

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bal Arısı ve Bal Arısı Ürünlerinden *Lactobacillus kunkeei*
İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Merve AKSOY

Zootekni Anabilim Dalı

Ocak, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Bal Arısı ve Bal Arısı Ürünlerinden *Lactobacillus kunkeei*
İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Merve AKSOY

Zootečni Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 29/01/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN (Danışman)
: Doç. Dr. Dilek TEKDAL
: Dr. Öğr. Üyesi Fatmagün AYDIN

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-14388

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
GİRİŞ	1
1.1. Bal Arısı ve Biyolojisi.....	1
1.2. Bal Arısı ve Arıcılığın Tarihçesi	2
1.3. Bal Arısının Önemi	3
1.4. Dünyada Bal Arısı Yetiştiriciliği.....	5
1.5. Türkiye’de Bal Arısı Yetiştiriciliği	5
1.6. Arı Hastalıkları ve Zararlıları	6
1.6.1. Arı Hastalıkları	6
1.6.2. Arı Zararlıları.....	8
1.7. Bal Arılarının Mikrobiyolojisi.....	8
1.7.1. Bal Arılarında Bulunan Laktik Asit Bakterileri.....	9
1.7.2. Bal Arılarında Laktik Asit Bakterilerinin Rolü ve Önemi.....	10
1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi	12
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3.MATERYAL VE METOT	19
3.1.Materyal	19
3.1.1. Bakteri ve Büyüme Ortamları.....	19
3.2.1. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler	19
3.1.3. Aletler	19
3.1.4. Bal Arısı ve Arı Ürünleri	20
3.2. Metot	20
3.2.1. Baldan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu	20
3.2.2. Polenden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu	22
2.2.3. Arıların Bal Midesinden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu.....	22
3.2.4. İzolatların Katalaz Testi	23
3.2.5. İzolatların Gram Boyaması	24
3.2.6. İzolatların 16S rRNA Sekans Analizi ile Tür Tayini	25
3.2.7. Gliserol Stok Hazırlama ve Bakterilerin Muhafazası.....	27

3.2.8. İzolatların Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.9. Antibiyogram Testi	27
3.2.10. Plazmid DNA İzolasyonu	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Örneklerin Toplanması ve Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	29
4.2. İzolatların Kısmi Karakterizasyonu	29
4.2.1. İzolatların Gram Boyaması	29
4.3. İzolatların Genotipik Karakterizasyonu	30
4.3.1. İzolatlardan Plazmid DNA İzolasyonu	41
4.4. Suşların Enzim Aktiviteleri	41
4.5. Antibiyogram Testi	41
4.6. Tartışma.....	43
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	57

**Bal Arısı ve Bal Arısı Ürünlerinden *Lactobacillus kunkeei*
İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Merve AKSOY

Danışman: Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Zootečni Anabilim Dalı

ÖZ

Bal arıları, insan gıdası ve bazı farmasötik ürünlerin üretiminde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, polinasyona olan büyük katkısı sebebiyle yeryüzünde yaşamın sürdürülebilmesinde de oldukça önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte, nosema ve varroa gibi bir takım arı hastalık ve zararlıları dünyadaki bal arısı varlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Bal arılarının vücut kısımlarında bulunan ve probiyotik özellik gösterdiği bilinen *Lactobacillus kunkeei* (*Apilactobacillus kunkeei*) bakterisinin bu hastalıkların etmeni olan patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. Bu tez çalışması kapsamında bal arısı ile polenden *L. kunkeei* bakterisinin izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan kovanlardan toplanan bal arılarının (*Apis mellifera italica*) midelerinden 42, polen örneklerinden ise 2 adet olmak üzere toplam 44 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Gram boyamaları sonucunda tüm isolatlar Gram (+) olarak belirlenmiştir. Mikroskopik incelemeler tüm isolatların basil hücre morfolojisine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca yine tüm isolatlar katalaz testinde negatif sonuç üretmişlerdir. 16S rRNA sekansı belirlenen 5 adet izolattan 2 tanesi %100, 2 tanesi %99.92, 1 tanesi de %99.79 oranlarında *L. kunkeei* bakterisi ile benzerlik göstermiştir. Tez kapsamında elde edilen isolatların probiyotik ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi ile bu isolatlar arı bağışıklık sistemini destekleyici preparatların hazırlanmasında potansiyel kaynak olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Bal, Bal arısı, İzolasyon, *Lactobacillus kunkeei*, Polen.

**Isolation and Characterization of *Lactobacillus kunkeei*
from Honey Bee and Honey Bee Products**

Merve AKSOY

Advisor: Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Department of Animal Science

ABSTRACT

Honey bees play a crucial role not only in the production of human food and certain pharmaceutical products but also in sustaining life on Earth due to their significant contribution to pollination. However, various bee diseases and pests, such as Nosema and Varroa, pose serious threats to bee populations worldwide. It is known that *Lactobacillus kunkeei* (*Apilactobacillus kunkeei*), a bacterium found in various parts of honey bees' bodies, exhibits probiotic properties and shows antimicrobial effects against pathogens responsible for these diseases. This thesis aims to isolate and partially characterize *L. kunkeei* bacteria from honey bees and their products, such as honey and pollen. A total of 44 lactic acid bacterial isolations were carried out, including 42 from the stomachs of honey bees (*Apis mellifera italica*) collected from hives at the Research and Application Farm of Çukurova University Faculty of Agriculture, and 2 from pollen. Gram staining revealed that all isolates were Gram-positive. Microscopic examinations indicated that all isolates had a bacillus cell morphology. Furthermore, all isolates tested negative in the catalase test. Among the 5 isolates for which the 16S rRNA sequence was determined, 2 showed 100% similarity, 2 showed 99.92%, and 1 showed 99.79% similarity to *L. kunkeei*. The determination of probiotic and antimicrobial properties of the isolates obtained within the scope of the thesis could potentially serve as a source for the preparation of supplements supporting the bee immune system.

Keywords: Honey, Honey bee, Isolation, *Lactobacillus kunkeei*, Pollen.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmamın her aşamasında beni her konuda destekleyen ve hiçbir bilgi ve deneyimini esirgemeyip bana rehberlik eden danışman hocam sayın Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından ve manevi desteklerinden dolayı sayın hocam Yüksek Biyolog Elif DİKKAYA, değerli arkadaşlarım yüksek lisans öğrencileri Merve BOSTANCI, Aslı ÖZGÜR'e ve diğer mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında izolatların Gram boyamaları ve mikroskop görüntülerinin alınması aşamasında değerli yardımlarını ve laboratuvar imkânlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e ve doktora öğrencisi Esra YİĞİTTEKİN'e de teşekkürlerimi borç bilirim.

