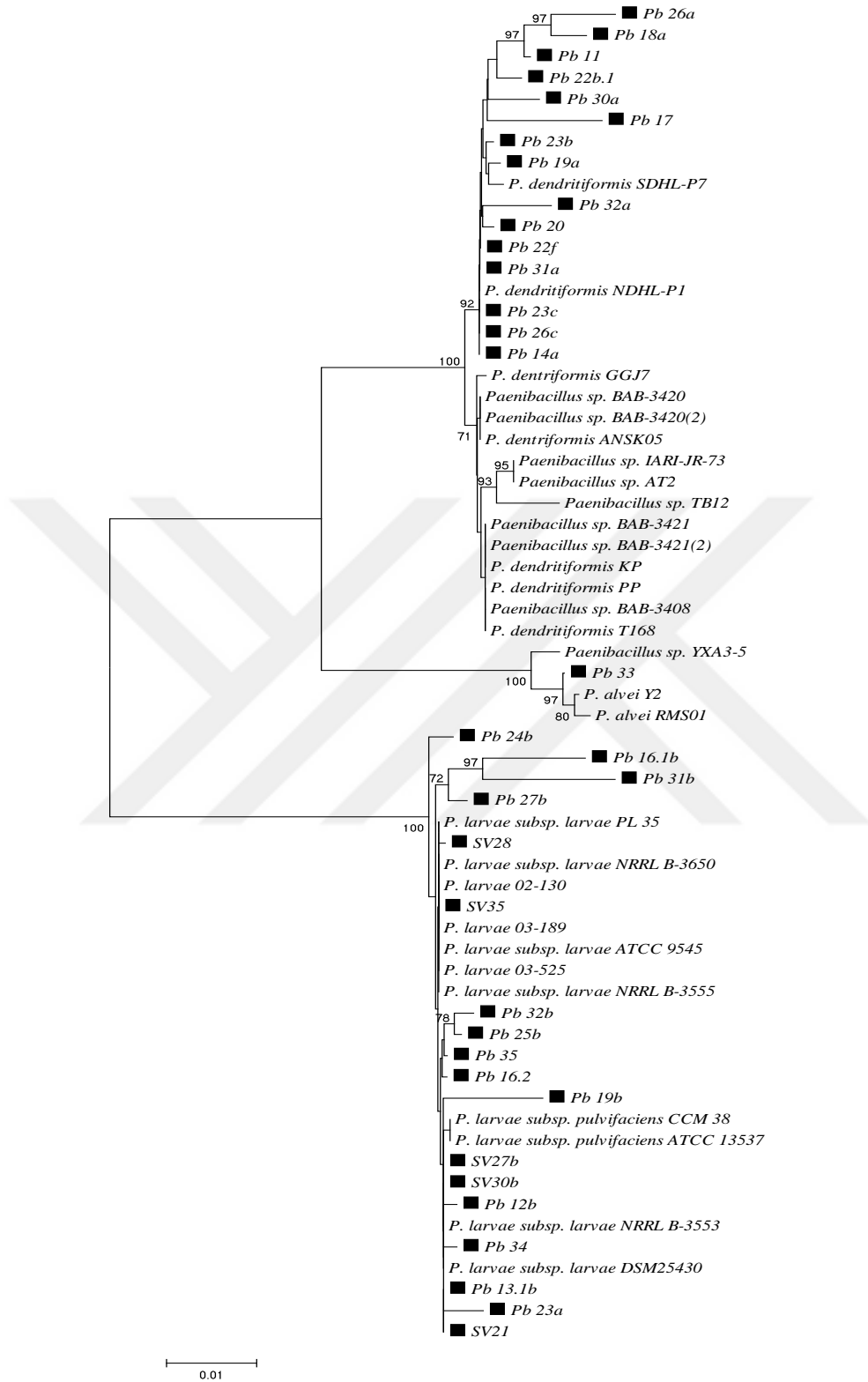
İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB11, PB22f	<i>P. dentriiformis</i> PP	KX082752	98	99
	<i>P. dentriiformis</i> KP	KX083535	98	99
	<i>P. dentriiformis</i> T168	NR042861	98	99
PB12b, PB23a	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> NRRL B-3555	KT363739	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> ATCC 9545	KT363737	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> NRRL B-3650	KT363738	99	99
PB13.1b, PB16.2	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> ATCC 13537	CP019794	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM 25430	CP003355	99	99
PB13.2	<i>Paenibacillus</i> sp. IARI-JR-73	KF055015	100	87
	<i>Paenibacillus</i> sp. AT2	HQ330529	100	87
	<i>Paenibacillus</i> sp. TB12	FS821654	100	87
PB14a	<i>P. dentriiformis</i> GGJ7	KY655213	99	99
	<i>P. dentriiformis</i> ANSK05	KT152690	99	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151	99	99
PB16.1b	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> NRRL B-3555	KT363739	100	97
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	100	97
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> ATCC 13537	CP019794	100	97
PB17, PB18a	<i>P. dentriiformis</i> ANSK05	KT152690	100	98
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151	100	98
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3420	KF917150	100	98
PB19a, PB20, PB22b1, PB23c, PB26c, PB30a, PB31a,	<i>P. dentriiformis</i> ANSK05	KT152690	99	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151	99	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3420	KF917150	99	99
PB19b	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	99	98
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> ATCC 13537	CP019794	98	98
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM 25430	CP003355	98	98
PB23b, PB26a, PB32a	<i>P. dentriiformis</i> ANSK05	KT152690	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3421	KF917151	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-3420	KF917150	100	99
PB24b, PB34, SV27b	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> ATCC 13537	CP019794	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> NRRL B-3555	KT363739	99	99
PB25b, PB27b, SV28	<i>P. larvae</i> 02-130	DQ079622	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> ATCC 9545	KT363737	99	99
	<i>P. larvae</i> 03-189	DQ079623	99	99



**Tablo 7 (devam).** *Paenibacillus* izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri (N:35).

İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB31b	<i>P. larvae</i> 02-130	DQ079622	100	97
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	100	97
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> ATCC 9545	KT363737	100	97
PB32b, SV35	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> PL-35	KT363742	98	99
	<i>P. larvae</i> 02-130	DQ079622	98	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> ATCC 9545	KT363737	98	99
PB33	<i>P. alvei</i> Y2	KX266960	100	99
	<i>Paenibacillus</i> sp. YXA3-5	JF701948	100	99
	<i>P. alvei</i> RMS01	JX437031	99	99
PB35, SV30b	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> NRRL B-3553	KT363740	99	99
	<i>P. larvae</i> 02-130	DQ079622	98	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> ATCC 9545	KT363737	98	99
SV21	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> CCM 38	CP020327	99	99
	<i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvifaciens</i> ATCC 13537	CP019794	99	99
	<i>P. larvae</i> 02-130	DQ079622	99	99

Amerikan yavru çürüklüğü şüphesi olan örneklerden izole edilen 35 *Paenibacillus* cinsi bakteriyal izolatların yakın ilişkili olduğu bakteriler ile filogenetik benzerlikleri belirlendi. Elde edilen dendograma göre PB33 nolu bakteriyal izolatın en fazla *Paenibacillus alvei* suşları ile benzerlik gösterdiği, PB12b, PB13.1b, PB16.1b, PB16.2, PB19b, PB23a, PB24b, PB25b, PB27b, PB31b, PB32b, PB34, PB35, SV21, SV27b, SV28, SV30b ve SV35 nolu bakteriyal izolatların en fazla *Paenibacillus larvae* suşları ile benzerlik gösterdiği ve PB11, PB14a, PB17, PB18a, PB19a, PB20, PB22b.1, PB22f, PB23b, PB23c, PB26a, PB26c, PB30a, PB31a ve PB32a nolu izolatların ise en fazla *Paenibacillus dentriiformis* suşları ile benzerlik gösterdikleri tespit edildi (Şekil 12).



**Şekil 12.** *Paenibacillus* izolatların filogenetik ağacı. (Dendrogram MEGA 5.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır. Nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir. Şeklin altındaki skala ise benzerlik derecesini göstermektedir.)

Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarına göre *Paenibacillus* cinsine ait izolatların tür düzeyindeki tayin sonuçları Tablo 8’de verilmiştir.

**Tablo 8.** *Paenibacillus* cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları (N:35).

Tür	İzolat	Sayı (N)	Yüzde (%)
<i>P. alvei</i>	PB33	1	3
<i>P. larvae</i>	PB12b, PB13.1b, PB16.1b, PB16.2, PB19b, PB23a, PB24b, PB25b, PB27b, PB31b, PB32b, PB34, PB35, SV21, SV27b, SV28, SV30b, SV35	18	51
<i>P. dentriiformis</i>	PB11, PB14a, PB17, PB18a, PB19a, PB20, PB22b.1, PB22f, PB23b, PB23c, PB26a, PB26c, PB30a, PB31a, PB32a	16	46

### 3.3.2. *Bacillus* izolatlarının Moleküler Tanımlanması

Gen dizilerini elde ettiğimiz 64 izolatın 24’ünün NCBI GenBank’ta var olan diziler ile yüzde benzerliği karşılaştırıldığı zaman *Bacillus* cinsine benzer olduğu tespit edildi (Tablo 9).

**Tablo 9.** *Bacillus* izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri (N:24).

İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB14b	<i>Bacillus pumilus</i> AB12	JX188071	99	99
	<i>Bacillus pumilus</i> YPB 10-2	JQ308586	99	99
PB14c	<i>Bacillus altitudinis</i> XJGEB-71	JQ320096	99	99
	<i>Bacillus pumilus</i> IP10	KY621526	99	99
PB22d	<i>Bacillus subtilis</i> P18	KY621529	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> LXA7	GQ861467	99	99
PB22e	<i>Bacillus subtilis</i> RSA5	JQ887981	99	98
	<i>Bacillus</i> sp. JDMARC31	KX817890	99	98
PB24a	<i>Bacillus subtilis</i> CS10	KR780366	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> XGL205	JQ062993	99	99
PB26b	<i>Bacillus pumilis</i> HNS64	KF933661	99	99
	<i>Bacillus pumilis</i> ESR21	KC915229	99	99
PB26d	<i>Bacillus altitudinis</i> XJGEB-71	JQ320096	99	99
	<i>Bacillus stratosphericus</i> R6	KY928107	99	99

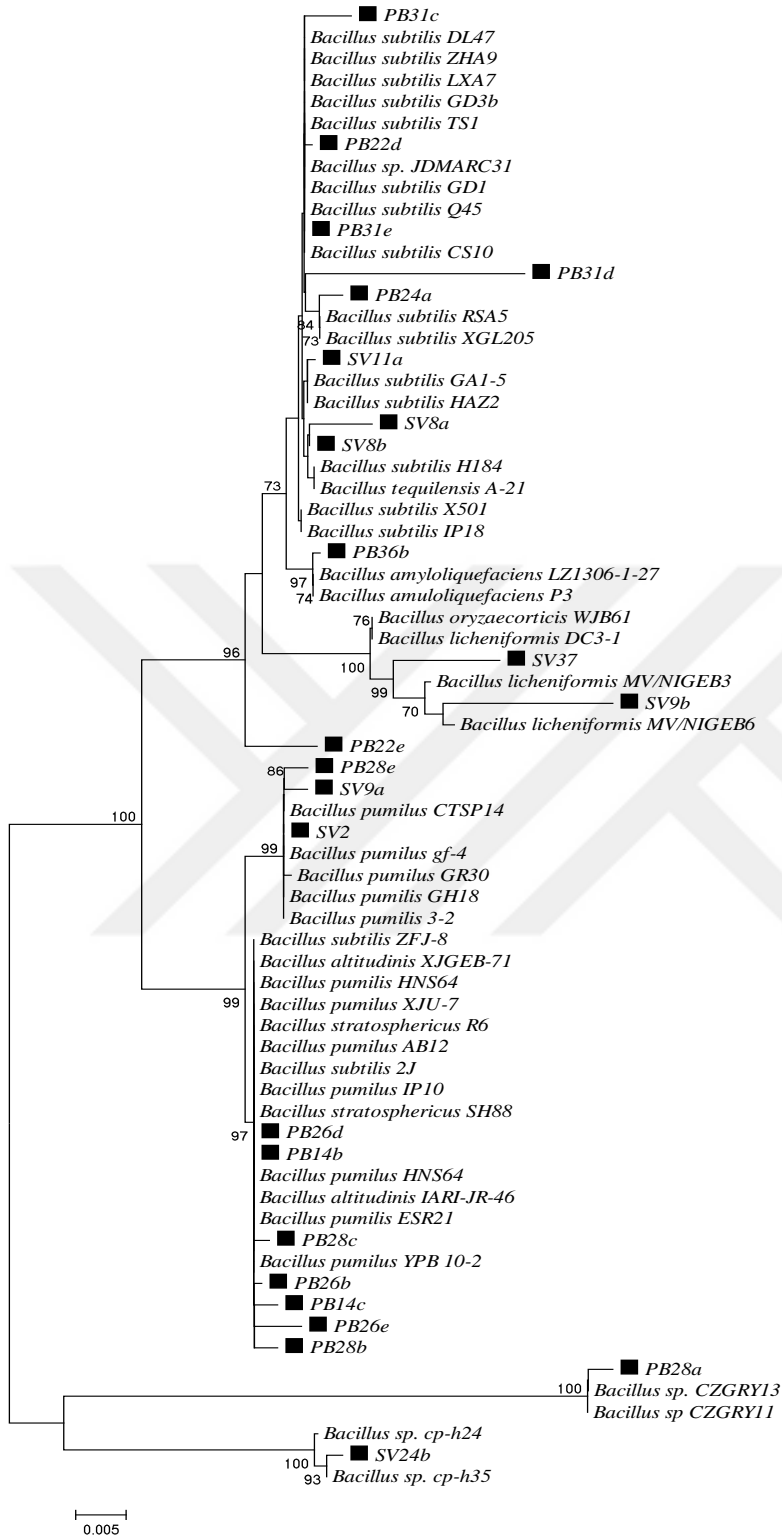
**Tablo 9 (devam).** *Bacillus* izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri (N:24).

İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB26e	<i>Bacillus subtilis</i> 2J	KP616166	100	99
	<i>Bacillus subtilis</i> ZFJ-8	EU931563	100	99
PB28a	<i>Bacillus</i> sp. CZGRY11	KJ184903	99	99
	<i>Bacillus</i> sp. CZGRY13	KJ184909	99	99
PB28b	<i>Bacillus stratosphericus</i> SH88	KC172037	99	99
	<i>Bacillus pumilus</i> HNS64	KF933661	99	99
PB28c	<i>Bacillus pumilus</i> XJU-7	EF672042	99	99
	<i>Bacillus altitudinis</i> IARI-JR-46	KF054998	99	99
PB28e	<i>Bacillus pumilis</i> CTSP14	EU855196	99	99
	<i>Bacillus pumilis</i> GH18	AB301018	99	99
PB31c	<i>Bacillus subtilis</i> TS1	JX944821	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> GD1	HM055597	99	99
PB31d	<i>Bacillus subtilis</i> GD3b	HM055602	100	97
	<i>Bacillus subtilis</i> ZHA9	FJ263018	100	97
PB31e	<i>Bacillus subtilis</i> DL47	KJ496376	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> XGL205	JQ062993	99	99
PB36b	<i>B. amyloquifaciens</i> P3	KY697808	99	99
	<i>B. amyloquifaciens</i> LZ1306-1-27	KT597523	99	99
SV2	<i>Bacillus pumilus</i> 3-2	EU594558	99	99
	<i>Bacillus pumilus</i> gf-4	EU239356	99	99
SV8a	<i>Bacillus subtilis</i> H184	JX515570	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> X501	KU240495	99	99
SV8b	<i>Bacillus subtilis</i> Q45	JX515568	99	99
	<i>Bacillus tequilensis</i> A-21	HQ232423	99	99
SV9a	<i>Bacillus pumilus</i> 3-2	EU594558	99	99
	<i>Bacillus pumilus</i> GR30	KC771045	99	99
SV9b	<i>Bacillus licheniformis</i> MV/NIGEB6	LT669761	99	98
	<i>Bacillus licheniformis</i> MV/NIGEB3	LT669758	99	98
SV11a	<i>Bacillus subtilis</i> HAZ2	AY162127	99	99
	<i>Bacillus subtilis</i> GA1-5	AY162126	99	99
SV24b	<i>Bacillus</i> sp. cp-h35	EU584539	99	99
	<i>Bacillus</i> sp. cp-h24	EU584537	99	99
SV37	<i>Bacillus licheniformis</i> DC3-1	EU257697	99	99
	<i>Bacillus oryzaecorticis</i> WJB61	KU877642	99	99

Amerikan yavru çürüklüğü şüphesi olan örneklerden izole edilen 24 *Bacillus* cinsi bakteriyal izolatların yakın ilişkili olduğu bakteriler ile filogenetik benzerlikleri

belirlenmiştir. Elde edilen dendograma göre PB36b nolu bakteriyal izolatın en fazla *Bacillus amyloliquefaciens* suşları ile bezerlik gösterdiği, SV9b ve SV37 nolu bakteriyal izolatların en fazla *Bacillus licheniformis* suşları ile benzerlik gösterdiği, PB28e, SV2 ve SV9a nolu izolatların ise en fazla *Bacillus pumilus* suşları ile benzerlik gösterdikleri, PB22d, PB24a, PB31c, PB 31d, PB31e, SV8a, SV8b ve SV11a nolu bakteriyal izolatların en fazla *Bacillus subtilis* suşları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda PB14b, PB14c, PB22e, PB26b, PB26d, PB26e, PB28a, PB28b, PB28c ve SV24b nolu bakteriyal izolatların ise tür düzeyinde tanımlanması yapılamamıştır (Şekil 13).





**Şekil 13.** *Bacillus* izolatların filogenetik ağacı. (Dendogram MEGA 5.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır. Nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir. Şeklin altındaki skala ise benzerlik derecesini göstermektedir.)

Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarına göre *Bacillus* cinsine ait izolatların tür düzeyindeki tayin sonuçları Tablo 10’da verilmiştir.

**Tablo 10.** *Bacillus* cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları (N:24).

Tür	İzolat	Sayı (N)	Yüzde (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PB36b	1	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	SV9b, SV37	2	8
<i>Bacillus pumilus</i>	PB28e, SV2, SV9a	3	13
<i>Bacillus subtilis</i>	PB22d, PB24a, PB31c, Pb31d, PB31e, SV8a, SV8b, SV11a	8	33
<i>Bacillus sp.</i>	Pb14b, PB14c, PB22e, Pb26b, PB26d, PB26e, PB28a, PB28b, PB28c, SV24b	10	42

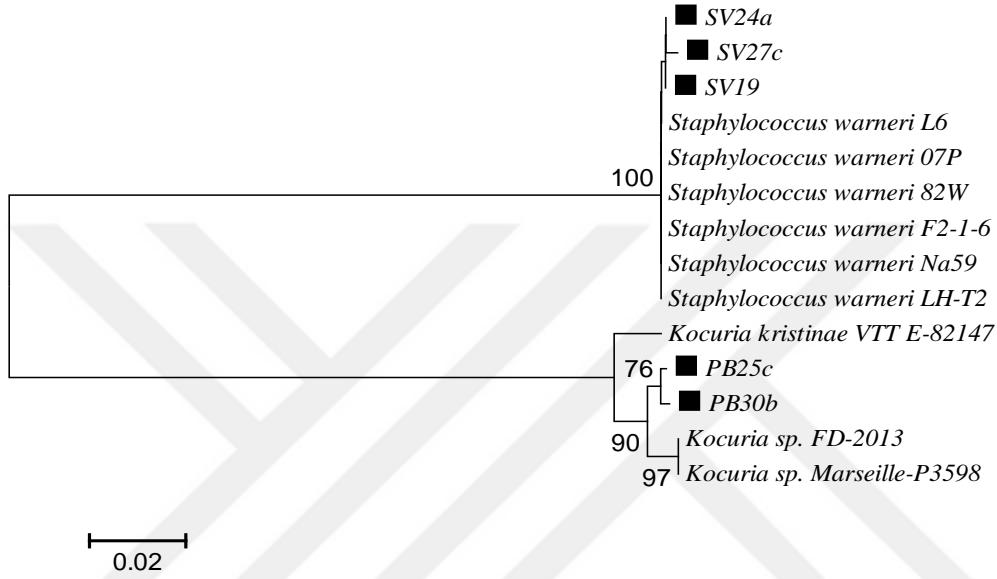
### 3.3.3. Gram-Pozitif Kokların Moleküler Tanımlanması

Gen dizilerini elde ettiğimiz 64 izolatın 5’inin NCBI GenBank’ta var olan diziler ile yüzde benzerliği karşılaştırıldığı zaman Gram-pozitif koklar ile benzer olduğu tespit edildi (Tablo 11).

**Tablo 11.** Gram-pozitif kok izolatlarının 16S rRNA gen benzerlikleri (N:5).

İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
PB25c	<i>Kocuria sp.</i> Marseille-P3598	LT671594	100	99
	<i>Kocuria sp.</i> FD-2013	KC862588	100	99
	<i>Kocuria sp.</i> VTT E-82147	KU321256	100	98
PB30b	<i>Kocuria sp.</i> Marseille-P3598	LT671594	99	97
	<i>Kocuria sp.</i> FD-2013	KC862588	99	97
	<i>Kocuria sp.</i> VTT E-82147	KU321256	99	96
SV19	<i>Staphylococcus warneri</i> L6	KU922237	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> 07P	KR809427	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> Na-59	HQ831388	99	99
SV24a	<i>Staphylococcus warneri</i> L6	KU922237	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> 07P	KR809427	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> 82W	KR809419	99	99
SV27c	<i>Staphylococcus warneri</i> F2-1-6	KX349994	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> Na-59	HQ831388	99	99
	<i>Staphylococcus warneri</i> LH-T2	KF876869	99	99

Amerikan yavru çürüklüğü şüphesi olan örneklerden izole edilen 5 Gram pozitif kok izolatının yakın ilişkili olduğu bakteriler ile filogenetik benzerlikleri belirlenmiştir. Elde edilen dendograma göre PB25c ve PB30b nolu bakteriyal izolatın en fazla *Kocuria* sp. suşları ile bezerlik gösterdiği, SV19, SV24a ve SV27c nolu bakteriyal izolatların en fazla *Staphylococcus warneri* suşları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 14).



**Şekil 14.** Gram-pozitif kok izolatların filogenetik ağacı. (Dendogram MEGA 5.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır. Nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir. Şeklin altındaki skala ise benzerlik derecesini göstermektedir.)

Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarına göre *Staphylococcus* ve *Kocuria* cinslerine ait izolatların tür düzeyindeki tayin sonuçları Tablo 12’de verilmiştir.

**Tablo 12.** *Staphylococcus* ve *Kocuria* cinsine ait bakteriyal izolatların tür tayini sonuçları (N:5).

Tür	İzolat
<i>Kocuria</i> sp.	PB25c, PB30b
<i>Staphylococcus warneri</i>	SV19, SV24a, SV27c



### 3.4. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Kocuria* ve *Staphylococcus* cinslerinin antimikrobiyal aktiviteleri bir dizi gram pozitif panel antibiyotiklere karşı disk difüzyon metoduyla test edildi (Tablo 13).

*Paenibacillus* cinsine ait toplam 35 izolatın antibiyotik direnç profili incelendiğinde en yüksek direncin %54 (19 izolat) oranı ile seftazidime karşı olduğu tespit edilmiştir. Bu direnci sırasıyla %31 (11 izolat) penisilin, %28 (10 izolat) ampisilin ve eritromisin, %20 (7 izolat) gentamisin, %17 (6 izolat) amoksisilin-klavulanik asit ve sefuroksim, %11 (4 izolat) seftazolin ve amikasin, %6 (2 izolat) trimethoprim-sülfametaksazol ve %3 (1 izolat) oranı ile tetrasiklin ve kloramfenikol dirençleri izlemektedir.

*P. larvae* izolatları için ek olarak kullanılan 7 antibiyotik incelendiğinde 18 *P. larvae* izolatının 8'inin (%44) oksitetrasiklin, siproflaksasin ve norflaksasinin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra 4 izolat (%22) tylosin, 3 izolat (%17) linkomisin ve 2 izolatın (%11) ise furazolidon antibiyotiğine karşı dirençli olduğu belirlendi. Streptomisin antibiyotiğine karşı ise herhangi bir direnç gözlemlenmedi.

*Bacillus* cinsine ait toplam 24 izolatın antibiyotik direnç profili incelendiğinde en yüksek direncin %42 (10 izolat) oranı ile seftazidim antibiyotiğine karşı olduğu tespit edildi. Bu direnci sırası ile %38 (9 izolat) sefuroksim, %25 (6 izolat) ampisilin, %21 (5 izolat) penisilin ve eritromisin, %17 (4 izolat) amikasin, %13 (3 izolat) gentamisin, %8 (2 izolat) trimethoprim-sülfametaksazol ve seftazolin ve %4 (1 izolat) oranı ile amoksisilin-klavulanik asit, tetrasiklin ve kloramfenikol dirençleri izlemektedir.

Çalışmada Gram-pozitif kok olarak 2 *Kocuria* ve 3 *Staphylococcus* türü tespit edilmiştir. Beş Gram-pozitif kok izolatının antibiyotik direnç profili incelendiğinde en yüksek direncin %80 (4 izolat) oranı ile seftazidim antibiyotiğine karşı olduğu tespit edilmiştir. Gentamisin antibiyotiğine karşı direnç ise sadece 2 izolatda (%40) belirlenmiştir. Trimethoprim-sülfametaksazol, tetrasiklin ve kloramfenikol

antibiyotiklerine karşı herhangi bir direnç belirlenemezken, penisilin, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefuroksim, seftazolin, amikasin ve eritromisin antibiyotiklerine karşı %20 (1 izolat)'lık bir direnç tespit edilmiştir.



**Tablo 13.** Çalışmada izole edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri (N:64).

	P	AMP	AMC	SXT	CXM	KZ	CAZ	TE	T	CN	AK	S	E	TY	C	FX	L	CIP	NOR
<i>Paenibacillus alvei</i>																			
PB 33	R	R	S	S	S	R	R	S	-	S	S	-	R	-	R	-	-	-	-
<i>Paenibacillus dentriformis</i>																			
PB 11	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB14a	S	S	S	S	S	S	S	R	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 17	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 18a	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 19a	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 20	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 22b.1	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 22f	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 23b	R	R	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 23c	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 26a	R	R	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 26c	S	S	S	R	S	S	R	S	-	S	R	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 30a	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 31a	R	R	S	S	R	R	R	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 32a	R	R	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
<i>Paenibacillus larvae</i>																			
PB 12b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S
PB 13.1b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB 16.1b	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
PB 16.2	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB 19b	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB 23a	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB 24b	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
PB 25B	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
PB 27b	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
PB 31b	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R
PB 32b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PB 34	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
PB 35	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
SV 21	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
SV 27b	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
SV 28	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
SV 30b	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
SV 35	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>Paenibacillus sp.</i>																			
PB 13.2	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

**Tablo 13 (devam).** Çalışmada izole edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri.

	P	AMP	AMC	SXT	CXM	KZ	CAZ	TE	T	CN	AK	S	E	TY	C	FX	L	CIP	NOR
<b><i>Bacillus amyloliquefaciens</i></b>																			
PB 36b	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>																			
SV 9b	R	R	R	S	R	S	R	S	-	S	S	-	S	-	R	-	-	-	-
SV 37	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Bacillus pumilus</i></b>																			
PB 28e	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 2	S	R	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 9a	S	R	S	S	R	S	S	R	-	S	R	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>																			
PB 22d	S	S	S	S	R	R	S	S	-	R	R	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 24a	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 31c	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 31d	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 31e	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 8a	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 8b	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 11a	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Bacillus sp.</i></b>																			
PB 14b	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 14c	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 22e	R	R	S	R	S	R	S	S	-	R	R	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 26b	S	S	S	S	R	S	S	S	-	R	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 26d	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 26e	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 28a	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 28b	R	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
PB 278c	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 24b	S	S	S	R	R	S	R	S	-	S	R	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Kocuria sp.</i></b>																			
PB 25c	R	R	R	S	R	R	R	S	-	R	R	-	R	-	S	-	-	-	-
PB 30b	S	S	S	S	S	S	R	S	-	R	S	-	S	-	S	-	-	-	-
<b><i>Staphylococcus warneri</i></b>																			
SV 19	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 24a	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-
SV 27c	S	S	S	S	S	S	R	S	-	S	S	-	S	-	S	-	-	-	-

P: Penisilin, AMP: Ampilisin, AMC: Amoksisilin Klavunat, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, CXM: Sefuroksim, KZ: Seftazolin, CAZ: Cef tazidim, TE: Tetrasiklin, T: Oksitetrasiklin, CN: Gentamisin, AK: Amikasin, S: Streptomisin, E: Eritromisin, TY: Tylosin, C: Kloramfenikol, FX: Furazolidone, L: Linkomisin, CIP: Siproflaksasin, NOR: Norflaksasin, S: Hassas, R: Dirençli, -: Denenmedi.

Çalışmada izole edilen 64 izolatın 55'inin (%86) kullanılan antibiyotiklerden en az birine dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların 39'u (%60) kullanılan iki ve daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu ve çoklu direnç taşıdıkları tespit edilmiştir (Tablo 13).

Çalışmada *P. larvae* izolatları dışındaki izolatlar için 12 Gram pozitif panel antibiyotiği kullanılmıştır. Bu sonuçlar incelendiğinde ise 12 antibiyotiğin 9'una (%75) dirençli olan *Kocuria* sp. PB25c izolatı en dirençli izolatdır. Bu izolatı 7 (%58) antibiyotiğe karşı dirençli olan *Bacillus* sp. PB22e ve 6 (%50) antibiyotiğe karşı dirençli olan *Paenibacillus dentriiformis* PB31a ve *Bacillus licheniformis* SV9b izolatları takip etmektedir (Tablo 14).