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne tez çalışmama maddi desteğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, desteklerini hiç esirgemeyen, varlıklarından güç aldığım aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan universal primerler	26
Çizelge 3.2. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan PCR reaksiyonu bileşenleri.....	26
Çizelge 3.3. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan PCR reaksiyonu.....	26
Çizelge 4.1. İzole edilen laktik asit bakterileri ve izolasyon kaynakları.....	29
Çizelge 4. 2. İzolatların gram boyama sonuçları.....	29
Çizelge 4. 3. İzolatların katalaz testi sonuçları.....	30
Çizelge 4.4. MA2 izolatına ait 16S rRNA sekansı.....	31
Çizelge 4. 5. MA3 izolatına ait 16S rRNA sekansı.....	32
Çizelge 4. 6. MA5 izolatına ait 16S rRNA sekansı.....	33
Çizelge 4. 7. MA43 izolatına ait 16S rRNA sekansı.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir İşçi Arının Hayat Evresi (Gurung ve ark., 2012).....	2
Şekil 1.2. Bal Arısının Sindirim Sistemi Anatomisi (Anderson ve ark., 2011).	8
Şekil 3.1. Laktik Asit Bakterileri Ekilmiş MRS Agar Plaklarının Desikatör İçerisinde Anaerobik Koşullarda İnkübasyonu	19
Şekil 3.2. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği Arıcılık Ünitesi'nde Bulunan Kolonilerden Bal Arısı Örneklerinin Toplanması	20
Şekil 3.3. Kolonilerden Toplanan Bal Arısı Örneklerinin Pepton-Nacl Solüsyonu İçeren Tüplerde Muhafazası	20
Şekil 3.4. Bal Örneklerinin Steril Öze Yardımıyla MRS Agar Plaklarına Yayılması	21
Şekil 3.5. Bal Örnekleri Yayılmış ve Kurumaya Bırakılmış MRS Agar Plakları	21
Şekil 3.6. Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu Yapılan Arı ve Bal Midesi	23
Şekil 3.7. İzolatların Hidrojen Peroksit İle Katalaz Testi	24
Şekil 3.8. Bakterilerin Gram Boyama İçin Lamlar Üzerinde Distile Su ile Seyreltilmesi (A) ve Boyama Sonrası Kurumaya Bırakılması (B).	25
Şekil 3.9. Gram Boyanan İzolatların Mikroskopik İncelemesi	25
Şekil 3.10. Bakteri Ekimleri Yapılmış Ve Antibiyotik Diskleri Yerleştirilmiş MRS Agar Plakları	28
Şekil 4.1. Bazı <i>L. kunkei</i> izolatlarına ait master plak görüntüsü (A: MA2, B: MA3, C: MA43, D: MA44)	29
Şekil 4.2. Bazı İzolatlara Ait Gram Boyama Reaksiyonları ve Hücre Morfolojileri (1000X Büyütme; A: MA2, B: MA3, C: MA5, D: MA43, E: MA44)	30
Şekil 4.3. MA2 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç	31
Şekil 4.4. MA3 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç	32
Şekil 4. 5. MA5 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç	33
Şekil 4.6. MA43 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç	34
Şekil 4.7 MA44 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç	35
Şekil 4.8. <i>L. kunkei</i> MA2 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü	36
Şekil 4.9. <i>L. kunkei</i> MA3 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü	37
Şekil 4.10. <i>L. kunkei</i> MA5 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü	38
Şekil 4.11. <i>L. kunkei</i> MA43 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü	39

Şekil 4.12. <i>L. kunkeei</i> MA44 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü	40
Şekil 4. 13 İzolatlarda Kriptik Plazmit DNA Varlığının/Yokluğunun Agaroza Jelde Belirlenmesi	41
Şekil 4.14. İzolatların Farklı Substratlar İçeren MRS-Agar Plaklarında Enzim Aktivite Tayinleri (A: Likenaz, B: α -Amilaz, C-D: Ksilanaz, E: CMCaz, F: Laminarinaz)	42
Şekil 4.15. İzolatlara Ait Atbiyogram Testlerinin Plak Görüntüleri (P: Penisilin, AMP: Amfisilin, CTX: Sefotaksim, SH: Spektinomisin, TE: Tetrasiklin).....	42



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
A, G, C, T	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
AMP	: Antimikrobiyal peptit
ATCC	: American Type Culture Collection
AvYÇ	: Avrupa Yavru Çürüklüğü
AYÇ	: Amerikan Yavru Çürüklüğü
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi
DAGEM:	: Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSM	: German Collection of Microorganisms
EPS	: Eksopolisakkarit
EtBr	: Ethidium Bromide
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GRAS	: Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilir)
IgA	: İmmünglobulin
LAB	: Laktik asit bakterileri
M.Ö.	: Milattan önce
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MRS	: De Man Rogosa
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
OTA	: Okratoksin A
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rRNA	: Ribozomal RNA
RPM	: Revolutions per Minute (Devir Sayısı/Dakika)
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
w/v	: Hacimde Ağırlıkça Yüzde

1. GİRİŞ

1.1 Bal Arısı ve Biyolojisi

Bal arıları (Apis) bal, polen, arı sütü, propolis gibi önemli gıda ve farmasötik maddeleri üretmesinin yanında, bitkilerde tozlaşmayı sağlayarak aynı zamanda çok önemli bir ekolojik rol üstlenen böceklerdir. Yeryüzünde kutuplar dışında dünyanın hemen her bölgesine yayılmış olan bal arılarında, bulundukları coğrafyaların doğal engelleri ve ekolojiye uyumları sonucunda farklı coğrafik ırklar ortaya çıkmıştır (Crane, 1984; Karacaoğlu ve Fıratlı, 1998). İlk kez Buttel-Reepen (1906) tarafından üçlü sınıflandırma sistemiyle sınıflandırılan bal arısı, daha sonra V.V. Alpotov ve G. Goetze tarafından geliştirilen belirleyici morfolojik karakterleri ve bunların ölçüm yöntemleri olan renk, kübital indeks, vücut ölçüleri gibi birtakım yapısal özellikleri kullanılarak Avrupa'da dağılım gösteren ırklar tanımlanmıştır (Karacaoğlu ve Fıratlı, 1998). Böylece bu morfometrik yöntemlerin kullanılması ile değişik ekolojik koşullarda varolan ekotipler ve genotipler arasında çiftleşmeler sonucu oluşan melez genotipler tespit edilebilmiştir. (Karacaoğlu ve Fıratlı, 1998). Bal arılarının günümüzde geçerli olan taksonomik sınıflandırması Çizelge 1.1'de verilmiştir.

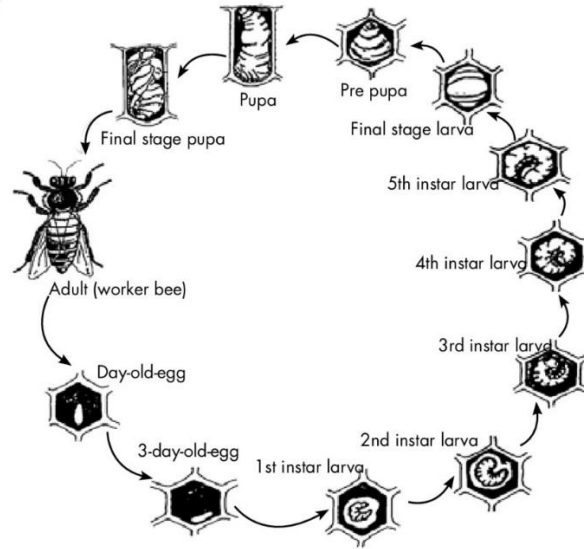
Çizelge 1.1 Bal arılarının taksonomik sınıflandırılması (Güler, 2006; Korkmaz, 2013; Arıgül ve ark., 2021).