**Tablo 14.** *Paenibacillus larvae* dışındaki izolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri (N:25).

	P	AMP	AMC	SXT	CXM	KZ	CAZ	TE	CN	AK	E	C
PB13.2					+		+		+		+	
PB22b.1, PB28a							+				+	
PB36b	+	+										
PB28e, PB31d, PB26e, PB28c					+		+					
PB28b	+						+					
PB30b							+		+			
PB22f,					+		+					
PB26b					+				+		+	
PB26d	+	+										+
PB23b	+	+	+									+
PB26a	+	+							+			+
PB26c				+			+			+	+	
SV9a		+			+			+		+		
B22d					+	+			+	+		
SV24b				+	+		+			+		
PB33	+	+				+	+					+
PB32a	+	+			+		+					+
PB31a	+	+			+	+	+					+
SV9b	+	+	+		+		+					+
PB22e	+	+		+		+			+	+	+	
PB25c	+	+	+		+	+	+		+	+	+	

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

*Paenibacillus larvae* izolatları için kullanılan 19 antibiyotikten 11'ine (%58) dirençli olan PB31b izolatu en dirençli izolattır. Bu izolatu 8 (%42) antibiyotiğe karşı dirençli olan SV30b ve SV35 izolatları takip etmektedir (Tablo 15).

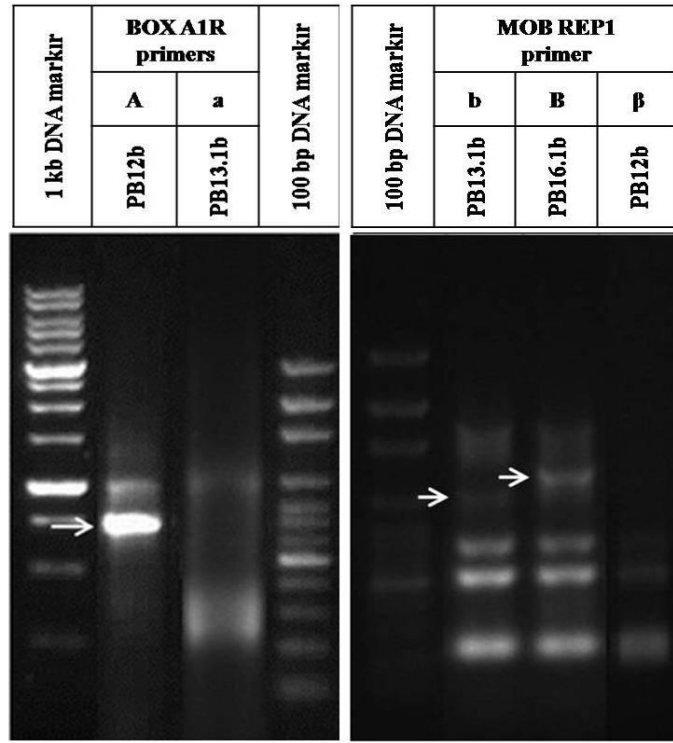
**Tablo 15.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profili (N:14).

	P	AMP	AMC	SXT	CXM	KZ	CAZ	CN	AK	E	C	TE	T	TY	FX	L	CIP	NOR
PB23a				+				+										
PB12b									+					+	+			
PB16.1b							+				+				+			
PB27b							+	+						+				
SV27b												+	+				+	+
SV28												+	+			+	+	+
PB34			+									+	+	+			+	+
PB25b							+	+				+	+			+	+	+
PB35	+	+	+			+			+		+							
SV21	+	+					+					+	+				+	+
PB24b	+	+			+	+	+	+		+								
SV30b	+	+	+				+					+	+				+	+
SV35	+	+	+				+					+	+				+	+
PB31b	+				+		+	+	+	+		+	+	+			+	+

P: Penisilin, AMP: Ampilisin, AMC: Amoksisilin Klavunat, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, CXM: Sefuroksim, KZ: Seftazolin, CAZ: Ceftazidim, T: Oksitetrasiklin, CN: Gentamisin, AK: Amikasin, E: Eritromisin, TY: Tylosin, C: Kloramfenikol, FX: Furazolidone, L: Linkomisin, CIP: Siproflaksasin, NOR: Norflaksasin.

### 3.5. *Paenibacillus larvae* İzolatlarının Genetik Çeşitliliği

Yapılan çalışmada izole ve karakterize edilen 18 *P. larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği BOX ve MOB-REP1 PZR sonuçları ile belirlendi. Literatürde daha önceden belirlenmiş olan BOX-PZR için spesifik 750 bp amplifikasyon ürününün varlığına göre izolatlar A ve a olmak üzere 2 farklı genotip içerdiği tespit edildi. Aynı şekilde MOB REP1 PZR'ı için spesifik 1000 bp amplifikasyon ürününün varlığına göre izolatlar B, b ve  $\beta$  olmak üzere 3 farklı genotipte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 15).



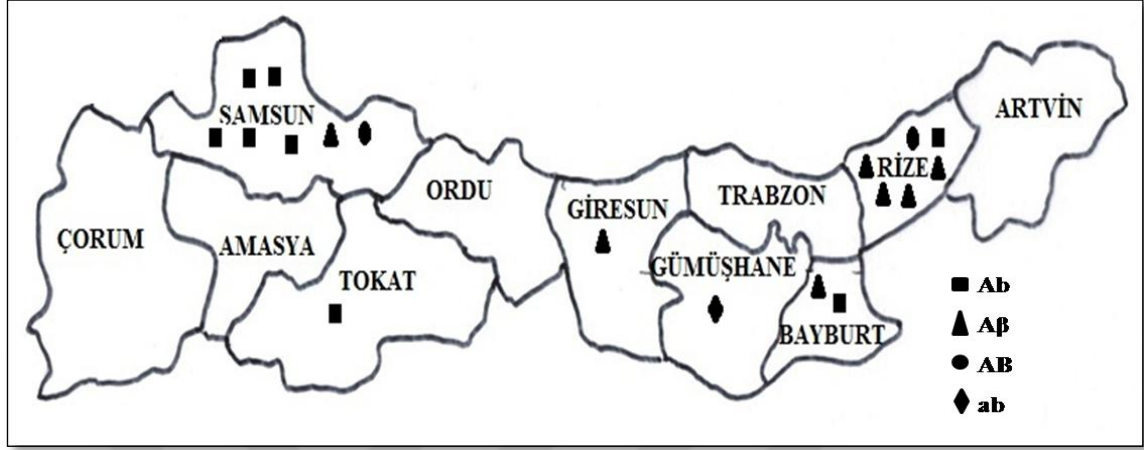
**Şekil 15.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının BOXA1R ve MOBREP1 rep-PZR sonuçları. Oklar BOXA1R ve MOBREP1 için 750 ve 1000 bp'lık amplikasyon ürünlerini göstermektedir. 1 kb DNA markır (GeneOn, Cat.-no: 305-005), 100 bp DNA markır (Solid BioDyne, Kat.-No: 07-11-00050).

Rep-PZR DNA parmak izi yöntemine göre 18 izolatın 8'i (%53) Ab genotipinde iken, 7'si (%39) Aβ, 2'si (%11) AB ve 1'i (%6) ab genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 18 tane *P. larvae* suşunun BOX ve MOB rep-PZR analizleri doğrultusunda 4 farklı genotipik özellikte olduğu tespit edilmiştir (Tablo 16).

**Tablo 16.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği.

İzolat No	Genotip	Örneğin Alındığı Bölge	İzolat No	Genotip	Örneğin Alındığı Bölge
PB 12b	Aβ	Rize	PB 31b	Ab	Samsun
PB13.1b	ab	Gümüşhane	PB 32b	Ab	Rize
PB16.1b	AB	Rize	PB 34	Ab	Bayburt
PB 16.2	Aβ	Rize	PB 35	Aβ	Bayburt
PB 19b	Aβ	Rize	SV 21	Aβ	Giresun
PB 23a	Aβ	Rize	SV 27b	AB	Samsun
PB 24b	Ab	Samsun	SV 28	Ab	Samsun
PB 25B	Ab	Samsun	SV 30b	Aβ	Samsun
PB 27b	Ab	Samsun	SV 35	Ab	Tokat

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında en fazla bulunan Ab ve Aβ genotiplerinin tüm Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'ne yayıldığı görülmektedir. Diğer genotiplerin ise (ab ve AB) Doğu Karadeniz bölgesinde bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. *Paenibacillus larvae* izolatlarının genetik çeşitliliğinin yayılımı.

### 3.5. *Paenibacillus larvae* İzolatlarının Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen 18 *Paenibacillus larvae* izolatının plazmit DNA içerikleri QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan izolasyon sonrasında plazmit-DNA'lar agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi. Agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre 18 izolatın 13'ünün plazmit DNA içerdikleri tespit edildi (Tablo 17).

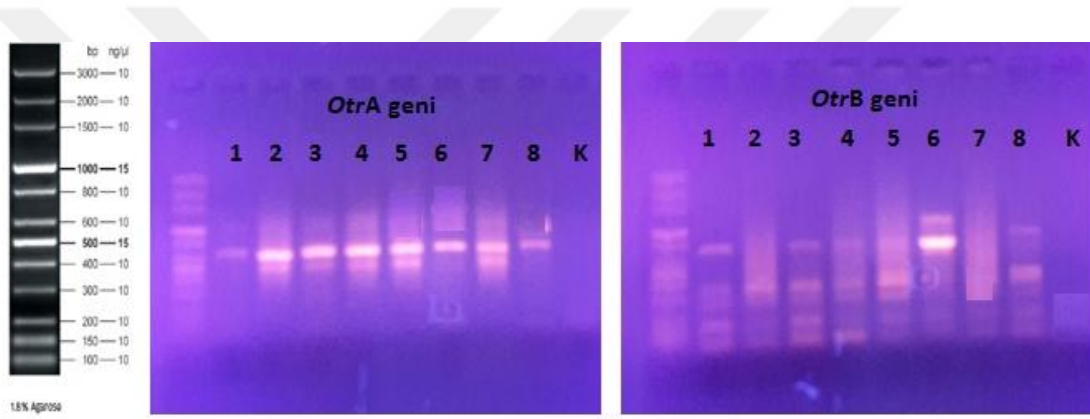
Tablo 17. *Paenibacillus larvae* izolatlarının plazmit içerikleri (N:18).

İzolat No	Plazmit İçeriği	Plazmit Sayısı	Büyükülüğü (~ bp)	İzolat No	Plazmit İçeriği	Plazmit Sayısı	Büyükülüğü (~ bp)
PB 12b	+	1	2000	PB31b	+	1	2000
PB 13.1b	-	-	-	PB 32b	-	-	-
PB 16.1b	+	1	3000	PB 34	+	1	2000
PB 16.2	-	-	-	PB 35	+	1	6500
PB 19b	+	2	6500	SV 21	+	2	3000
PB 23a	+	2	3000	SV 27b	+	1	3000
PB 24b	-	-	-	SV 28	+	2	6500
PB 25B	+	1	3000	SV 30b	+	2	3000
PB 27b	-	-	-	SV 35	+	1	4000



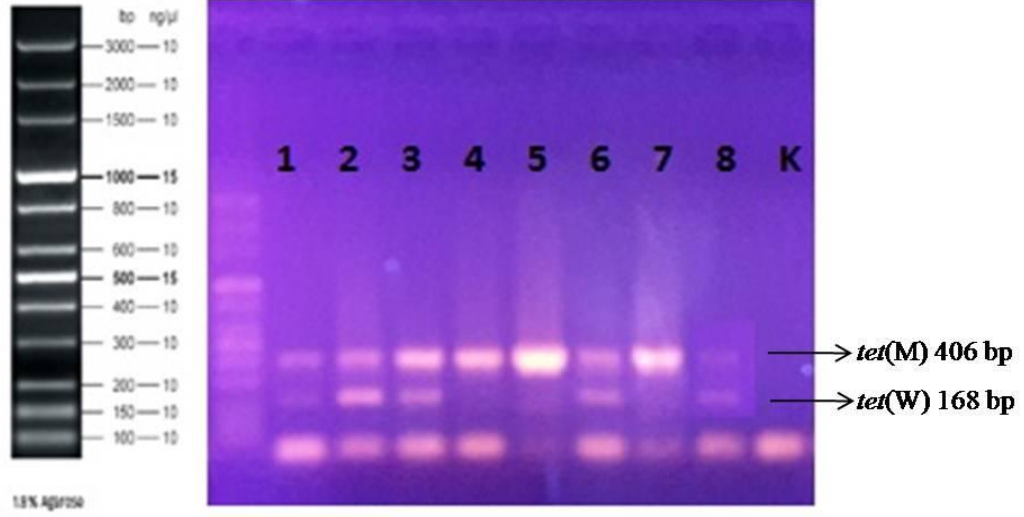
### 3.6. *Paenibacillus larvae* İzolatlarında Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 18 *Paenibacillus larvae* izolatının antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde 8 izolatın tetrasiklin ve oksitetrasiklin dirençli olduğu tespit edildi. Gram pozitif bakterilerde tetrasiklin grubu antibiyotiklere dirençten sıklıkla sorumlu olduğu bilinen *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* ve *tet(W)* ve oksitetrasiklin direncinden sorumlu olduğu bilinen *OtrA* ve *OtrB* genleri bu sekiz izolatdan izole edilen plazmit DNA'lar kalıp olarak kullanılarak tarandı. Yapılan çalışma sonucunda 8 izolatın hepsinin *OtrA* geni, 7 izolatın ise *OtrB* geni açısından pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 17).



**Şekil 17.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının *OtrA* ve *OtrB* geni agaroz jel görüntüsü. DNA markır: Jena Bioscience Mid Range DNA ladder (M-203), 1:*P. larvae* SV35, 2: *P. larvae* SV30b, 3: *P. larvae* SV21, 4: *P. larvae* PB34, 5: *P. larvae* PB31b, 6: *P. larvae* PB25b, 7: *P. larvae* SV28, 8: *P. larvae* SV27b, K: Negatif kontrol

Tetrasiklin direnç genlerinin tespiti için yapılan PZR çalışması sonucunda 8 izolatın tümü *tet(M)* geni yönünden pozitif olduğu tespit edilirken, 7 izolat *tet(W)* geni yönünden pozitifdir. Hiç bir izolatın *tet(K)* ve *tet(L)* geni içermemektedir (Şekil 18, Tablo 18).



**Şekil 18.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının *tet* genleri agaroz jel görüntüsü. DNA markır: Jena Bioscience Mid Range DNA ladder (M-203), 1:*P. larvae* SV35, 2: *P. larvae* SV30b, 3: *P. larvae* SV21, 4: *P. larvae* PB34, 5: *P. larvae* PB31b, 6: *P. larvae* PB25b, 7: *P. larvae* SV28, 8: *P. larvae* SV27b, K: Negatif kontrol

**Tablo 18.** *Paenibacillus larvae* izolatlarının tetrasiklin direnç geni içerikleri (N:8).

İzolat No	Tetrasiklin gubu antibiyotikler		Tetrasiklin direnç genleri (bp)				Oksitetrasiklin direnç genleri (bp)	
	TE	T	<i>tet(K)</i> (718)	<i>tet(L)</i> (788)	<i>tet(M)</i> (406)	<i>tet(W)</i> (168)	<i>OtrA</i> (778)	<i>OtrB</i> (947)
PB25B	+	+	-	-	+	+	+	+
PB31b	+	+	-	-	+	+	+	+
PB34	+	+	-	-	+	-	+	+
SV21	+	+	-	-	+	+	+	+
SV27b	+	+	-	-	+	+	+	+
SV28	+	+	-	-	+	+	+	-
SV30b	+	+	-	-	+	+	+	+
SV35	+	+	-	-	+	+	+	+

TE: Tetrasiklin, T: Oksitetrasiklin.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Ülkemiz 7.709.636 dolayında koloni sayısı ve 107.665 ton bal üretimi ile dünyanın ilk üç ülkesinden biri olmasına rağmen kovan başına ortalama bal üretimi 14 kg olup dünya ortalaması olan 21 kg'nin altındadır. Bu durum arıcılık sektöründe alınan önlemlerin yetersiz olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte Türkiye'nin dünya bal ticaretindeki %1,87'lik bir payla 26. sırada yer alışı sahip olunan kovan varlığı ve bal üretimiyle uyum sağlamamaktadır. Hem dünya bal ticaretindeki payımız hem de koloni başına bal üretimimiz dikkate alındığında, ülkemizin sahip olduğu mevcut arıcılık potansiyelinden yeterince faydalanamadığımız ortaya çıkmaktadır. Bunun nedenleri arasında en önemlilerinden birisi ekonomik kayba ve yüksek düzeyde koloni ölümlerine neden olan AYÇ hastalığıdır.