Alem (Kingdom)	Animalia	Hayvanlar
Şube (Phylum)	Arthropoda	Eklembacaklılar
Alt şube (Subphylum)	Antennata	Antenliler
Sınıf (Class)	Insecta	Böcekler
Alt sınıf (Subclass)	Pterygota	Kanatlı böcekler
Takım (Order)	Hymenoptera	Zarkanatlılar
Bölüm	Aculeata	İğneliler
Süper familya (Superfamily)	Apoidea	Arılar
Familya (Family)	Apidae	Bombus ve bal arıları
Alt familya (Subfamily)	Apinae	Sosyal arılar
Cins (Genus)	Apis	Bal arıları
Tür (Species)	<i>Apis mellifera</i>	Batı bal arısı
	<i>Apis cerena</i>	Doğu bal arısı
	<i>Apis florea</i>	Cüce arı
	<i>Apis dorsata</i>	Dev arı
	<i>Apis andreiiformis</i>	Siyah cüce bal arısı
	<i>Apis laboriosa</i>	Himalaya dev bal arısı
	<i>Apis nigrocincta</i>	Filipin bal arısı
	<i>Apis koschevnikovi</i>	Koschevnikov arısı

Bal arıları tam başkalaşım geçirerek, her bir birey petek göze bırakılan yumurtadan sonra sırasıyla larva, prepupa ve pupa evrelerinden sonra ergin bal arısına dönüşmektedir (Şekil 1.1.). Arı yumurtası silindirik şeklindedir. Bal arıları ana arı, işçi arı ve erkek arı olmak üzere 3 farklı sınıf içermektedir. Cinsiyet açısından ana arılar ve işçi arılar dişidir. Petek üzerinde erkek arı yetiştirmek için gözler büyük, işçi arı yetiştirmek için gözler küçüktür.

Ana arı büyük göze dölsüz, küçük göze ise döllu yumurta bırakır. Döllenmiş yumurta döllenmemiş yumurtaya göre daha hızlı gelişmektedir. Bal arısı larvası renk, hacim, şekil olarak değişiklik gösterir. Altı günlük larva döneminde 5 kez gömlek değiştiren larva pupa olur. Ana arının yumurtladığı döllenmiş yumurtalardan işçi arılar ve ana arılar; dölsüz yumurtalardan ise erkek arılar meydana gelir. Kuluçka süresi ana arıda 16, işçi arılarda 21, erkek arılarda ise 24 gün sürmektedir. Ana arı koloninin en önemli bireyidir, kalıtsal yapının döllere aktarılmasında hem ana ve dolaylı olarak baba rolü oynamaktadır. Erkek arıların ise çiftleşme dışında bir fonksiyonları yoktur. Ana arı ve işçi arılarda olduğu gibi erkek arıların iğneleri olmadığından savunma mekanizmaları yoktur (Winston, 1987; Silici ve Özkök, 2009).

Bal arılarında erkek arılar haploid bireyler olup dişiler ise diploid bireylerdir. Erkek arıların haploid bireyler olması genetik çalışmalar açısından avantaj sağlamaktadır. Erkek arılar sadece ana arıdan aldıkları genlere sahiptirler çünkü ana arılar çiftleşmeden bile döllenmemiş haploid yumurta yumurtlayabilir ve bu yumurtalardan erkek arılar çıkar. Ana arılar çiftleşmiş olduklarında da çiftleşmede spermin depolandığı sperm kesesini açmadan haploid yumurta üretebilirler. (Ruttner, 1988; Laidlaw and Page, 1997; Rinderer, 2001; Tautz, 2009). Ana arılar havada uçarak çiftleşirler ve erkek arılar ölür. Ana arı tekrar çiftleşmeye döner ve topladığı spermlerin bir kısmını dışarı atıp gerekli olan kısmını sperm kesesinde depolar. Sperm kesesinde depolanan sperm ana arıya yaklaşık 5 yıl kadar yetebilir (Ruttner, 1988; Laidlaw ve Page, 1997; Tautz, 2009).



Şekil 1.1 Bir İşçi Arının Hayat Evresi (Gurung ve ark. 2012)

1.2. Bal Arısı ve Arıcılığın Tarihçesi

Yapılan araştırmalarda elde edilen veriler arıcılığın çok eski bir geçmişi olduğunu ortaya koymuştur. İspanya'nın Biorp Valencia kasabasında bulunan M.Ö. 7000 yıllarında yapıldığı düşünülen mağara resimlerinde arılarla çevrili bir kadının bal alırken resmi olduğu görülmüştür.

MÖ 3000 yıllarında Mezopotamya’da yaşayan Sümerlerin balı ilaç olarak kullandığı, ayrıca yine günümüzden yaklaşık 3200 yıl öncesine tarihlenen firavun mezarlarında bulunan kurumuş ballar ile 4000 yıl öncesine tarihlenen tabletlerin, antik Mısırlıların bize balı gıda, ilaç ve dini ritüeller amacıyla kullandığını göstermektedir (Topal ve ark., 2021). İspanya’da yapılan kazılarla eski Yunan, Hitit, Roma, Çin medeniyetlerine ait tarihi eserlerde birçok delil bulunmuştur ve bu deliller de arıcılığın bilindiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir.

İnsan tarihinde çok önemli yeri olan arıcılık Türk milleti tarafından da çok önemli sayılmıştır. Fatih Sultan Mehmet ve Kanuni Sultan Süleyman kanunnamelerinde arıcılığa ait hükümler bulunmaktadır. İnsanların ağaç kovuklarındaki arı kolonilerini imha etmeden, içerisindeki balın bir kısmını almalarıyla birlikte arıcılık faaliyeti başlamıştır. Zamanla doğal yollarla elde edilen balların miktarı yetersiz gelmeye başlayınca oyulmuş ağaç kütüklerinden yapay arı yuvaları oluşturulmaya başlanmıştır Ortadoğu bölgelerinde büyük çömlekler arı kovanı olarak kullanılmış, diğer bölgelerde saman, hasır, kamıştan yapılan çok değişik tipte ilkel arı kovanları kullanılmıştır (Kırpık ve Gülen, 2014).

On altıncı yüzyılda bilim ve teknolojiadaki gelişmelerle birlikte, arıcılıkta da önemli gelişmeler yaşanmaya başlanmıştır. Bu dönemde arıcıların amacı arılara zarar vermeden bal hasat etme yöntemlerini bulmaya çalışmak olmuştur. 1758 yılında ana arının havada çiftleştiği bulunmuş, 1845 yılında arının üreme biyolojisi konusunda açıklamalar yapılmış, 1851 yılında çerçevesiz fenni kovan keşfedilmiştir. 1851 yılında Amerikalı Lorenzo Langstroth arı boşluğunu keşfederek çerçevelerin kovan içerisinde kolayca hareket edebileceği kovan sistemleri geliştirmiştir (Kırpık ve Gülen, 2014).

İlk yapay peteğin 1857 yılında kullanıma başlanmasının ardından, 1865 yılında bal süzme makinesi Hruschka tarafından keşfedilmiştir. Arı yetiştiriciliğinde çığır açan yapay dölleme tekniği ise 1940’lı yıllarda uygulanmaya başlanmış ve böylece arı ıslahı ve gen kaynaklarının korunması çalışmalarında önemli adımlar atılmıştır (Kırpık ve Gülen, 2014).

1.3. Bal Arısının Önemi

Bal arıları bal, bal mumu, polen, propolis, arı sütü, arı zehri gibi ekonomik değere sahip ürünlerin üretiminden sorumlu olduğu gibi, aynı zamanda bitkisel üretimde önemli bir olay olan tozlaşmadan da sorumludurlar (Yılmaz, 2016). Dünyada bitkilerde gerçekleşen polinasyonun %70’i arılar tarafından sağlanmakta olup, bu oranın ise %80’inden fazlası bal arıları tarafından gerçekleştirilmektedir (Özbilgin, 1999). Bu oranlar arıların böcekler tarafından tozlaşan bitkilerin üremesindeki rolünün önemini ortaya koymaktadır (McGregor, 1976). Arıların da dahil olduğu böcekler tarafından gerçekleştirilen tozlaşma neticesinde ortaya çıkan ürünler, insanlar tarafından tüketilen gıdaların yaklaşık %35’i gibi önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Buchmann ve Nabhan, 1996). İnsan gıdasının 1/3’ünün arı polinasyonuna gereksinim duyan bitkilerden oluşması,

tozlaşmanın olmaması durumunda bitkisel üretimde yaklaşık %30 gibi bir düşüşün meydana gelmesine neden olacaktır (Karadeniz, 2012).