AYÇ bal arısı larvalarında görülen en ciddi ve öldürücü bakteri hastalığıdır. Buna spor oluşturan *P. larvae* subsp. *larvae* neden olur. *P. larvae*'ın mutlak tanımlanması gerekmektedir. AYÇ tanısı, agar plakalarında yetiştirilen *P. larvae* subsp. *larvae* kolonilerinin görsel olarak saptanmasına dayanır. İlk tanımlamanın onaylanması için yalnızca şüpheli koloniler analiz edilir. *P. larvae* subsp. *larvae*'ların normal koloni morfolojisi, gri-beyazımsı (krem), bazıları şeffaf ve hafif parlak görünümündedir (Bailey ve Ball, 1991).

Çalışmamızda AYÇ hastalık şüpheli arı ve ürünlerinden alınan örnekler (Tablo 5) homojenize edildikten sonra 10 dakika 80°C'de ısıya maruz bırakılarak ısıya dirençli mikro organizmaların varlığı mikrobiyolojik açıdan incelendi. İzole edilen ısıya dirençli Gram pozitif sporlu ve sporsuz bakterilerin geleneksel yöntemler kullanılarak morfolojik, mikroskopik ve biyokimyasal özellikleri ortaya kondu. Doğada çok sayıda 80°C'de 10 dakikada inaktive olmayan Gram pozitif sporlu ve sporsuz bakteri türleri bulunmakta olup, bu türlerin bir kısmı çeşitli canlı türlerinin biyotasında kolonize olurlar. Çalışmamızda da arı ve arı ürünlerinde 80°C'de inaktive olmayan patojen veya saprofit mikrofloranın yer aldığı gözlenmiştir.

Mikroorganizmaların kültürde büyük kısmı %5 CO<sub>2</sub>'ye ihtiyaç duymamasına rağmen *P. larvae* izolasyonunu kolaylaştırdığı için kullanılmıştır. *P. larvae* dışındaki

kültürler fakültatif anaerobik mikroorganizma olup her ortamda hızlı üremektedirler. *P. larvae* şüpheli suşlar mikroaerofilik ortama (%5 CO<sub>2</sub>) ihtiyaç duymakta oldukları ve 2-5 günlük sürelerde üreyebildikleri belirlenmiş olup literatürle uyumlu oldukları gözlemlendi (de Graaf vd., 2013). Koloni morfolojileri incelendiğinde bilinen üç genel morfoloji S, M ve R tipi gözlenirken genel olarak düzgün ve pürüklü koloni tipleri hakim olduğu belirlendi (Tablo 6). Koloni tipleri pasajlarda kısmen değişebildiği gözlemlenmiş ve ilk izolasyonda belirlenen koloni tipleri dikkate alınmıştır. *Bacillus* ve *Paenibacillus* türleri tekli, ikili veya kısa yada uzun zincirli basil morfolojisi gösterdikleri, spor varlığı ve konumları cins ve tür tanısında önemli katkı sağlamaktadır. Koloni morfolojisi ve mikroskobik görünümüleri *P. larvae*, *P. alvei* türleri ve *Staphylococcus*, *Bacillus* cinslerinin görünümüyle uyumlu olduğu belirlendi. *Paenibacillus* suşları farklı besin koşullarında farklı morfolojik tiplere sahip oldukları bildirilmektedir (Cohen vd., 2004). *P. larva* alt gruplarının (Ab, ab ve aβ) kolonileri beyazımsı grimsi, biraz şeffaf ve hafifçe parlak bir görünümün arzederken, AB alt grubuna ait izolatlar bu normal koloni morfolojisinden önemli bir sapma gösterdikleri bildirilmektedir. AB alt genotipe sahip küçük kolonileri şeffaf olmadan kırmızı renkte kahverengi veya beyaz tek renkli, daha büyük kolonilerin çoğunlukla konsantrik kahverengimsi ve beyazımsı daireler gösterdikleri, en dıştaki daire daima turuncu-kahverengi renkte olduğu belirtilmektedir. AB alt grubunun koloni pigmentasyonunun kolonilerinin istikrarlı ve karakteristik bir morfolojik özelliği olarak düşünülmelidir. Hem tek renk hem de daire içine farklı renk oluşturan koloni fenotipleri, katalaz testleri ile *P. larvae* subsp. *larvae* suşları spesifik PZR bulgusu ile açık şekilde *P. larvae* subsp. *larvae* olduğu tanımlandı. Bu sonuçlar göstermektedir ki suşlarda fenotipik farklılıkların sabit değildir (Neuendorf vd. 2004). Çalışmamızda da elde ettiğimiz fenotipik görünümle biyotipler ile bir korelasyon kurulamadı. Bu konuda daha fazla suşlarla ve otomatize sistemlerle çalışılması yararlı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda bazı koloni tiplerinin petride hızlı yayıldıkları belirlendi. Petride yayılan koloniler yüzeyde hızlı gelişirler. Doğada bakteriler sıklıkla zorlu çevre koşullarıyla mücadele etmek zorundadır. Bunu başarabilmesi için karmaşık davranış ve iletişim yolları geliştirirler. Bu yüzden morfolojik tip terimleri mikrobiyolojide sıklıkla kullanılır. *P. dendriiformis* türlerinde farklı morfotipler (T, C, V tipleri gibi) belirtilmiştir. Uzun, düz veya çubuk şeklinde aşırı flajellalı bir bakteri olan *P. dendriiformis* C

morfortipi olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda görülmüştür ki bakteriler moleküler ve geleneksel olarak tanımlansa bile çok sayıda farklı morfotiplerin varlığı göz önünde tutulmalıdır (Tcherpakov vd.,1999).

İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi hem tür tanısının geleneksel olarak doğrulanması hem de suşların özelliklerinin bilinmesi açısından önemli olduğu bilinmektedir. Literatürde *P. larvae* ve *P. larvae* subsp. *pulvificiens* suşlarının katalaz negatif, *P. alvei*'nin ise katalaz pozitif ve nitrat üretiminin sadece *P. alvei* de negatif olduğu bildirilmektedir (de Graaf vd., 2013; Shimanuki ve Knox, 2000).

Çalışmamızda izole edilen ve moleküler olarak da tanımlanan 18 *P. larvae* suşlarında oksidaz ve katalaz testleri farklılık gösterebileceği ortaya çıkmıştır. Buna göre suşların 4'ünde (PB12b, PB23a, PB24b ve PB32b) oksidaz ve katalaz negatif, 2 suшта (SV 27b ve SV30b) oksidaz negatif katalaz pozitif, 2 suшта (PB16.2 ve PB27b) her ikisinde pozitifken diğer suşlarda oksidaz pozitif katalaz negatif olarak belirlendi (Tablo 6). Testlerin her biri 3'den fazla tekrar edilmesine rağmen elde edilen bu sonuçların literatür bilgileriyle uyuşmadığı gözlenmektedir. Ayrıca bu testlerdeki farklılığın biyotiplendirme ile de ilişkili olmadığı gözlenmekte olup oksidaz ve katalaz testinin tür tanısında literatürde belirtildiği kadar büyük önem taşımadığı ortaya konmuştur. Bununla birlikte bu testlerin çok sayıda test edilmesi ve % ile ifade edilmesi daha doğru olacaktır. Yukarıdaki çalışmalarda da olduğu çalışmamızın bu kısmında, karakteristik metabolik modellerin her zaman genotip için bazı değişkenler içerdiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu özelliklerin statik özellik olarak anlaşıldığı biyokimyasal özelliklere dayalı gruplamalar, genotipleme ile pek az korelasyon oluşturan sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir.

Geleneksel makro (Jelinski, 1985; Alippi ve Aguilar, 1998) veya ticari mikro yöntemleri (Carpana vd., 1995; Dobbelaere vd., 2001) kullanarak *P. larvae* subsp. *larvae*'lerin biyokimyasal karakterizasyonu hakkında daha önce yapılan çalışmalarda bu testlerden elde edilen sonuçlar, *P. larvae* subsp. *larvae*'lerin sınıflandırılması için biraz çelişkilidir. Bu farklılıkların kullanılan farklı sistemlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Dobbelaere vd., 2001).

Çalışmamızda bazı suşların (9 adet) turuncu renkli koloni oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 11). Bu suşların 7'si *P. dendriiformis*, biri (PB 12b) *P. larvae* subsp. *larvae*, diğeri ise (PB24b) *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* olarak tanımlanmıştır. *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* arılarda pudramsı hastalık etkenidir. Bu suşlar kovanda peteğin rengini parlak sarıdan kahverengiye doğru değiştirir. Kültür ortamında üretildiğinde ise kırmızı, kahverengi koloniler oluşturur. Bu koloni renkleri alt kültürlerde kaybolabilir (Shimanuki ve Knox, 2000).

Şeker fermentasyon testlerinin (Tablo 6) *P. larvae* ve *P. alvei* tanısında önemli olduğu (de Graaf vd., 2013; Peng, 1979), bu çalışmada da bu amaçla test edildiği, sonuçların literatürle uyumlu olduğu, dolayısıyla türlerin doğrulanmasında kullanılabilirliğinin var olduğu çalışmamızda da gözlendi. Diğer yapılan biyokimyasal testler suşların çeşitli özelliklerinin belirlenmesinde önem arz etmekte olup tür tanısında önemli bir kriter oluşturmamaktadır.

Çalışmamızda AYÇ şüpheli petek, bal, larva ve temel petek örneklerinden bal arıları için hem patojenik, hemde simbiyotik olan birçok Gram pozitif bakteri izole edilmiştir. Avrupa bal arısı *Apis mellifera* bağırsağında çok sayıda bakteri bulundurulur. Son çalışmalar, bal arılarında Gram pozitif bakterilerden alfa-, beta- ve gamma-proteobakterilere kadar düzinelerce bakterinin var olduğuna işaret etmektedir. Bu bakteri türlerinden birkaçı bal arıları için açıkça patojenikken, çoğunluğu bal arısı hastalıkları ile ilişkilendirilemediği bildirilmektedir (Evans ve Armstrong, 2006). Bal arılarının bağırsağında yaşayan simbiyot bakterilerin %1'inin maya benzeri mikroorganizmalar, %29'nun *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi Gram pozitif mikroorganizmalar ve %70'lik kısmını ise *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* ve *Pseudomonas* gibi Gram negatif veya Gram değişken bakterileri içeriğinden oluştuğu rapor edilmektedir (Jeyaprakash vd., 2003).

Antunez vd. (2004) yaptığı çalışmalarda 103 bal örneğinin, %73'ünde (0,5-819 cfu/g aralığında) *Paenibacillus larvae* sporlarının varlığını bildirmişlerdir. Pohorecka vd. (2008)'nin, 2005 ve 2007 yılları arasında yaptıkları çalışmada 242 AYÇ şüpheli örneğin %56'sında *P. larvae* pozitifliğini bildirmişlerdir. Pohorecka vd (2012) tarafından

Polonya’da 2009–2011 yılları arasında yapılan çalışmada 162 farklı lokaliteden alınan kovanlarda *Paenibacillus larvae* spor prevalansı %45 olarak belirlenmiş. Çalışmamızda ise toplanan 64 örnekten 18 (%28) adet *P. larvae* izole edilmiştir.

Gaggia vd. 2015 yılında belirgin hastalık belirtileri ve sağlıklı görünümlü 5-6 günlük bal arısı larvalarında görülen bakteri topluluklarını araştırmak için kültür bağımlı ve kültürden bağımsız teknikler uygulamışlardır. Teknikler, *E. faecalis* ve *P. dendritiformis*’in varlığını teyit etmenin yanı sıra tüm numunelerde *M. plutonius*’un varlığını doğrulamıştır. Çalışmamızda ise 64 örnekten 16 adet *P. dendritiformis* izole edilmiştir.

Spor oluşturabilen *Bacillus* cinsi bakteriler bal arılarından sıklıkla izole edilen mikroorganizma gruplarından biridir. Gilliam ve Morton (1978) ‘nun bal arılarının bağırsak florasında yaptıkları çalışmada *Bacillus* cinsine ait 14 tür tespit edilmiş, en fazla gözlenen türler olarak *B. negaterium*, *B. subtilis* ve *B. pumilis* bildirilmiştir. Benzer şekilde birçok çalışmada *Bacillus* cinsine ait türlerin bal arılarından izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilis* ve *B. licheniformis* türleri sıklıkla izole edilen türlerdir (Gilliam, 1997; Jeyaprakash vd., 2003; Evans ve Armstrong, 2006; Yoshiyama ve Kimura, 2009; Wang vd., 2015). Çalışmamızda AYÇ şüpheli örneklerden izole edilen 64 Gram pozitif bakterilerin 24’ünün (%38) *Bacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen bakterilerin 8’i *B. subtilis*, 3’ü *B. pumilis*, 2’si *B. licheniformis*, 1’i *B. amyloliquefaciens* olarak, 10 izolat ise tür düzeyinde tanımlanamayıp *Bacillus* sp. olarak cins düzeyinde tanımlanmıştır (Tablo 10). Çalışmamızdaki veriler incelendiğinde literatür ile uyumlu oldukları görülmektedir.

Bal arısı (*Apis mellifera*) bağırsak florası üzerine yapılan çalışmalarda *Staphylococcus* türlerinden nadiren de olsa bahsedilir (Anjum vd., 2017). Çalışmamızda izole edilen 64 Gram pozitif izolatın 3’ü *Staphylococcus warneri* olarak tanımlanmıştır. Bu tür literatürde bal arılarından sıklıkla izole edilen bir tür olmamasının yanında, Türkiye’de yapılan bir kaç bal arılarının mikrobiyal florasını belirleme çalışmalarında tespit edilmiştir (Özakın vd., 2003; Borum vd., 2015; Yarılgaç, 2016).