Arılar tarafından gerçekleştirilen polinasyonla floranın sürekliliği ve çeşitliliği sağlanırken, aynı zamanda tarımsal faaliyetler içinde yer alan bitkisel üretimde elde edilen ürünlerin nitelik ve niceliği artmakta (Anonim, 2011), daha erken ve birörnek ürünler elde edilmekte, düzgün şekile sahip meyveler oluşmakta, ürünlerin depolanma ömrü artmakta, kaliteli ve çimlenme kabiliyeti yüksek melez tohumlar elde edilmekte (Karadeniz, 2012), bitkilerde meyve bağlanma oranı, meyve iriliği, meyvede bulunan tohum sayısı ve meyvenin kalite ile ilgili diğer özelliklerinde artış meydana gelmektedir (Lampeitl, 2007). Ayrıca arılar tarafından tozlaşması gerçekleştirilen bitkilerin çiçeklerinin ilkbahar mevsiminin geç dönemlerinde gerçekleşen don olaylarından daha az zarar gördüğü de belirtilmiştir (Kesdek, 2012).

Bal arıları meralarda yetişen bitkiler, süs bitkileri, tıbbi ve aromatik bitkiler ile ağaçlarda tozlaşmaya katılarak nesllerinin devamı sağlamakta, böylece doğal dengenin ve yaban hayatının sürdürülebilirliğine de doğrudan katkıda bulunmaktadır. Diğer taraftan bal arıları tarafından tozlanan bitkilerin gerek çiftlik gerekse yaban hayvanları tarafından tüketilmesi, bu bitkilerin dolaylı olarak insanlara et, süt ve yumurta gibi hayvan kaynaklı gıda olarak dönmesini sağlamaktadır.

Diğer tozlayıcı vektörlerin yokluğunda veya yetersizliğinde bal arıları gerçekleştirdikleri polinasyon ile nesli tehlike altında olan bitki türlerinin korunmasını (Çakmak, 1999), böylece bu bitkilerin çoğalıp yayılarak yaban hayatının gelişmesine, bitki ve hayvanlarda çeşitliliğin artmasına da katkı sağlamaktadırlar (Anonim, 2011).

Bal arısı ürünleri içinde yer alan propolis, arı zehiri, arı sütü, polen ve balmumu gibi ürünlerin farmasötik alanda kullanımı ile birtakım sağlık sorunlarının giderilmesine katkı sağlamış ve bu tedavi şekli de apiterapi olarak isimlendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada balın farklı bölgelerden toplanan nektar ve arı salgılarının doğal metabolitleri bulundurması nedeniyle kanser hücreleri ve tümörlerin gelişimini durdurucu veya yavaşlatıcı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Aydın ve Tekeloğlu, 2018). Yapılan çalışmalarda farklı propolis ekstraksiyonlarının kanserli hücre gelişimlerini engellediği, tümör hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını azalttığı belirtilmiştir (Memmedov ve ark., 2018). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise günlük diyetle bal ile beslenen deneklerin mide lezyonlarının azaldığı tespit edilmiştir (Mutlu ve ark., 2016).

Birçok ülkede sağlık, gıda ve kozmetik sektöründe kullanım alanı bulan arı sütünün, yapılan çalışmalarla antimikrobiyal, antitümör, antiinflamatuvar, antiseptik, antioksidan ve tansiyonu düşürücü gibi olumlu etkilerinin bulunduğu ortaya konulmuştur (Mutlu ve ark., 2016). Yine benzer şekilde polen balların sınıflandırılması ve sağlık alanında tedavi amacıyla kullanılabildiği gibi, bir başka arı ürünü olan balmumu ise benzer şekilde kozmetik ve eczacılık sektörlerinde kullanım alanları edinmiştir.

Sonuç olarak; bal arıları ve bal arısı ürünlerinin önemi ele alındığında Einstein'ın “Eğer arılar yeryüzünden kaybolursa insanlığın sadece 4 yıl ömrü kalır.” sözü arıların insanoğlu için ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır.

1.4. Dünyada Bal Arısı Yetiştiriciliği

2018 yılı FAO verilerine göre dünyada toplam 92.265.141 arı kovanı ile 1.850.868 ton bal üretilmiştir. Kovan başına bal verimi ise 20,1 kg olarak gerçekleşmiştir.

Dünyada üretilen balın %25'i ticarete konu olmakta ve dış satımın %90'ı, 20 dolayındaki bal üreticisi ülkelere yapılmaktadır. Yıllara göre dünyadaki toplam kovan sayısı, üretim ve verimlilik (kovan başına bal üretimi) Çizelge 1.2'de verildiği gibidir.

Çizelge 1.2 Dünyada kovan sayısı ve verimliliği (FAO, 2018)

Yıllar	Toplam Kovan Sayısı (Adet)	Bal Üretim Miktarı (Ton)	Verimlilik (Kg)
2010	79.683.687	1.545.379	19,4
2011	80.403.600	1.615.914	20,1
2012	83.058.317	1.650.335	19,9
2013	84.854.694	1.722.109	20,3
2014	87.421.183	1.763.742	20,2
2015	88.066.857	1.824.024	20,7
2016	90.188.775	1.862.670	20,6
2017	90.969.696	1.879.215	20,7
2018	92.265.141	1.850.868	20,1

Tüm ülkeler arasında 9.173.742 kovan varlığı ile 457.203 ton bal üreten Çin dünyada en fazla bal üreticisi ülke konumunda olup (Arıcılık Raporu, Ordu Ticaret Borsası, 2018), kovan başına 49,80 kg bal verimi ile dünya ortalamasının üzerindedir. FAO verilerine göre arı kovanı sayısı bakımından Hindistan 13.048.275 kovan sayısı ile dünyada 1. sırada yer almasına rağmen üretim miktarı bakımından 7. sıradadır. Kovan başına bal üretimi (verimlilik) göz önünde bulundurulduğunda, Ukrayna, Kanada ve Çin oldukça dikkat çekici konumda yer almaktadırlar. Türkiye bal üretim miktarı bakımından dünya ülkeleri içinde 2. sırada yer almasına rağmen, kovan başına 14,40 kg bal üretimi ile dünya ortalamasının oldukça altındadır.

1.5. Türkiye’de Bal Arısı Yetiştiriciliği

Türkiye’de 2021 yılı verilerine göre 8,7 milyon bal arısı kolonisi bulunmaktadır. Muğla 949 bin arılı kovan sayısı ile Türkiye’de bulunan toplam kovan miktarının %10,9’u gibi oldukça yüksek bir oranına sahiptir. Muğlayı, 604 bin kovan ve %6,9 pay ile Ordu, 482 bin kovan ve %5,5 pay ile Adana illeri takip etmektedir (Çizelge 1.3. ve 1.4.).