*Micrococcaceae* familyası içerisinde yer alan *Kocuria* cinsi filogenetik ve kemotaksonamik farklılıklarından dolayı *Micrococcus* cinsinden ayrılmıştır (Stackebrandt vd., 1995). Bu cins Gram pozitif, kok şeklinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, aerob ve genellikle basit kültürlerde üreyebilme özelliği gösteren mikroorganizmaları içerir. Bugüne kadar tanımlanmış 20 türü bulunmakla beraber su, toprak, fermente gıdalar gibi birçok farklı çevreden izole edilebilmektedir (Roman-Ponce vd., 2016). *Kocuria* cinsi bazı bakteriler, insan deri ve boğaz mukozasında kommensal olarak bulunabilir. Bununla birlikte insanlarda çoğunlukla ağır hastalıkların tedavisini zorlaştıran bir etken olduğu ancak bugüne kadar çok tanınmadığı için klinik semptomları ve prevalansı pek bilinmemektedir (Savini vd., 2010). Yoshiyama ve Kimura, (2009) yaptıkları çalışmada Japon bal arılarının bağısak florasını incelemişler ve *Kocuria* cinsine ait koklar izole etmişlerdir. Anjum vd. (2017) yaptıkları bir diğer çalışmada Kuzeybatı Pakistan Bölgesi'nden toplanan *Apis mellifera* örneklerinin bağısak florasını incelemişler ve *Kocuria* cinsine ait izolatlar elde etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada ise Ordu Yöresi Bal arılarının bakteriyel florası incelenmiş ve *Kocuria* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir (Yarılgaç, 2016). Çalışmamızda izole edilen 64 izolatın 2'si (PB25c ve PB30b) *Kocuria* sp. olarak tanımlanmıştır (Tablo 11,12). İzolatlar Samsun ilinden gelen larva örneklerinden izole edilmiştir. Bu sonuçlar bize Orta Karadeniz Bölgesi'nden toplanan arı örneklerinde *Kocuria* cinsinin bulunabileceğini açıkça göstermektedir (Tablo 5).

Mikroorganizmaların tür tanısında geleneksel ve 16S rRNA gen ile moleküler tanı yöntemleri bir birini tamamlayan önemli metodlardır. Ancak zaman zaman yeterli olmayıp başka spesifik gen bölgeleriyle de desteklemek gerekmektedir. Çalışmamızda izole edilen türlerin geleneksel ve moleküler tanı sonuçları ele alındığında literatürde belirtilen sonuçlara bire bir uymadıkları nadir de olsa gözlenmektedir. *P. larvae* olarak tanımlanan suşların (Tablo 7) gen bankasındaki benzer suşlarla %98-100 arasından örtüşme ve benzerlik göstermesine rağmen biyokimyasal test sonuçları çoğu zaman birbir benzer çıkmamaktadır. Örneğin *P. dentriformis* olarak tanımlanan PB 11 ve PB22f 16S rRNA gen analizine göre %98 örtüşme ve %99 benzerlik taşımasına rağmen morfolojik karakterleri (sırasıyla S ve M tipi) ile biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldığında (oksidaz aktivitesi, jelatin hidrolizi, Voges-Proskaver ve dihidrogenaz testleri) farklı olduğu gözlenmektedir (Tablo 6). *P. larvae* subs. *larvae* olarak



tanımlanan PB12b ve PB23a suşlarında aynı suşlarla %99 benzerlik ve örtüşme gözlenmesine rağmen morfolojik ( sırası ile subterminal sporlu S tipi turuncu koloni ve sporsuz R tipi krem renkli koloni) ve biyokimyasal özellikleri (sitrata kullanabilme ve maltoz fermentasyonu) açısından farklılıklar gözlenmektedir (Tablo 6, 7 ve 8, Şekil 12). Bu durum diğer türlerde de benzer şekilde farklılıkların olduğunu bu nedenle moleküler karakterizasyonun yanında geleneksel tanı yöntemlerinin de dikkate alınması gerektiğini ve yeni tanı yöntemleri ile türler arasındaki benzerlik ve farklılıkların benzer çalışmalarla ortaya konması gerektiği düşünülmektedir.

*Staphylococcus* sp. cinsi kaynaklarda oksidaz ve katalaz pozitif (Bilgehan, 2004; Koneman, 1997) olarak bilinmesine rağmen çalışmamızda moleküler olarak *S. warneri* olarak tanımlanan 3 suşunda (SV19, SV24a ve SV27c) oksidaz negatif olarak belirlenmiştir. (Tablo 6, 7, 11 ve 12, Şekil 14).

AYÇ hastalığı ile ilgili son on yılın literatürü incelendiğinde, çalışmaların hastalığın kontrolü için yeni stratejiler bulmakla ilgili olduğu görülmektedir. AYÇ birçok ülkede bildirilebilir bir hastalık olduğundan, AYÇ'ye karşı önlemler ve tedavisi çoğu zaman kanunla düzenlenir ve klinik olarak enfekte olmuş kovanların yok edilmesini içerir. Bazı ülkelerde, enfekte kolonilerin tedavisi için antibiyotiklere izin verilir; ancak birçok Avrupa ülkesinde, arı hastalıklarının tedavisinde antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır (Genersch, 2010). Amerika Birleşik Devletleri de dahil olmak üzere birçok ülkede, bal arılarında klinik AYÇ semptomları var olduğunda, enfekte bal arısı kolonileri antibiyotikler ile tedavi edilmektedir. Antibiyotik kullanımı 1940'ların sonunda başlamıştır. Erken çalışmalar klorotetrasiklin (aureomycin) türevlerinin *P. larvae* üzerinde aktif olduğunu gösterirken, penisilin, kloramfenikol streptomisin ve diğer antibiyotiklerin daha az aktif olduğunu göstermiştir. Oksitetrasiklin 1950'lerin başlarında kullanılmaya başlanmış ve Amerikan ve Avrupa yavru çürüklüğü hastalıklarını tedavi etmek için sıklıkla uygulanan antibiyotiktir (Kochansky vd., 2001). Profesyonel arıcılıkdaki tetrasiklinlerin yoğun kullanımı, ABD, Kanada ve Arjantin'de tetrasikline dirençli *Paenibacillus* suşlarının ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır. Günümüzde yaygın direnç konusunda genel bir endişe vardır (Miyagi vd., 2000; Colter, 2000; Alippi, 2000; Reybroeck vd., 2012). Çalışmamızda tetrasiklin antibiyotiğine karşı direnç AYÇ şüpheli örneklerden izole edilen tüm izolatlarda araştırılmıştır. (Tablo 13).

Tetrasiklin direnci izole edilen *P. dentriformis* izolatlarının 1'inde, *P. larvae* izolatlarının 8'inde ve *Bacillus pumilis* izolatlarının 1'inde olmak üzere toplam 63 izolatın 10'unda gözlemlenmiştir. Oksitetrasiklin antibiyotiğine karşı direnç gelişimi ise sadece *P. larvae* izolatlarında incelenmiştir ve 18 *P. larvae* izolatının 8'inde oksitetrasiklin direnci gözlemlenmiştir. Çalışmamızda *P. larvae* izolatlarının %44'ünde tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnci tespit edilmiştir. Bu sonuç dünyada çoğu ülkede olduğu gibi Türkiye'deki arıcılıktada bir tetrasiklin direncinin olduğunu göstermektedir. Direnç oranı göze alındığında tetrasiklin direncinin endişe verici boyutta olduğu söylenebilir (Tablo 13).

Amerikan yavru çürüklüğü hastalığının tedavisinde kullanılan diğer bir antibiyotik ise bir makrolid grubu antibiyotik olan tilosindir. Tilosin antibiyotiği yaklaşık olarak 1970'lerde ilk olarak araştırılmıştır (Kochansky vd., 2001). *Paenibacillus* ların tetrasiklinlere karşı direnç oluşturduğu gözlemlendikten sonra, AYÇ hastalığına karşı tilosin kullanımı artırılmıştır. Tilosin yetişkin bal arılarında neredeyse toksik değildir ve bal arısı larvaları için oksitetrasiklinden daha az zehirlidir (Alippi vd, 2005). Türkiye'de veteriner ilacı olarak satılan tilosin içerikli bir çok antibiyotik kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan Tylan'ın kullanım şekli; kovan başına 200 mg. Tylan, 20 gr. pudra şekeri ile karıştırılarak kovan kapağı açıldıktan sonra çerçevelerin üzerine serpilmesi yolu ile haftada bir kez üç hafta boyunca kovana verilmesi yolu ile yapılmaktadır (URL-27; Alippi vd. (2005) tarafından yapılan önceki bir çalışmada değişik coğrafik bölgelerden izole edilen 67 *P. larvae* izolatının tilosin antibiyotiğine karşı direnç profili incellenmiş ve tüm izolatların tilosin antibiyotiğine karşı hassas oldukları herhangi bir direnç geliştirmedikleri tespit edilmiştir. Krongdang vd. (2017) yılında yaptıkları çalışmada ise tilosin antibiyotiğine karşı *P. larvae* izolatlarında direnç tespit edilmiştir. Yaptığımız tez çalışmasında tilosin antibiyotiğine karşı direnç gelişimi 18 *P. larvae* izolatında incelenmiş ve izolatların %22'sinde (4 izolat) tilosin direnci tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde de kullanılan bu antibiyotiğe karşı direnç gelişiminin olduğunu ve bu direnç gelişiminin önlenmesi hususunda önlemlerin alınması gerekliliğini göstermektedir.

Stackebrandt vd., (1995) *Kocuria varyans* suşlarının tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, oleandomisin, streptomisin ve penisilin G'ye duyarlılığını bazı suşlarda ise

direnç varlığı bildirilmiştir. Becker vd. (2008) *Kocuria rhizophila*'nın beta laktam, makrolid, glikopeptid, kinolon (norfloksasin hariç) duyarlılığını bildirilmiştir. Çalışmamızda PB 25c'nin test edilen 12 antibiyotikten 8'ine, PB 30b'nin ise 2'sine karşı direnç taşıdığı bildirilmiştir (Tablo 13). Çalışmada test edilen *S.warneri* suşlarının test edilen 12 farklı antibiyotiğe karşı oldukça duyarlı olduğu, yalnızca 2 suşun (SV24a ve SV27c) seftazidime dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan makrolid grubu bir diğer antibiyotik ise eritromisindir. Eritromisinin yavru çürüklüğü hastalıkları etkenlerine karşı etkili olduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen çok fazla kullanılan bir antibiyotik değildir (Reybroeck vd., 2012). Fakat ülkemizde özellikle Güney Marmara Bölgesi'nde arıcılıkta oldukça yoğun kullanıldığı ve bu kullanımının balda kalıntılara sebep olduğu gösterilmiştir (Gunes vd., 2009). Çalışmamızda eritromisin antibiyotiğine karşı direnç AYÇ şüphesi ile alınan tüm örneklerden izole edilen Gr pozitif bakterilerde incelenmiştir. Çalışmada izole edilen 34 *Paenibacillus* cinsine ait izolatın 10'unun, 24 *Bacillus* cinsine ait izolatın 5'inin, 5 gram pozitif kok izolatının ise 1'inin eritromisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13). Literatürde Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde arıcılıkta eritromisin kullanımına dair veriler bulunmasada bu sonuçlar bize bu bölgelerde de eritromisin antibiyotiğinin kullanımının olduğunu düşündürmektedir.

Linkomisin linkosamid grubu bir antibiyotiktir. Yapılan birçok çalışmada *P. larvae* izolatlarına karşı etkinliği gösterilmiştir. Linkomisin, tylosin ile birlikte, tetrasikline dirençli AYÇ hastalığını kontrol etmek için FDA onayı bekleyen potansiyel bir ilaç olarak görülmektedir. Linkomisinin pudra şekeri ile hazırlanan süspansiyonları bal arısı kolonilerine toz halinde uygulandığında AYÇ hastalığını kontrol etmede etkili olduğu gösterilmiştir (Feldlaufer vd., 2001; Kochansky vd., 2001; Pettis ve Feldlaufer, 2005; Reybroeck vd., 2012). Amerika Birleşik Devletlerinde son yıllarda yapılan bir çalışmada *P. larvae* izolatlarının linkomisine karşı direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Kron dang vd., 2017). Linkomisin etken maddesini içeren bir çok ilaç (linkomis-40, MİSTAV; linpectan, baVET; LİN-SPEK, vimar) Türkiye'de Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış ilaçlar içerisinde yer almakta ve küçük baş hayvan sağlığı için veteriner hekimler tarafından reçetelenmektedir. Çalışmamızda linkomisin antibiyotiğine karşı direnç oluşumu *P. larvae* izolatlarında incelenmiş ve izolatların

3'ünün (%17) linkomisin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13). Linkomisin antibiyotiğinin Türkiye'de bal arılarının tedavisi için kullanıldığına dair bir veri bulunmamaktadır. Fakat çalışmamızdaki sonuçlar açıkça göstermektedir. Arı ve arı ürünlerinden izole edilen *P. larvae* izolatları linkomisin antibiyotiğine karşı dirençlidir. Bu durum linkomisin antibiyotiğinin bilişsiz bir şekilde kullanıldığının ve direnç gelişimi açısından kullanımının kontrol altında tutulması gerektiğinin bir göstergesidir.

Bir aminoglikozit türevi olan streptomisin yavru çürüklüğü hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir diğer antibiyotiktir. Arıcılıkta streptomisin kullanımı çok belirtilmezken, 1997 yılında Çin'de meydana gelen AYÇ salgınında kullanıldığı rapor edilmiştir (Reybroeck vd., 2012). Çalışmamızda *P. larvae* suşlarında streptomisin direnci tespit edilmemiştir.

Çalışmada kullanılan gentamisin ve amikasin aminoglikozit grubunda yer alan diğer antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklerin arıcılıkta kullanımı ile ilgili herhangi bir veri literatürde bulunmamasına rağmen, yaptığımız çalışmada AYÇ şüpheli örneklerden izole edilen 64 Gram pozitif izolatın 11'inin gentamisine, 9'unun ise amikasinine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada izole edilen *P. larvae* izolatları incelendiğinde 18 izolatın 5'inin gentamisine, 3'ünün ise amikasinine dirençli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Sülfonamidler veterinerlik alanında bakteriyel ve protozoal hastalıkların kontrolü için kullanılan etkili kemoterapötik maddelerdir. Sülfo ilaçların, özellikle sülfotazolün Amerikan yavru çürüklüğü yayılımını önleyebileceği gösterildikten sonra, bal arılarının bakteriyel hastalıklara karşı korunması için sülfonamid kullanımı, ticari arıcılıkta yaygın bir uygulama haline gelmiştir (Reybroeck vd., 2012). Çalışmamızda sülfonamid grubunda yer alan trimethoprim-sülfametaksazol (SXT) direnci izole edilen 63 izolatın tümünde incelenmiştir. Yapılan antibiyogram sonucunda SXT direnci sadece 3 izolatda tespit edilmiştir. Bu izolaların 1'i *P. larvae* olarak tespit edilirken, 2'si *Bacillus* sp. olarak tespit edilmiştir (Tablo 13).

Çalışmamızda DNA sentezini inhibe eden antibiyotiklerden furazolidon, siproflaksasin ve norflaksasin sadece *P. larvae* izolatlarının üzerinde etkisi incelenmiştir.

Yapılan antibiyogram testleri sonucunda 18 izolatın 8'inde siproflaksasin ve norflaksasin direnci tespit edilirken sadece 2 izolatda furazolidon direnci tespit edilmiştir. Furazolidon geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, nitrofuran grubunda yer almaktadır. Nitrofuranlar, kümes hayvanları, domuz ve sığır çiftlikleri, balık, karides ve arı çiftlikleri için çok kullanılan veteriner antibiyotiklerinden oluşan belirli bir gruptur. Bu grupta yer alan nitrofurantoin, nitrofurazon, nifüsol ve fürtadon antibiyotiklerine göre arı hastalıklarının tedavisinde başlıca kullanılan antibiyotik furazolidondur (Khong vd., 2004; Torre vd., 2015). Literatürde AYÇ etmeni olan *P. larvae* izolatlarında furazolidon direnci ile ilgili herhangi bir bilgi yoktur. Bu çalışma bal arılarından AYÇ şüphesi ile izole edilen *P. larvae* izolatlarında furazolidon direncinin gösterildiği ilk çalışmadır (Tablo 13). Kinolon grubu antibiyotiklerin klinik kullanımlarının çoğunluğu flurokinolonlar şeklindedir. Verimliliği gösteren bilimsel verilerin eksikliğine rağmen, arıcılıkta, özellikle Asya'da flurokinolonların arı hastalıklarına karşı profilaksi olarak uygulanması son birkaç yıldır artmıştır. Bu kullanım, o bölgedeki balda kalıntıların saptanmasıyla doğrulanmıştır. Yapılan kalıntı testleri siploflaksasin ve norflaksasin gibi ana flurokinolonların balda bulunduğunu göstermiştir (Reybroeck vd., 2012). Fakat literatürde *P. larvae* izolatlarının flurokinolonlara karşı direnç geliştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada *P. larvae* izolatlarının sipraflaksasin ve norflaksasine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler yoğun kullanılan antibiyotiklerin arı ürünlerinde kalıntı oluşturmalarının yanısıra direnç gelişiminde sebep olduğunu bir kere daha göstermiştir.

Çalışmada hücre duvar yapısını bozan beta-laktam antibiyotiklerinden penisilin, ampisilin, amoksisilin-klavunolik asit, seftazolin, sefuroksim ve seftazidim antibiyotikleri kullanılmıştır. Antibiyogram sonuçları incelendiğinde tüm gruplarda en yüksek direnç seftazidime karşı tespit edilmiştir (Tablo 13).

Bu çalışmada, bal arılarının florasından izole edilen saprofit (Tablo 14) ve hastalık etmeni (Tablo 15) mikroorganizmalar çoklu antibiyotik direnci açısından incelenmiş, bir çok antibiyotik açısından çoklu direncin varlığı belirlenmiştir. Bu durum ülkemiz arıcılığında AYÇ ve AvYÇ hastalıklarında izinsiz antibiyotik kullanımını göstermez, zira uzun yıllardır AYÇ hastalığında antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır. Bu sonuç ekosistemde yaygın bulunan mikroorganizmaların bazılarında doğal olarak

antibiyotik direncinin var olmuş olacağını, bazılarının insan ekosistemiyle tanışmış olabileceğini veya farklı canlıların (balık hastalıkları yada diğer hayvan hastalıklarında) florasında buldukları süreçte antibiyotikle karşılaşmış olabileceklerini göstermektedir. Bu durum ise çevre ve toplum sağlığında antibiyotiklerin daha rasyonel kullanılması gerektiği düşünceğini pekiştirmektedir. Bu durum sadece ülkemiz ile de ilişkilendirilemez, zira ana arı gen kaynaklarının alındığı bölge, ülke ve çevresiyle de ilişkili bir sonuç olarak düşünülmesi gerekmektedir.

*P. larvae* suşlarında plazmit DNA izolasyonu ilk olarak Benada vd., (1998) tarafından rapor edilmiştir. Bunu *P. larvae* suşlarında 9 kb büyüklüğünde bir başka plazmitin varlığının Çek Cumhuriyeti'nden rapor edilmesi izlemiştir (Bodorova-Urgosikova vd., 1992). Ek olarak 9,4 ve 11 kb büyüklüğündeki plazmitlerin Almanya'dan izole edilen *P. larvae* suşlarında bulunduğu Neuendorf vd. (2004) tarafından, 4 ve 8 kb büyüklüğünde plazmitlerin Boston'dan izole edilen *P. larvae* suşlarında bulunduğu Alippi vd. (2007) tarafından, ABD ve Kanada'dan izole edilen *P. larvae* izolatlarında birçok plazmitin varlığı ise Murray ve Aronstein (2006) tarafından gösterilmiştir. Çalışmamızda ise 18 *P. larvae* izolatından plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolatların 13'ünün en az bir plazmit DNA içerdikleri tespit edilmiştir (Tablo 17).

Oksitetrasiklin ve tilosin, bal arısı kolonilerinde AFB'nin önlenmesi ve kontrolü için onaylanmış antibiyotiktirler. Bununla birlikte, oksitetrasikline dirençli *P. larvae* izolatları ABD, Kanada ve Arjantin'in bazı bölgelerinde tespit edilmiştir (Alippi vd., 2007). Çoğu bakterilerdeki tetrasiklin direnci, genellikle mobil elementler ile ilişkili yeni genlerin edinilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu genler genellikle plasmidler veya transpozonlar ile ilişkilidir ve konjugatifirler. Tetrasiklin direncine sebep olan üç ana mekanizma vardır. Bunlardan ilki antibiyotiği enerji bağımlı olarak hücre dışına pompalama, ribozomal koruma ve tetrasiklin molekülünün enzimatik inaktivasyonudur. Bugüne kadar tanımlanmış 43 farklı *tet* ve *otr* geni vardır ve bu genlerden 27'si hücre dışına pompalama, 12'si ribozomal koruma ve 3'ünün enzim inaktivasyonu ile ilgili olduğu bulunmuştur. Ayrıca 1 genin direnç mekanizmasında bilinmemektedir (Roberts, 2011). Gram pozitif bakterilerde *Bacillus* ve yakın ilişkili türlerde yalnızca *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* ve *tet(W)* determinantlarının varlığı rapor edilmiştir (Alippi vd., 2014).

Çalışmamızda tetrasiklin ve oksitetrasiklin dirençli *P. larvae* izolatlarında plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen plazmit DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 2 farklı *otr* (*otrA*, *otrB*) ve 4 farklı *tet* geni (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(W)*) PZR yardımı ile taranmıştır (Şekil 17, 18 ve Tablo 18). Yapılan çalışma sonucunda 8 oksitetrasiklin ve tetrasiklin dirençli *P. larvae* izolatının 8'sinde *tet(M)* ve 7'sinde *tet(W)* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Oksitetrasiklin dirençli 8 *P. larvae* izolatının tümünde *otrA* geninin varlığı tespit edilirken, izolatlardan sadece *P. larvae* SV28 hariç diğer tüm 7 izolatda ise *otrB* geni tespit edilmiştir.

Murray ve Aronstein (2006) yaptıkları bir çalışmada, ABD ve Kanada'dan izole edilen 36 *P. larvae* izolatında tetrasiklin ve oksitetrasiklin direncini incelenmişler ve izolatların 21'inin oksitetrasiklin dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Dirençli izolatları *tet(L)* ve *tet(K)* geni varlığı açısından incelenmişler ve izolatların 4'ünün *tet(L)* geni açısından pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Alippi vd. (2007) yaptıkları bir diğer çalışmada değişik coğrafi bölgelerden izole edilen 75 *P. larvae* izolatında *tet(K)* ve *tet(L)* direnç genlerinin varlığını incelemişler ve izolatların 4'ünün *tet(K)* direnç geni içerirken, hiçbirinin *tet(L)* direnç geni içermediklerini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise tetrasiklin ve oksitetrasiklin dirençli 8 izolat 4 farklı *tet* geni (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(W)*) varlığı açısından incelenmiştir. Çalışmamızda hiçbir izolatta *tet(K)* ve *tet(L)* direnç genlerinin varlığı tespit edilememiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar, bulaşıcı hastalıkların zaman ve mekansal dağılımını araştırır ve salgınları etkileyen faktörleri ortaya çıkarmaya çalışır. Çoğu durumda, salgına neden olan organizmalar klonal olarak ilişkilidirler ve benzer biyokimyasal ve genetik özellikleri paylaşmaktadırlar. Bu nedenle, bakteriyal alt tiplere enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde, özellikle de virülan suşların farkedilmesi ve AFB ile mücadele için kontrol programlarının izlenmesinde oldukça yararlıdır. Bu alanda, fenotipik tabanlı yazım yöntemlerinin eksiklikleri, moleküler tiplere yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır ve bakteriyal alt türleri belirlemek için bir takım moleküler tiplere yöntemleri geliştirilmiştir. Değişken Alanlı jel elektroforezi (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length polymorphism, RFLP), tekrarlayan element PZR parmak izi (repetitive element OCR fingerprinting, rep-PZR), rastgele arttırılmış polimorfik DNA (random

amplified polymorphic DNA, RAPD) ve sekanslama bu metotlardandır. Bakteriyal alt türleri belirlemek için kullanılacak yöntemin laboratuvar içinde tekrarlanabilirliği ve yüksek ayırım gücüne sahip olmalıdır. Aynı zamanda yöntemi kurmak, kullanmak ve yorumlamak kolay olmalıdır (Genersch ve Otten, 2003; Ashiralieva ve Genersch, 2006). Çalışmamızda izole edilen 18 *P. larvae* izolatının alt genotip özellikleri rep-PZR yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Bugüne kadar *P. larvae* suşlarının genetik çeşitliliğini incelemek için çeşitli moleküler çalışmalar yapılmıştır. Rep-PZR ile, bakteriyal genomda bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin PZR amplifikasyonu ile elde etmek ve bakteriyal genomların parmak izini almak mümkündür. Bu amaç için en sık uygulanan teknikler ERIC, REP ve BOX-PZR'dir. İlk rep-PZR Allippi ve Aguilar (1998) tarafından Arjantin'den izole edilen 99 *P. larvae* izolatında BOX primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda izolatlardan 3 değişik genotip tanımlanmış ve A, B, C olarak adlandırılmıştır. Genersch ve Otten (2003) yaptıkları bir diğer çalışmada ise BOX A1R ve MBO REP1 primerleri ile rep-PZR tekniği kullanarak 105 Almanya kökenli *P. larvae* izolatını incelemiştir. BOX-PZR sonucunda agaroz jelde yaklaşık 700 bp'lik bölge sırasıyla amplifikasyon ürününün varlığı, yokluğu veya iki bant oluşumuna göre genotipi A, a,  $\alpha$  olarak isimlendirmişlerdir. Aynı şekilde REP1-PZR sonucunda agaroz jelde yaklaşık 1000 bp'lik bölgede bir bandın varlığında genotip b, 1000 bp'lik bölgeden biraz daha yukarıda olan bandın varlığında ise genotip B olarak isimlendirilmiştir. REP1 ve BOX-PZR sonucunda araştırmacılar 105 *P. larvae* izolatının 4 farklı genotipte olduğunu (AB, ab, Ab,  $\alpha$ B) tespit etmişlerdir. Peters vd. (2006) yaptıkları çalışmada Almanya'nın Arnsberg Bölgesi'nden izole edilen 176 *P. larvae* izolatının rep-PZR analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar Genersch ve Otten (2003)'e ilave olarak REP1 primeri ile gerçekleştirdikleri rep-PZR sonucunda 1000 bp'lik bölgede ve az yukarısında sırasıyla herhangi bir bandın olmadığını veya iki bandında bulunduğunu tespit etmişler ve bu genotipik özelliği taşıyan izolatları  $\beta$  ve B olarak isimlendirmişlerdir. Çalışmamızda ise Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden izole edilen 18 *P. larvae* izolatının genetik çeşitliliği rep-PZR kullanılarak incelenmiştir. BOX A1R primerleri ile yapılan rep-PZR analizi sonucunda izolatların 17'sinin 700 bp'lik bölgede bir bant verdiği, 1 izolatda ise bu bölge bant olmadığı görülmüş ve izolatlar sırasıyla A ve a genotipi olarak isimlendirilmiştir (Şekil 15, Tablo 16). MBO REP1 primerleri



kullanılarak gerçekleştirilen rep-PZR sonucunda ise izolatların 2'sinde 1000 bp'lik bölgenin üzerinde, 7'sinde ise 1000 bp'lik bölgede bant görülmüş ve sırasıyla B ve b genotipi olarak isimlendirilmişlerdir. Aynı zamanda 9 izolatda ise bu bölgelerde herhangi bir bant görülmemiş ve  $\beta$  genotipi olarak isimlendirilmişlerdir. Yapılan rep-PZR sonucunda Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden izole edilen *P. larvae* izolatlarının 4 farklı genotipte (AB, A $\beta$ , ab, Ab) oldukları tespit edilmiştir (Şekil 16).

Literatürde *P. larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği ile ilgili veriler çok fazla değildir. Çalışmaların büyük bir grubu Almanya'da gerçekleştirilmiştir. Türkiye için ise yapılan bu tez çalışması bir ilktir. Neuendorf vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada Almanya'nın çeşitli bölgelerinden izole edilen *P. larvae* izolatlarının genetik çeşitliliği rep-PZR ile incelenmiş ve izolatların AB, Ab, ab, ve  $\alpha$ B olmak üzere 4 farklı genotipte oldukları tespit edilmiştir. Aynı genotipik gruplar Genersh ve Otten (2003)'ün yaptığı çalışmada da bulunmuştur. Bu çalışmalar ile benzer olarak, bizim çalışmamızda da AB, Ab ve ab genotipleri bulunmuştur, fakat  $\alpha$ B genotipi çalışmamızda tanımlanmamıştır. Peters vd. (2006)'nin yaptıkları çalışmada Almanya'nın Arnsberg Bölgesi'nden izole ettikleri 176 *P. larvae* izolatının rep-PZR analizleri sonucunda Ab, AB, A $\beta$ , ab ve a $\beta$  olmak üzere 5 farklı genotipte olduklarını bulmuşlardır. Loncaric vd. (2009) yaptıkları bir diğer çalışmada ise Avusturyanın çeşitli bölgelerinden izole ettikleri 214 *P. larvae* izolatının genetik çeşitliliğini rep-PZR ile incelemişler ve izolatların ab, a $\beta$ , Ab, AB ve  $\alpha$ b olmak üzere 5 farklı genotipte olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise Peters vd. (2006) ve Loncaric vd. (2009)'ün çalışmaları ile benzer olarak Ab, Ab, ve ab genotipleri tanımlanmıştır. Fakat araştırmacıların tanımladığı A $\beta$ , a $\beta$ , aB ve  $\alpha$ b genotipleri çalışmamızda tanımlanamamıştır. Son yıllarda Rusenova vd. (2013) yaptıkları bir diğer çalışmada ise Bulgaristan'ın çeşitli bölgelerinden izole ettikleri 96 *P. larvae* izolatının genetik çeşitliliği rep-PZR ile incelenmiş ve izolatların Ab ve ab olmak üzere 2 farklı genotipte oldukları tespit edilmiştir.

*P. larvae* izolatlarının rep-PZR yöntemi ile genetik çeşitliliklerinin incelendiği çalışmalar incelendiğinde Ab, Ab ve ab genotiplerinin tüm bölgelerden izole edildiği ve bu genotiplerin diğer genotiplere göre daha fazla tanımlandığı görülmektedir. A $\beta$ , a $\beta$ , aB ve  $\alpha$ b genotiplerinin ise tanımlandığı fakat sayısının oldukça az olduğu görülmektedir. Çalışmamızda literatürde bugüne kadar henüz tespit edilmemiş A $\beta$  genotipi tanımlanmış

ve 18 izolatın 7'sinde olduğu (%39) tespit edilmiştir (Şekil 15, 16 ve Tablo 16).