Çizelge 1. 3 Türkiye’de 2021 yılında arıcılık faaliyetleri genel durumu (TÜİK, 2021)

Yıl	İşletme Sayısı (Adet)	Toplam Kovan Sayısı (Adet)	Bal Üretimi (Ton)	Balmumu Üretimi (Ton)
2015	83.467	7.748.287	108.128	4.756
2016	84.047	7.900.364	105.727	4.440
2017	83.210	7.991.072	114.471	4.488
2018	81.830	8.108.424	107.920	3.987
2019	80.675	8.128.360	109.330	3.971
2020	82.862	8.179.085	104.077	3.765
2021	89.361	8.733.394	96.344	3.766

Çizelge 1.4. Türkiye’de 2021 yılı itibariyle kovan varlığı (TÜİK, 2021)

İller	2017	2018	2019	2020	2021
Muğla	958.328	935.463	918.116	900.583	949.267
Ordu	562.299	568.547	573.358	573.375	604.213
Adana	454.768	461.987	469.938	481.557	481.878
Antalya	226.592	230.323	217.705	216.423	335.686
Mersin	273.384	267.251	282.749	290.795	303.120
İzmir	215.743	232.009	244.519	273.949	276.918
Sivas	215.878	239.575	243.673	256.374	269.709
Bitlis	131.484	155.899	168.888	158.976	253.625
Aydın	280.386	281.060	274.826	257.738	253.625
Trabzon	166.191	180.182	172.785	167.246	178.696
Diğer	4.506.019	4.556.128	4.561.803	4.602.069	4.826.676
Türkiye	7.991.072	8.108.424	8.128.360	8.179.085	8.733.394

1.6. Arı Hastalıkları ve Zararlıları

1.6.1. Arı Hastalıkları

Amerikan Yavru Çürüklüğü: Amerikan yavru çürüklüğünün (AYÇ) etmeni olan *Bacillus* larvae ilk defa Amerikalı White tarafından 1904 yılında keşfedilmiştir. Bakteri, inaktif halde bir spor şeklinde besin ile larvanın bağırsağına ulaşır ve burada aktifleşerek larvayı genellikle öldürür. Hastalık ilerlediğinde larvalar yavru gözlerine yapışır ve ergin arılar tarafından uzaklaştırılmaz, bazen zamanla kurur ve çerçeve sallandığında petek gözlerine çarparak ses çıkarabilir. Erken teşhis hastalığın kontrolünde çok önemlidir (Borum, 2014).

Nosema Hastalığı: Hastalık etmeni olan *Nosema apis* 1909 yılında Zander tarafından keşfedilmiştir. Nosema besin ile kursaktan mideye ulaşır ve burada sporlar çimlenir, çoğalır ve dışkı vasıtasıyla yine atılır. Nosema etmeni hemen her arı kolonisinde bulunur ve kış süresince bağırsak hücrelerinde kışlar. Hastalığın ilerlemesiyle uçamayan, yerde sürünen arılar görülür. Kahverengiden sarıya değişen sulu dışkı, Nosema varlığının ve hastalığın ilerlediğinin göstergesidir (Açık, 2023).

Klasik metotla kullanılarak yapılan araştırmalar nosemanın Bursa’da %26 (Aydın ve ark., 2001), Kars’ta %15,74 (Topçu ve Aslan, 2004), Elazığ’da %8,7 (Şimşek, 2005), Muğla’da %100

(Şimşek, 2007), Trakya’da %6.5 (Doğaroğlu ve Sıralı, 2005) ve Hatay’da %10 (Muz ve ark., 2012) oranlarında yaygınlık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Akariyoz: *Acarapis woodi* 1/10 mm büyüklüğünde, örümceğe benzeyen, arının ilk göğüs nefes borusunda yaşayan bir hayvandır. Bu parazitin girmesi genellikle yavru arının ilk 8 günlük yaşamında gerçekleşir. Bu dönemde trake açıklıklarını çevreleyen kıllar henüz yumuşaktır ve daha kolay yerleşebilir. Bu etmenin çoğalması da solunum borularında gerçekleşir. Arı normal gücünü ve uçuş kabiliyetini kaybeder (Lampeitl, 2009).

Varroa: Arı larva, pupa ve erginleri üzerinde yaşayan bu parazit arıları kitleler halinde enfekte ederek arıcılık faaliyetlerine büyük zararlar vermektedir. Türkiye’de ilk bildirilen Varroa vakası 1977 yılına aittir. *Varroa jacobsoni*, Jacobson tarafından keşfedilmiş ve 1904’te Oudemans tarafından tarif edilmiştir. Kolonide ağırlıklı olarak dişilerine rastlanır. Larvaların kanını emerler ve böylelikle kötürüm arılar meydana gelir. Erkek varroalar ise yalnızca petek gözler içerisinde görülebilir. Erkek varroalar, dişi varroalarla çiftleşir ve ölürler. Ergin dişiler yavru gözleri kapanmadan önce içeri girerek larva kanında bulunan juvenil hormonu ile beslenirler (Uygur ve Girişgin, 2008)

Üzerinde 4-6 varroa bulunan larvalar gelişmelerini sürdürebilirler ancak daha fazla varroa bulunması durumunda gelişimlerini sürdüremezler. Varroaların gelişmesi için en uygun sıcaklık 34 ° C’dir (Kumova, 2004).

Kireç Hastalığı, Taş Hastalığı, Tulumsu Yavru Çürüklüğü Hastalığı: Arılarda kireç hastalığına neden olan etmen *Ascosphaera apis*’tir (Betts, 1932). Bu etmenin sporları çok dayanıklıdır ve 15 yıl boyunca hastalık yapma yeteneğini koruyabilir. En çok ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde görülen bir hastalık olup peteklerde yıllarca hastalık yapmadan canlı kalan sporlar üreme için uygun koşulları bulduğunda yeniden aktif olurlar. Erkek arı larvaları daha çok kovanın kenar peteklerinde bulunduğundan genellikle kuluçka ısısının altında kalırlar. Bu nedenle hastalığın belirtileri ilk defa peteklerin kenarlarındaki ve burada bulunan erkek arı larvalarında görülür (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

Taş Hastalığı, *Aspergillus flavus* küf mantarının sebep olduğu bir hastalık türüdür. Bu hastalık başlangıç safhasında kireç hastalığında görülen belirtileri gösterir. Son safhada sertleşmiş mumya yapısında larvalar gözde kalırlar ve arılar tarafından gözden uzaklaştırılmazlar (Uygur ve Girişgin, 2008)

Tulumsu Yavru Çürüklüğü, etmeni *Marator aitatulas* virüsüdür ve hem larvaları hem de yetişkin bal arılarını etkileyebilmektedir (Uygur ve Girişgin, 2008).

Adi İshal (Dizanteri): Arılarda görülen bir kış hastalığı olmakla birlikte normal dışkılama uçuş mevsiminde gerçekleşir. Kovanda kışlamak durumunda olan arı bu fırsattan mahrum kalır ve dışkısı rektumda birikir. Dışkının fazla miktarda birikmesi ile meydana gelen arı hastalığı dizanteridir (Alfonsus, 1935).

1.6.2. Arı Zararlıları

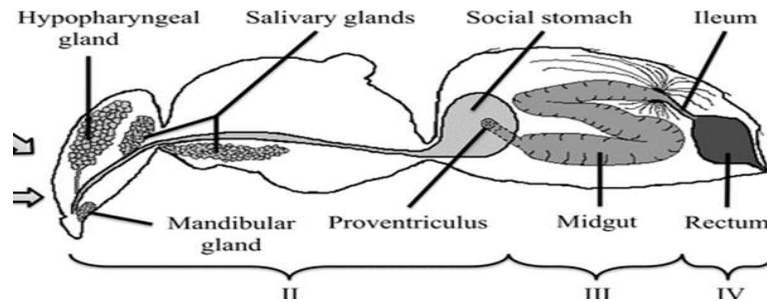
Bal Mumu Güveleri (*Galleria mellonella* L.): Bal mumu güvelerinin larvaları zarar verir. Arı kovanlarının bulunduğu yerde akşama doğru uçuş yaparlar. Ergin dişiler yumurtalarını paket halinde kovanların iç kısmında yarık ve çatlaklar arasına bazen petekler üzerine bırakır, 25-35°C sıcaklıkları arasında ve %40-70 civarında nemin olduğu ortamda çıkan larvalar peteklerin iç kısımlarında tüneller açarak beslenir, petek gözlerini tahrip eder, ağ örür ve siyahımsı pislikler bırakır (Akyol, Korkmaz, 2008).