*P. larvae* izolatlarının genotipleri hakkındaki bilgiler Amerikan yavru çürüklüğü hastalığının risk değerlendirmesinde bir ülke için oldukça önemlidir. Çünkü genotip ve klinik semptomların ortaya çıkışı arasında bir korelasyon vardır (Loncaric vd., 2009). Genersch vd. (2005) yaptıkları biyoassay çalışmaları sonucunda göstermişlerdir ki; AB genotipine sahip *P. larvae* izolatları ile enfekte olmuş larvaların ölümü, diğer genotiplere sahip izolatlar ile enfekte olmuş larvalara göre daha hızlıdır. AB genotipi ile enfekte olmuş larvaların çoğu hücre sınırlamasından önce öldükleri için, hemşire arılar bunları algılayabilir ve kovandan çıkarabilir, böylece sporların üretimi azaltılabilir. Dolayısıyla, bu genotipin koloni içinde yayılması daha yavaş olur (Loncaric vd., 2009). Çalışmamız AB genotipi diğer çalışmalara göre sık tanımlanmamıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda çok yüksek oranda AB genotipi görülürken, çalışmamızda bu oran oldukça düşüktür. Bu durum coğrafik farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi örnek sayımızın azlığından da kaynaklanabilir.

## 5. ÖNERİLER

Arılar hem polinasyon hem de biyoçeşitlilik açısından dünya için ayrıcalıklı bir yer teşkil etmektedirler. Bal arıları ise bu işlevin yanı sıra önemli bir ürün çeşitliliğinin (bal, polen, propolis, arı sütü vb.) biyolojik kaynağıdır.

2017 Hayvan hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü genelgesine göre arıların AYÇ hastalığı “İhbarı Mecburi” bir hastalık olup, Avrupa birliğine üye ve ülkemiz gibi üye aday ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede antibiyotiklerin tedavi ya da koruma maksatlı kullanımı yasaktır. Dünya sağlık örgütü ve AB'nin de kalıntı konularını halk sağlığı açısından önemle izlediği göz önüne bulundurulduğundan dolayı ülkemizin de konuya daha fazla önem verilmesi, arı hastalıklarında antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemlerinin kullanılmasıyla ilgili projelerin yapılmasının yaygınlaştırılması konusu gözden geçirilmelidir.

Arı ile ilgili çalışmalar hem dünyanın üçüncü en önemli bal üreticisi olan hem de dünya endemik türlerin büyük çoğunluğunu içeren ülkemiz biyoçeşitliliği açısından önemli olup, daha fazla çalışmaların yapılması ve de yeni araştırmacıların yetiştirilmesi gerekmektedir.

AYÇ hastalığı bütün dünyada olduğu gibi ülkemiz için de önemli bir sorundur. Bu alanda yeni çalışmaların yapılması, prevalans ve insidansın ortaya konması gerekmektedir. Hastalığın yayılış kaynaklarının belirlenmesi, kontamine kaynakların çevreye yayılmasının önlenmesi açısından etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerle tanımlanması ve biyotiplerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar bulaş kaynaklarını ve kökenini ortaya koymaya farklı ülkelerle olan ilişki ve benzerliklerini görmeye yardımcı olacaktır. Bu durum arı ve arı ürünlerinin ihracatında ülke çıkarlarına dünya ülkelerindeki durumdan farklı olmadığımızı göstererek, güç kazanmamıza katkı sağlayacaktır.

Antibiyotik çalışmaları ve antibiyotik direnci içeren saprofit ve patojen mikroorganizmaların belirlenmesi, arıcıların antibiyotik kullanmış olabileceklerini tam anlamıyla ortaya koymaz ancak fikir verir. Bu durumun kesinleştirilmesi için arı

örnekleri alındığı üreticinin kendi vücut florasından, arıları gezdirdiği veya konaklattığı alanların çevresel örneklerinden örnekleme yapılarak doğru bilgiye ulaşılması gerekmektedir. Bu çalışma çevresel direnç yayılımını ve yanlış antibiyotik kullanımının önlenmesi, arıcıların ekonomik kayıplara uğramasının engellenmesi açısından da önemlidir.

Arıcılıkta yaygın şekilde kullanılan tilosin antibiyotiğine karşı %22 direnç tespit edilmiş olup *P.larvae*'lerde tilosin kullanımı konusundaki gidişatın tekrar gözden geçirilmelidir.

Tetrasiklin direnci artmakta olup (çalışmamızda %44 bulundu) bu konuda daha rasyonel tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Çalışmamızda izole edilen ancak cins düzeyinde tanımlanan suşların farklı moleküler yöntemlerle detaylı araştırılması yeni türlerin kayda girmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

Antibiyotiklerin kullanımında çevresel orjinli direnç gelişimine neden olmayacak tedbirlerin alınması (hem insan hem de hayvansal kaynaklı) gerekmektedir.

*P. larvae*'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ülkemizde ilk olarak bu çalışma ile yapılmış olup; çalışma materyallerinin arttırılarak ülke prevalansının belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü genotip dağılımı ile hastalık etkeni ve klinik semptomları arasında bir korelasyon vardır ve bu korunma yöntemleri için bilinmesi zorunludur.

Çalışmamızda *P. larvae*'nin genetik çeşitliliği belirlenmiş, literatürde bugüne kadar henüz tespit edilmemiş Aβ genotipi tanımlanmıştır. Bu çalışmaların daha fazla örnekle yapılması durumunda daha önce bulunan genotiplerin tümünün varlığı ya da yeni genotiplerin ortaya çıkması sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmada elde edilen hastalık etkeni suşlar ile bir mikrobiyolojik gen havuzu oluşturulmuştur. Bu çalışmaların devam ettirilmesi ve hastalık etkeni mikroorganizmaların daha fazla izolasyonunun elde edilmesi ve stoklanması gerekmektedir.

Bu alanda ulusal vizyonla bakıp bakanlık nezdinde bir suş koleksiyonu oluşturulması ülke çıkarları açısından önemli olacaktır. Elde edilen ve koleksiyonda saklanan suşlarla daha geniş çapta tedaviye yönelik yeni araştırmaların yapılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geleneksel tanı yöntemlerinde çalışmamızda olduğu gibi manuel yapılmış olup her zaman monitörize yöntemlere göre daha fazla hata payı vardır. Çok sayıda *P. larvae* izole edilip, genetik çeşitliliği belirlendikten sonra genotipler ile biyokimyasal özellikler arasında ne gibi bir ilişki var olup olmadığı ortaya konmalıdır. Çünkü bu alanda yeterince kesin sonuçlar literatürde de çok az ve bazı farklılıklar mevcuttur.

Bu alandaki yeni çalışmaların dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastalığın (AYÇ) kontrolü için yeni stratejiler bulmakla ilgili olması önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Albayrak, S. ve Albayrak, S., 2008.** Propolis: Doğal antimikrobiyal madde. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 37 (3), 201 – 215.
- Alippi, A. M., Leon, I. E. and Lopez, A. C., 2014.** Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. International Microbiology, 17, 49-61.
- Alippi, A. M., Lo'pez, A. C., Reynaldi, F. J., Grasso, D. H. and Aguilar, O. M., 2007.** Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. Veterinary Microbiology, 125 (3–4), 290–303.
- Alippi, A. M., Albo, G. N., Reynaldi, F. J. and De Giusti, M. R., 2005.** In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. Veterinary Microbiology, 109, 47–55.
- Alippi, A. M., 2000.** Is terramycin losing its effectiveness against AFB. Bee Biz, 11,27-29.
- Alippi, A. M., 1999.** Bacterial diseases. CIHEAM. Options Mediterraneennes.
- Alippi, A. M. and Aguilar, O. M., 1998.** Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. Journal of Invertebrate Pathology, 72, 21–27.
- 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.
- Alpay Karaoğlu, Ş., Yılmaz, Y., Tosun, G., Bozdeveci, A. ve Uzunalioğlu E., 2014.** Bal peteklerinden izole edilen sporlu basillerin karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıkları, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran.
- Alvarado, I., Phui, A., Elekonich, M. M. and Abel-Santos, E., 2013.** Requirements for in vitro germination of *Paenibacillus larvae* spores. Journal of Bacteriology, 195 (4), 1005–1011.
- Anjum, A. H. S., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim, M. K., Ansari, M. J. and Bin, L., 2017.** Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. Saudi Journal of Biological Sciences, 24, 175-180.
- Anonim, 2001.** YAYÇEP-Arıcılık, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Serisi. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Yayın no:33, Ankara, Türkiye.
- Anonymous, 2007.** Foul Brood Disease of Honey Bees. Recognition and Control. Defra, London.

- Antunez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E. and Zunino, P., 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.
- Arbia, A. and Babbay, B., 2011.** Management strategies of honey bee diseases. *Journal of Entomology*, 8 (1), 1-15.
- 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.
- Ashiralieva, A. and Genersch, E., 2006.** Reclassification, genotypes, and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review. *Apidologie*, 37(4), 411–420.
- 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.
- Bailey, L. and Ball B. V., 1991.** *Honey Bee Pathology*, Academic Press, London, Second Edition.
- Bailey, L., 1983.** *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bee (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 65-69.
- Balkaya, İ., Gülbaz, H., Avcıoğlu, H. ve Güven, E., 2016.** Türkiye’de Görülen Bal Arısı (*Apis mellifera*) Hastalıkları. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2016; 11 (3): 339-347.
- Bamrick, J. F., 1967.** Resistance to American foulbrood in honey bees. VI. Spore germination in larvae of different ages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9, 30-34.
- Becker, K., Rutsch, F., Uekötter, A., Kipp, F., König, J., Marquardt, T., Peters, G. and von Eiff, C., 2008.** *Kocuria rhizophila* adds to the emerging spectrum of micrococcal species involved in human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3537–3539.
- Benada, O., Drobnikova, V., Kalachova, L. and Ludvik, J., 1988.** Plasmid DNA in *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research*, 27(1), 35–39.
- Bilgehan, H., 2004.** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları, 4.Baskı.
- Bodorová-Urgošíková, J., Benada, O. and Tichý, P., 1992.** Large-scale isolation and partial characterization of plasmid DNA from *B. larvae*. *Folia Microbiologica*, 37, 82–86.
- Bogdanov, S., 2009.** *Beeswax: Production, properties composition and control*. Bee

Produt Science, Beeswax Book, Chapter 2.

- Borum, A. E., Özakın, C., Güneş, E., Aydın, L., Ülgen, M. ve Çakmak, İ., 2015.** The investigation by PCR and culture methods of foulbrood diseases in honey bees in South Marmara Region. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21, 95-99.
- Breed, R. S., Murray E. G. D. and Smith N. R., 1957.** *Bacillaceae*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, ISBN: 57-11183, 1094 s.
- Carpana, E., Marocchi, L. and Gelmini, L., 1995.** Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, 26, 11-16.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W., 1986.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Company. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (ed.), 1105–1139.
- Cohen, I., Ron, I. G. and Ben-Jacob, E., 2004.** From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 286, 321-336.
- Colter, D., 2000.** An update on resistant American foulbrood disease in Alberta. In: *Alberta Bee News*, September 2–4.
- Crailsheim, K. and Riessberger-Galle, U., 2001.** Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, 32: 91–103.
- 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.
- Ergün, N., 2003.** Arıcılık. Hasad yayıncılık LTD. ŞTİ., ISBN-975-8377-26-4, 119 s.
- EUCAST, 2016.** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0.



- Evans, J. D. and Armstrong, T. N., 2006.** Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*, 6, 4.
- Evans, J. D., 2004.** Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 105–111.
- FAOSTAT, 2013.** Food and Agriculture Organization of United Nations, FAOSTAT-Agriculture.
- Feldlaufer, M. F., Pettis, J. S., Kochansky, J. P. and Stiles, G., 2001.** Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie*, 32 (6), 547–554.
- FDA-CVM, 2016.** US. Food and Drug Administration-Center for Veterinary Medicine.
- 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.
- 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., 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 Argentina. *Bulletin of Insectology*, 61 (1),1-4.
- Genersch, E., 2010.** American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 10-19.
- Genersch, E., Evans, J. D. and Fries, I., 2010.** Honey bee disease over-view. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 2-4.
- Genersch, E., Ashiralieva, A. and Fries, I., 2005.** Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7551– 7555.
- Genersch, E. and Otten, C., 2003.** The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*, 34, 195–206.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Stenico, V., Alberoni, D., Buglione, E., Lilli, A., Di Gioia, D. and Porrini, C., 2015.** Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bulletin of Insectology* 68 (2), 321-327.

- Gilliam, M. and Morton, H. L., 1978.** Bacteria belonging to genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-d and antibiotics. *Apidologie*, 9,213-221.
- Gilliam, M., 1997.** Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1–10.
- 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.
- Gunes, M. E., Gunes, N. and Cibik, R., 2009.** Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from Southern Marmara Region in Turkey. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (2), 163-167.
- Guzmana, Z. M., Cervanciab, C. R., Dimasuaya, K. G. B., Tolentinoa M. M., Abbreraa 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 foulbrood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. *Applied Radiation and Isotopes*, 69 (10), 1374–1379.
- Hall, T. A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/NT. *Nucleic Acids Symp*, 41, 95-98.
- Hansen, H. and Brodsgaard C. J., 1997.** The spread and control of American foulbrood. *Bees for Development Journal*, 76, 12-13.
- Jelinski, M., 1985.** Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie* 16, 69-76.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A. and Allsopp, M. H., 2003.** Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84, 96–103.
- Kandemir, İ., 2010.** Pratik Arıcılık Bilgileri. Temel Petek Arıcılık Evi, 106 s.
- Khong, S. P., Gremaud, E., Richoz, J., Delatour, T., Guy, P. A., Stadler, R. H. and Mottier, P., 2004.** Analysis of matrix-bound nitrofurantoin residues in worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (17), 5309–5315.
- Kılıç, A., Şimşek H. ve Kalender, H., 2010.** Amerikan yavru çürüklüğü hastalığı etkeni (*Paenibacillus larvae*)’nin PCR ve kültür ile teşhisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* ,16 (5): 841-845.
- Kochansky, J., Knox, D. A., Feldlaufer, M. and Pettis, J. S., 2001.** Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*, 32, 215-222. DOI:

10.1051/apido:2001123.

- 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.
- Krongdang, S., Evans J. D., Pettis J. S. and Chantawannakul, P., 2017.** Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. PLOS ONE, 1-16.
- Lal, S. and Tabacchioni, S., 2009.** Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*. Indian Journal of Microbiology, 49, 2-10.
- 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.
- Lodesani, M. and Costa, M., 2005.** Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. Bee World, 86, 102–109.
- Loncaric, I., Derakhshifar, I., Oberlerchner, J. T., Köglberger, H. and Moosbeckhofer, R., 2009.** Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. Journal of Invertebrate Pathology, 100 (1), 44-46.
- Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Piessens, J. and Goossens, H., 2005.** Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 4798 – 4800.
- Masco, L., Van Hoorde, K., De Brandt, E., Swings, J. and Huys, G., 2006.** Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58, 85-94.
- MAYBİR, 2014.** Arı Sağlığı ve Hastalıkları. Muğla, Türkiye, 12 s.
- Mckee, B. A., Djordjevic S. P., Goodman R. D. and Hornitzky M. A., 2003.** The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie, 34, 19–27.
- McSpadden Gardener, B. B., 2004.** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* in Agricultural Systems. Phytopathology, 94, 1252-1258.
- Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S. and Doi, R. H., 2000.** Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. Journal of Invertebrate Pathology, 75, 95–96.
- 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 of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1521-1526.
- Morse, R. A. and Flottum, K., 1997.** Honey Bee Pests, Predators and Diseases. Third Edition, Published by the A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA.
- Morse, R. A. and Nowogrodzki, R., 1990.** Honey Bee Pests, Predators and Diseases. 2nd Ed. Cornstock Publishing Associates, London, 474.
- Murray, K. D. and Aronstein, K. A., 2006.** Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *Journal of Apicultural Research*, 45, 207–214.
- Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G. and Genersch, E., 2004.** Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology*, 150, 2381–2390.
- Nikolakopoulou, T. L., Egan, S., Van Overbeek, L. S., Guillaume, G., Heuer, H., Wellington, E. M. H., Van Elsas, J. D., Collard, J. M., Smalla, K. and Karagouni, A. D., 2005.** PCR detection of oxytetracycline resistance genes *otr(A)* and *otr(B)* in tetracycline-resistant *Streptomyces* isolates from diverse habitats. *Current Microbiology*, 51, 211–216
- Nizar, H., Alaa, A. T., Nouredine, A., Fares, K. and Quddoumi, S., 2015.** Diagnosis of *Paenibacillus larvae* from Honeybees in Jordan According to Microbiological and Chemicals Techniques. *Asian Journal of Animal Sciences*, ISSN 1819-1878, DOI: 10.3923/ajas.2015.
- 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 of Clinical & Laboratory Science*, 38, 393-400.
- 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 incelenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 27-30.
- Parvanov, P., Russenova, N. and Dimov, D., 2006.** Control of American foulbrood disease without antibiotic use. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3 (1),97-103.
- Peng, C. Y. S., Mussen, E. C., Fong, A., Montague, M. A. and Tyler, T., 1992.** Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60,127–133.
- Peng, Y. S. and Peng K. Y., 1979.** A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for

- American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 33, 284-289.
- Peters, M., Kilwinski, J., Beringhoff, A., Reckling, D. and Genersch, E., 2006.** American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North RhineWestphalia). *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53, 100–104.
- Pettis, J. and Feldlaufer, M. F., 2005.** Efficacy of tylosin and lincomycin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*, 44 (3), 106–108.
- Piccini, C. and Zunino, P., 2001.** American foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxitetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 176–177.
- Pohorecka, K., Skubida, M., Bober, A. and Zdańska, D., 2012.** Screening of *Paenibacillus larvae* spores in apiaries from Eastern Poland. Nationwide survey. Part I. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 539-545. DOI: 10.2478/v10213-012-0095-0.
- Pohorecka, K. and Bober, A., 2008.** Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in honey samples domestic apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 52(2), 105-111.
- Reybroeck, W., Daeseleir, E., De Brabander, H. F. and Herman, L., 2012.** Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*, 158:1–11. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.01.012.
- Reynaldi, F. J., Albo, G. N. and Alippi, A. M., 2008.** Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Veterinary Microbiology*, 132(1-2), 119-28.
- Rhodehamel, E. J. and Harmon, S. M., 1995.** *Bacillus cereus*. In: *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual*, eighth ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, pp. 14.01–14.08
- Roberts, M.C., 2011.** Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2, 40. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00040.
- Roma'n -Ponce, B., Wang, D., Va'squez-Murrieta, M. S., Chen, W. F., Estrada-de los Santos, P., Sui, X. H. and Wang, E. T., 2016.** *Kocuria arsenatis* sp. nov., an arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laevis* grown on high-arsenic-polluted mine tailing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1027-1033. DOI 10.1099/ijsem.0.000830
- Rusenova, N. V., Parvanov, P. and Stanilova, S., 2013.** Development of multiplex PCR for fast detection of *Paenibacillus larvae* in putrid masses and in isolated

bacterial colonies. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49 (1), 79–84.

**Savini, V., Catavitello, C., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Bianco, A., Febbo, F., D’Amario, C. O. and D’Antonio D., 2010.** Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1395–1402.

**Sevim, E., Baş, Y., Çelik, G., Pınarbaş, M., Bozdeveci, A., Özdemir, T., Akpınar, R., Yaylı, N. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2017.** Antibacterial activity of bryophyte species against *Paenibacillus larvae* isolates. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41, 521-531.

**Schuch D. M. T., Madden R. H. and Sattler A., 2001.** An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research*, 40 (2), 59–64.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2 edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

**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.

**Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. and Schumann, P., 1995.** Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 682–692.

**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 Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

**Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E. and Gutnick, D.L., 1999.** *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 239-246.

**Thompson, H. M., Wilkins, S., Battersby, A. H., Waite, R. J. and Wilkinson, D., 2007.** Modelling long-term effects of IGRs on honey bee colonies. *Pest Management Science*, 63, 1081-1084.

**Torre, C. A. L., Blanco, J. E., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F. and Conte Júnior, C. A., 2015.** Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-9.

**TUİK, 2016.** Hayvancılık İstatistikleri. Ankara, Türkiye.

**URL-1, 2017.** [http://www.ankaratb.org.tr/lib\\_upload/80\\_D%C3%BCnyada%20ve](http://www.ankaratb.org.tr/lib_upload/80_D%C3%BCnyada%20ve)

[%20T% C3%BCrkiye%20ARICILIK\\_10\\_03\\_2010.pdf](#) (05 Mayıs 2017).

**URL-2, 2017.** <http://samsun.tarim.gov.tr/Belgeler/Yayinlar/Kitaplarimiz/aricilik.pdf> (06 Temmuz 2017).

**URL-3, 2017.** <http://www.bak-karbal.com/24-ari-ve-aricilik-hakkinda-bilgiler/aricilik/8-tarih%C3%A7esi-2.html> (06 Temmuz 2017).

**URL-4, 2017.** <http://www.baybir.org/icerik/33/dunyada-aricilik.html> (05 Mayıs 2017).

**URL-5, 2017.** <http://isparta.tarim.gov.tr/Belgeler/Faydal%C4%B1%20BilgilerHayvansal%20Yeti%C5%9Ftiricilik/Ar%C4%B1c%C4%B1%20Bal%20Ar%C4%B1s%C4%B1.pdf> (04 Haziran 2017).

**URL-6, 2017.** <http://www.gencziraat.com/Arıcılık/Bal-Arılarının-Taksonomisi-Vu-cut-Yapıları-ve-Gelişme-Dönemleri-7.html> (20 Haziran 2017).

**URL-7, 2017.** <http://www.farmingplan.com/honey-bee-life-cycle/> (10 Temmuz 2017).

**URL-8, 2017.** <http://www.ibb.gov.tr/trTR/kurumsal/Birimler/VeterinerHizmetleriMd/Documents/AriYetistiriciligiEgitimi/BalArisininMorfolojikveFizyolojikOzellikleri.pdf> (06 Temmuz 2017).

**URL-9, 2017.** <https://www.slideshare.net/alikorkmaznet/06-ar-biyolojisi> (06 Haziran 2017).

**URL-10, 2017.** <http://veteriner.istanbul.edu.tr/wp-content/uploads/2015/04/BAL-VE-D%C4%B0%C4%9EER-ARICILIK-C3%9CR%C3%9CN%C3%9C-GIDALAR.pdf> (22 Haziran 2017).

**URL-11, 2017.** [http://gida.ibb.istanbul/img/16492727122016\\_2392236591t.pdf](http://gida.ibb.istanbul/img/16492727122016_2392236591t.pdf) (01 Temmuz 2017).

**URL-12, 2017.** [http://www.balder.org.tr/sunumlar/AUSUE\\_Semineri\\_Prof\\_Dr\\_OguzOzturk\\_sunumu\\_\(No\\_13\).pdf](http://www.balder.org.tr/sunumlar/AUSUE_Semineri_Prof_Dr_OguzOzturk_sunumu_(No_13).pdf) (07 Temmuz 2017).

**URL-13, 2017.** <http://apitherapy-project.eu/pdf/APITHERAPYcourse-TR.pdf> (06 Haziran 2017).

**URL-14, 2017.** <http://veteriner.istanbul.edu.tr/wp-content/uploads/2015/04/BAL-VE-D%C4%B0%C4%9EER-ARICILIK-%C3%9CR%C3%9CN%C3%9C-GIDALAR.pdf> (18 Mayıs 2017).

**URL-15, 2017.** <http://www.marmarisbalevi.com.tr/tr/ari-urunleri> (01 Temmuz 2017).

**URL-16, 2016.** <http://saybir55.com/aribank.htm> (03 Aralık 2016).

**URL-17, 2017.** [http://megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller/Ar%C4%B1%20Sağ%C4%B1n%20Hastal%C4%B1klar%C4%B1.pdf](http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Ar%C4%B1%20Sağ%C4%B1n%20Hastal%C4%B1klar%C4%B1.pdf) (04 Mayıs 2017).

- URL-18, 2017.** <http://www.tgw1916.net/Bacillus/larvae.html> (04 Nisan 2017).
- URL-19, 2017.** [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/BEES-EN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BEES-EN.pdf). (18 Mayıs 2017).
- URL-20, 2017.** <http://www.anzerbali.com/aricilik/ari-hastaliklari/> (20 Haziran 2017).
- URL-21, 2017.** [http://www.veteriner.cc/ari/amerikan\\_yavru\\_curuklugu.asp](http://www.veteriner.cc/ari/amerikan_yavru_curuklugu.asp) (22 Haziran 2017).
- URL-22, 2017.** [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%9E++Dr.+Ay%C5%9Fen+BEYAZI+T+\(Uzman+Veteriner+Hekim\)+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%9E++Dr.+Ay%C5%9Fen+BEYAZI+T+(Uzman+Veteriner+Hekim)+M.Arda+SEY%C4%B0SO%C4%9ELU+(Veteriner+Hekim)) (27 Mart 2017).
- URL-23, 2017.** [http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/\\_gkgm/balarilarininamerikanyavru\\_curugu\\_hast\\_mucadele\\_koruma\\_talimati.pdf](http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/_gkgm/balarilarininamerikanyavru_curugu_hast_mucadele_koruma_talimati.pdf) (20 Mayıs 2017).
- URL-24, 2017.** <http://bolbal14.com.tr/icerik/8/17/ari-hastaliklari> (19 Temmuz 2017).
- URL-25, 2017.** <http://forum-discutii.apiardeal.ro/index.php?topic=4196.0> (18 Mayıs 2017).
- URL-26, 2017.** <http://www.uyduharita.org/karadeniz-bolge-haritasi/> (18 Temmuz 2017).
- URL-27, 2017.** <http://balarisi.org/?topic=arilar-da-amerikan-yavru-curuklugu> (13 Temmuz 2017).
- Uygur, Ş. Ö. ve Girişgin, A. O., 2008.** Bal arısı hastalık ve zararlıları. Uludağ Arıcılık Dergisi, 8(4), 130-142.
- ÜTB, 2014.** Ünye Ticaret Borsası. Arıcılık ve Bal Raporu. Ordu, Türkiye, 11 s.
- Vallat, B., Edwards, S. and O'Neill, B., 2012.** Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, 1, 365-380.
- Wang, M., Zhao, W. Z, Xu, H., Wang, Z. W. and He, S. Y., 2015.** *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. European Journal of Entomology. 112, 619–624.
- Yarılgaç, E. Ş., 2016.** Ordu Yöresi Bal Arılarının (*Apis Mellifera*) Bakteriyal Florası. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, Türkiye, 93s.
- Yoshiyama, M. and Kimura, K., 2009.** Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology, 102, 91–



**You, Y., Hilpert, M. and Ward, M. J., 2012.** Detection of a common and persistent tet(L)-carrying plasmid in chicken-waste-impacted farm soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3203–3213.

**Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H. and Genersch, E., 2008.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10, 1612–1620.



## ÖZGEÇMİŞ

Müberra PINARBAŞ, 29/12/1988 tarihinde Rize/ Pazar’da doğdu. İlköğretimini Sivrikale İlkokulu’nda, ortaöğretimini Pazar Atatürk İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini Pazar Atatürk (YDA) Lise’sinde tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimine hala devam etmektedir.

### Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

**Sevim, E., Baş, Y., Çelik, G., Pınarbaş, M., Bozdeveci, A., Özdemir, T., Akpınar, R., Yaylı, N. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2017.** Antibacterial activity of bryophyte species against *Paenibacillus larvae* isolates. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 41, 521-531.

**Alpay Karaoğlu, Ş., Bozdeveci, A., Pınarbaş, M., Tarakçı, C. ve Veyisoğlu G., 2017.** The biocontrol activity of *Trichoderma atroviride* ID20G against to biotic stress of *Rhizoctonia solani* B227 in bean development. 1.Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi, Manisa, 3-5 Temmuz, 153.

**Alpay Karaoğlu, Ş., Bozdeveci, A., Pınarbaş, M., Tarakçı, C., Veyisoğlu G. ve Demirci, E., 2017.** The biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* ID11D against to biotic stress of *Rhizoctonia solani* B227 in bean development. 1.Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi, Manisa, 3-5 Temmuz, 172.

**Alpay Karaoğlu, Ş., Kasap, Y., Veyisoğlu G., Pınarbaş, M., Tarakçı, C. ve Demirci, E., 2017.** Identification and pathogenic characterization of *Fusarium* species isolated from root rot of tomatoes in Rize. 1.Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi, Manisa, 3-5 Temmuz, 171.

**Alpay Karaoğlu, Ş., Kasap, Y., Veyisoğlu G., Pınarbaş, M., Bozdeveci, A. ve Tarakçı, C., 2017.** Isolation, identification and biocontrol activity of *Trichoderma* species in a vegetable garden. 1.Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi, Manisa, 3-5 Temmuz, 160.

**Alpay Karaoğlu, Ş., Bozdeveci, A., Pınarbaş, M., Tarakçı, C. ve Veyisoğlu G., 2017.** The biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* ID11C against to biotic stress of *Rhizoctonia solani* B227 in bean development. 1.Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi, Manisa, 3-5 Temmuz, 153.

**Pınarbaş, M., Sevim, E., Akpınar, R., Sevim, A. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2016.** Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden Amerikan Yavru Çürüklüğü Şüpheli Larva ve Bal Örneklerinden *Paenibacillus larvae* İzolasyonu İdentifikasyonu ve Antibiyotik

Direnç Profillerinin Belirlenmesi. 5. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, 1-5 Kasım, 317.

**Sevim, E., Sevim, A., Pınarbaş, M., Akpınar, R. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2016.** Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden İzole Edilen *Paenibacillus larvae* Suşlarının Genetik Çeşitliliği. 5. Uluslar Arası Muğla arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, 1-5 Kasım, 65.

**Tosun, G., Alpay Karaoğlu, Ş., Pınarbaş, M. ve Yaylı, N., 2015.** Yeni Sülfonamid Sübstüte Kalkon Bileşiklerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivite Özelliklerinin İncelenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos, 384.