Eşek Arısı: Eşek arıları yaklaşık işçi arı büyüklüğündedir ama uçarken daha hareketlidir. Koloniye zorla giren eşek arıları nadir görülmektedir. Bal arıları ile kavga eden eşek arıları hareketliliklerinden dolayı çoğunlukla mücadeleyi kazanırlar. Zayıf koloniler eşek arıları tarafından yağmalanır ve geriye sadece kemirilmiş petek artıkları kalır (Lampeitl, 2009).

Fareler: Arıliklarda uçuş deliği açıldığında deliğin petek parçaları, çerçeve tahtaları, izolasyon maddeleri ve bazen yapraklarla tıkandığı görülür. Bu, kışlama başlangıcında, uçuşun durdurulmasından sonra giren bir farenin eseridir. Zayıf koloniler fazla huzursuzluktan dolayı arı kayıplarına uğrarlar. Bazen ise daha güçlü kolonilerde fare iğneyle sokularak öldürülür (Lampeitl, 2009).

1.7. Bal Arılarının Mikrobiyolojisi

Bal arılarında da gastrointestinal sistemi özefagus (esophagus), kursak (crop), proventrikulus (proventriculus), ventrikulus (gerçek mide), malpighi tüpleri, ileum ve rektum dan oluşmaktadır (Şekil 1.2.). Bu sindirim sistemi başta *Lactobacillus* türleri olmak üzere bir takım mikroorganizmalara ev sahipliği yapmaktadır.



Şekil 1.2 Bal Arısının Sindirim Sistemi Anatomisi (Anderson ve ark., 2011).

Bal arılarının kursağı *Lactobacillus kunkeei*, Acetobacteraceae üyesi olan *Parasaccharibacter apium* gibi birkaç bakteriyi içermektedir. İleumda özellikle üç karakteristik türün hâkim olduğu yoğun bir bakteri topluluğu bulunmaktadır. *Snodgnossela alvi* (bağırsak duvarında), *Giliomelia apicola* (*S. alvi* üzerinde katman halde), *Frischella perrara* (genelde proventrikulusta) ve normalde arka bağırsağa adaptasyon sağlamış bazı *Lactobacillus* türleri kolonize olmaktadır. İç kütiküler tabakadan yoksun olan orta bağırsakta çoğunlukla ileuma benzer bakteriyel kolonizasyona sahiptir. Rektumda ise, arka bağırsağa adapte olan iki büyük bakteri topluluğunu barındırır. Bunlar *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium asteroides*'tir. Kovan ve larvalarda ise özellikle arı ekmeği, nektar ve larva bağırsakları, *Lactobacillus* türleri ve Acetobacteraceae dâhil olmak üzere çeşitli çevresel bakterileri paylaşmaktadır (Suyabatmaz ve ark., 2020)

Bal arılarının barındırdığı mikroorganizmalar Çizelge 1.5.'de verilmiştir (Martinson ve ark., 2011; Kwong ve Moran, 2013; Moran, 2015).

Çizelge 1. 4. Bal arıları ile yakın ilişki içerisinde bulunan mikroorganizmalar

Bakteri Şubesi (Phylum)	Türler (Species)	Lokalizasyon	Arı Türü
Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Erişkin bağırsağı; değişen kolonizasyon	<i>Apis mellifera</i>
Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Erişkin bal midesi, larva bağırsağı, kovan	Apis ve Bombus türlerinde
Betaproteobacteria	Neisseriales	Erişkin arka bağırsağı, ileum duvarında	Apis ve Bombus türlerinde
Actinobacteria	Bifidobacteriales	Erişkin arka bağırsağı, rektum	Apis ve Bombus türlerinde
Firmicutes	Lactobacillales	Erişkin arka bağırsağında, rektumda	Apis ve Bombus türlerinde
Gammaproteobacteria	Orbales	Erişkin orta bağırsak, arka bağırsak (ileum lümeninde)	Apis ve Bombus türlerinde

1.7.1. Bal Arılarında Bulunan Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, aerotolerant, karbonhidrat fermentasyonu sonucunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. Taksonomik olarak Firmicutes şubesinin, Bacili takımının, Lactobacillales cinsine ait (Wright ve ark., 2004) LAB'lerinin en önemli cinsleri; *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, ve *Weissella*'dır. Doğada yaygın olarak bulunan bu bakteriler çeşitli fermente gıdaların üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadırlar.

LAB içinde yer alan *Lactobacillus*lar belirli koşullar altında spiral veya kokobasil formlar oluşturabildikleri halde, genellikle düz çubuk şeklinde bir morfolojiye sahip olup, çoğunlukla farklı uzunluktaki çiftler veya zincirlerde bulunurlar (Claverys ve ark., 2006).

Bal arılarında başlıca erişkin arı arka bağırsağında ve rektumunda bulunan *Lactobacillus* türlerinin başlıcaları;

- *Lactobacillus mellis*
- *Lactobacillus mellifer*
- *Lactobacillus apinorum*
- *Lactobacillus melliventris*
- *Lactobacillus kimbladii*
- *Lactobacillus kullabergensis*
- *Lactobacillus helsingborgensis*
- *Lactobacillus kunkei*'dir.

Genç bakterilerin zincir oluşturmadığı laktik asit bakterileri, maksimum aktivitelerini optimum olarak 37-45 °C'de gösterirlerken, 70 °C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde canlılıklarını kaybederler.

Çoğunlukla insan, hayvan ve bitki gibi ortamlardan kolaylıkla izole edilebilen laktik asit bakterileri, fermantasyonda oynadıkları rol nedeniyle gıda endüstrisinde yadsınamaz bir öneme sahiptir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından GRAS statüsüne alınan LAB'nin başlatıcı (starter) kültür olarak kullanımı sonucunda üretilen süt, et ve bitki kaynaklı fermente ürünlerde ortaya çıkan aroma ve tekstür oldukça önemlidir. Bu bakteri grubu içinde yer alan ve probiyotik özellik gösteren bazı bakteriler insanlar ve hayvanlar için sağlık açısından birçok avantaj sağlamaktadırlar (Kılıç, 2001; Gürsoy ve Kınık, 2005; Soomro ve Masud, 2007; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). Bakteriosin gibi ürettikleri bazı maddelerin insan ve hayvanlar için patojen özelliklere sahip birtakım mikroorganizmalar üzerinde antagonistik etki göstermeleri, LAB'lerini sağlık koruma açısından da ayrıca önemli bir konuma taşımaktadır.

1.7.2. Bal Arılarında Laktik Asit Bakterilerinin Rolü ve Önemi

Bağırsak mikrobiyotasının her canlıda olduğu gibi arılarda da önemi büyüktür. Bal arılarında bağırsak konukçusu bakteriler, larvaların bağışıklığını uyarırken patojenlere karşı bağışıklık tepkilerinin artmasını da sağlarlar. Yapılan çalışmalar, probiyotik bakteriler ile desteklenmiş diyetle beslenen bal arısı larvalarında bağışıklıkta görev alan genlerin transkripsiyonunun uyarıldığını, böylece patojenlere karşı immün yanıtının arttığını ortaya koymuştur (Evans ve Lopez, 2004).

Bal arısı ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının bulunmasına bağlı olarak arılarda yaşam süresi ve canlılığının olumsuz etkilenmesi nedeniyle Avrupa ülkelerinde antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır. Bu durum ise bilim insanlarını antibiyotik alternatifi çözüm yollarını araştırmaya itmiştir (Genersch 2010). Yapılan bir çalışmada arılarda Amerikan yavru çürüklüğüne karşı bir

besin karışımı ve üç farklı *Lactobacillus* türü olan besin takviyesi uygulanmış ve karışımın enfeksiyon etkeni *Paenibacillus larvae*'ye karşı kullanılan üç bakteri türü ile yapılan önceki in vitro çalışmalarda inhibitör etki gösterdiği görülmüştür (Borum, 2021). Laktik asit bakterileri bal arılarında bağırsak mikrobiyal ekosisteminin korunmasında önemli bir rol üstlenmişlerdir. Bu LAB'leri, bal arılarında sindirim, immun sisteminin uyarılması, patojen mikroorganizmaların ortadan kaldırılması ve bağırsaktaki mikroflora homeostazının sürdürülmesi açısından oldukça önemlidir. Laktik asit bakterileri antimikrobiyal maddeler (antimikrobiyal peptid-AMP) üreterek patojenik mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasını sağlarlar (Evans ve Lopez 2004; Crotti ve ark., 2013; Asama ve ark., 2015; Raymann ve Moran, 2018). Helveticin J, bacteriolysin, alivaricin, enterolysin A ve thermophilin A bal arılarında bulunan LAB'lerince üretilen AMP'lerden bazılarıdır. Bağışıklık sisteminin çok önemli parçası olan bu AMP'ler aynı zamanda günümüzdeki antibiyotik tedavisine veya mikrobiyal enfeksiyonun önlenmesine umut verici bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Ilyasov ve ark., 2012, Danihlík ve ark., 2016). Laktik asit bakterileri laktozu ve diğer şekerleri fermente ederler. Fermentasyon sonucu son ürün olarak açığa çıkan laktik asit gastrointestinal sistemi asitleştirerek, bazı patojen bakterilerin gelişimini engellerler (Forsgren ve ark., 2010; Carina Audisio ve ark., 2011; Endo ve Salminen, 2013; Pachla ve ark., 2017; Pachla ve ark., 2018;). Bal arılarının sindirim kanalındaki LAB kolonizasyonu, hastalıkların önlenmesinde önem taşımaktadır (Vásquez ve Olofsson, 2009; Raymann ve Moran, 2018). Sağlıklı ve konakçıya uygun bir bağırsak mikrobiyotasını ve dolayısıyla arı sağlığını geliştirmek için, bal arısı kolonilerine gastrointestinal sistemde kolonize olan ve bal arısına özgü laktik asit bakterileri ile zenginleştirilmiş polen takviyesinin yapılması önerilmektedir (Kazimierczak-Baryczko ve Szymaś, 2006; Szymas ve ark., 2012; Patruica ve ark., 2013). Şeker şurubu takviyesinde yer alan laktik asit bakterileri, patojenleri sadece laktik ve asetik asit üreterek değil, aynı zamanda sentezledikleri hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerle de etkisiz hale getirmektedir (Butler ve ark., 2013; Olofsson ve ark., 2016; Janashia ve Alaux 2016; Pachla ve ark., 2018).

1.7.3. *Lactobacillus kunkei*'nin Önemi

Bal arılarının doğal konukçularından olan *Lactobacillus kunkei* (*Apilactobacillus kunkei*)'nin bazı hastalık etmenlerine karşı inhibisyon etkisi gösterdiğine dair literatür bilgileri bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda *L. kunkei*'nin *Paenibacillus* spp. mikroorganizmasına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Kacaniova 2018). *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes* ve mikroorganizmalar üzerine de etkili olduğu tespit edilmiştir (Sandi ve Salasia, 2016). Yine yapılan *L. kunkei*'nin probiyotik olarak kullanıldığı diğer çalışmalar, bu bakterinin arılarda AYÇ (*P. larvae*) (Forsgren ve ark., 2010) ve AvYÇ (*M. plutonius*) (Vasquez ve ark., 2012) kaynaklı ölüm oranlarını düşürdüğünü göstermiştir.

Yapılan bir araştırmada *L. kunkei* HD1 preparatlarının, probiyotik özellikleri sayesinde arıcılık sektöründe arı bağışıklık sistemini desteklemek ve antibiyotik tedavisine başvurmada

dirençli arılar üretmek için kullanılabileceği önerilmiş. HD1'in *M. plutonius*'a karşı inhibe edici aktivitesi gelecekteki araştırmalar için önemli bulunduğu uygulanmıştır (Uğraş, 2017).

Başka bir araştırmada kullanılan *L. kunkei*'nin 9 suşunun biyofilm oluşturma yeteneği, yüksek oto-agregasyon ve hidrofobiklik gibi probiyotik olarak kullanım adaylığı için gerekli ön koşulları sağladığı ve kireç hastalığının etkeni *Ascosphaera apis*'i inhibe ettiği bildirilmiştir. (Schnürer ve Magnusson, 2005; Dalié ve ark., 2010). LAB'leri antifungal etkilerini, mantar yüzey genişlemesini sınırlandırarak, sporülasyonu kontrol altına alarak, hif biyokütlesini azaltarak ve metabolik biyosentetaz aktivitesini baskılayarak gösterirler (Schnürer ve Magnusson, 2005; Dalié ve ark., 2010). Ayrıca, *L. kunkei* suşlarının, mikrobiyal disbiyoz durumunda bal arısı bağırsaklarındaki zarar görmüş olan simbiyotik toplulukları onarmak ve güçlendirmek için önemli bir özellik olan yüksek ozmotik tolerans ortaya koyduğu bildirilmiştir (Lorizzo ve ark., 2020).

1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Bal arılarında (*Apis mellifera*) sağlıklı bir koloni yapısının kazandırılması ve sürdürülebilirliğinin sağlanması için probiyotiklerin kullanımında *L. kunkei* önemli bir rol oynamaktadır. *L. kunkei*'nin dış parazit olan ve bal arısı kolonilerine ciddi zararlar veren *Varroa*'ya ve arılarda özellikle ilkbahar ve sonbaharda ciddi kayıplara sebep olan *Nosema cerena*'ya karşı etkili olduğu; bu parazitlerin koloni ortamında sayılarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sağlıklı gelişen kolonilerde *L. kunkei* bakterileri yeteri kadar bulunmakla birlikte, tarımsal kirlilik ve monokültür tarım uygulamaları bu bakterilerin dengesini ve sayısını azaltmakta, böylece kolonileri salgınlara karşı savunmasız hale getirmektedir.

Bu çalışmada bal arısı ve bal arısı ürünlerinden *L. kunkei* bakterisinin izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Edwards ve ark. (1999), çalışmalarında alkol üretiminde önemli olan üzüm fermantasyonuyla ilgili *L. kunkeei*'nin gelişimini ve büyümesini kontrol etmek için sıcaklık gibi çevre koşullarını değiştirerek stratejiler geliştirmişlerdir ve elde ettikleri sonuçlara göre *L. kunkeei*'nin pH 3,5'un altındaki sentetik bir ortamda iyi gelişmediğini, *Lactobacillus kunkeei*, pH'ı 3,16'ya ayarlanan fermente Chardonnay şıralarına aşılmıştır ve 3,50 ve 3,80. Şıra pH'sındaki bir düşüş *Lactobacillus kunkeei*'nin daha az büyümesine neden olsa da, bakterinin 108 CFU/mL'yi aşan popülasyonlara ulaştığını ve tüm alkollü fermantasyonlar yavaşladığını tespit etmişlerdir.

Edwards ve ark. (2002), üzüm şarabından gram pozitif bir bakteri izole ederek organizmanın laktik asit ürettiğini ve zayıf katalaz aktivitesine sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. 16S rRNA gen dizisi analizi ile izolatin filogenetik olarak *Lactobacillus* cinsinin bir üyesi olduğunu ve fenotipik ve filogenetik kanıtlara dayanarak yeni bir tür olan *Lactobacillus kunkeei* (ATCC 700308) olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tajabadi ve ark. (2011), yaptıkları çalışmalarında Asyatik dev bal arısı *Apis dorsata*'nın midesinden *Lactobacillus* suşlarını ilk kez izole etmişlerdir. Araştırmacılar topladıkları bal arılarından laboratuvarında seçici besi ortamları kullanarak izole ettikleri bakterileri önce Gram boyama ve katalaz testlerine tabi tutmuşlar, daha sonra bakteri DNA'larını izole ederek laktobasil cinsine ait özel primerler (27F ve 1492R) ile 16S rRNA genlerini amplifiye etmişlerdir. Araştırmacılar 16S rRNA sekans analizi sonucunda izole ettikleri toplam 34 suşun %56'sının *Lactobacillus kunkeei*, %6'sının *L. veriform* ve geriye kalan %38'inin ise diğer *Lactobacillus* türlerine ait olduğunu bildirmişler, elde ettikleri izolatların bal arılarında probiyotik olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu ve gıda endüstrisinde faydalı olabileceğini de ifade etmişlerdir.

Endo ve ark. (2012), çiçeklerden ve şaraptan izole ettikleri 8 adet *Lactobacillus kunkeei* bakterisinin glikoz ortamında zayıf fakat fruktoz büyüme ortamında ise iyi bir gelişim gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar ayrıca izolatların büyüme substratı olarak glukozu tercih etmediklerini aksine fruktozu tercih ederek fruktolitik laktik asit bakterileri olduklarını da bildirmişlerdir.

Vasquez ve ark. (2012), Nepal'deki bir gram balda (108kab) *Lactobacillus* cinsi bakterilerden özellikle, *L. kunkeei* ağırlıklı olarak bulunduğu göstermişlerdir. *L. kunkeei*'i en yaygın fruktofilik tür olarak bildirilmişlerdir.

Tajabadi ve ark. (2011), çalışmalarında Asyatik dev bal arısı *Apis dorsata*'nın bulunduğu kovanların bal peteğinden *Lactobacillus* suşlarını izole etmişlerdir. Araştırmacılar topladıkları bal arılarından izole ettikleri bakterilerin DNA'larını izole ederek laktobasil cinsine ait özel primerler ile 16S rRNA genlerini amplifiye etmişlerdir. Araştırmacılar 16S rRNA sekans analizi sonucunda izole ettikleri toplam 17 lactobacilin %64.15'inin *Lactobacillus* spp., %34.85'inin ise *Lactobacillus kunkeei* olarak tanımlandığını, elde ettikleri izolatların bal arılarında probiyotik olarak kullanılma veya gıda endüstrisinde gıda koruyucu olarak kullanılabilme potansiyelinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Asama ve ark. (2015), bal arılarında *L. kunkeei*'nin baskın olduğunu, ayrıca arı ve arı ürünlerinden elde edilen *L. kunkeei* suşlarının IgA üretimini ve bağışıklık duyarlılığını güvenli bir şekilde arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Tamarit ve ark. (2015), bal arıları ve bal arısı ürünlerinde en çok bulunan bakterinin *L. kunkeei* olduğunu bildirmişlerdir. Farklı arı türlerinden izole edilen suşların 16S rRNA genlerinin neredeyse aynı olduğundan evrimsel model çalışmaları için yetersiz olduğunu ifade etmişlerdir. Tüm *Apis* türlerinden izole edilen *L. kunkeei* suşu ile *Meliponini* türlerinden izole edilen diğer iki suşun 1,5 Mb genomunu karşılaştırmışlar, küçük genomlu diğer bakterilerin aksine, kısa nesil süreleri ve çoklu rRNA operonlarının, *L. kunkeei* bakterisinin doğal büyüme habitatında hızlı büyüme için seçim altında evrimleştiğini gösterdiğini ayrıca bakterilerde indirgeyici genom evrimi ve işlevsel genom organizasyonu için genişletilmiş bir çerçeve sağladığını bildirmişlerdir.

Asenjo ve ark. (2016), bal arılarının sayısı 2006 yılından bu yana önemli ölçüde azaldığını ve büyük bir ekolojik sorun haline geldiğini bunun başlıca nedeninin ise kovandaki işçi arıların kovanı kendiliğinden terk etmesiyle CCD ve koloni çöküş bozukluğu olduğunu bildirmişlerdir. CCD'nin özelliklerinden biri *Lactobacilli* gibi *Firmicutes* popülasyonlarının azalması nedeniyle gastrointestinal sistemlerdeki bakteri topluluklarının değişmesi olduğunu ifade eden araştırmacılar, Şili bal arılarının bağırsaklarından *L. kunkeei* suşunu (*L. kunkeei* MP2) izole etmişlerdir. Bu suşun, genetik geçmişini ayrıntılı olarak aydınlatmışlardır ve diğer *Lactobacillus* türleri ile karşılaştırmalı bir genom analizi yapmışlardır.

Vasileva ve ark. (2016), Bulgaristan'ın Plovdiv bölgesinden *Apis mellifera ligustica* bal arısı midesinden izole ettikleri 20 adet fruktofilik bakteriden H3 ve H25 izolatlarını 16S rRNA dizileme analizine göre *L. kunkeei* olarak tanımladıklarını, in situ analiz ve periyodik asit-Schiff boyaması, *L. kunkeei* H3 ve H25'in yaklaşık 300 kDa moleküler

ağırlığa sahip hücre dışı glukansükrazlar ürettiğini, bunun yanında hücre ile ilişkili fraksiyonlarda, yaklaşık 180 kDa moleküler ağırlığa sahip ilave glukansukraz tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dekstranaz hidrolizinden sonra H3 ve H25'ten ekstraselüler glukansükrazlarla sentezlenen glukanolardaki α -(1→6) bağlarının içeriği, klasik dekstranınkinden önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve bunun sırasıyla yaklaşık %35 ve %62 olduğunu ortaya koyan araştırmacılar bu sonuçlara göre, çalışılan polimerlerin daha dallı bir yapıya sahip olduğunu da belirtmişlerdir.

Arredondo ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada arıların bağırsaklarından izole ettikleri dört *L. kunkei* suşundan bi karışım oluşturmuşlar ve larva ile yetişkin arılar üzerinde potansiyel faydalı etkilerini araştırdıkları karışımın larvalarda *P. larvae* ve yetişkin bal arılarında *Nosema ceranae* sporlarının neden olduğu mortaliteyi azalttığını bildirmişlerdir.

Berrios ve ark. (2017), *Lactobacillus* türlerinin, anti-biyofilm özellikleri ve bunun sonucunda geniş bir patojen spektrumuna karşı etkileri nedeniyle faydalı olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada bal arısı bağırsaklarından izole edilen yeni bir *Lactobacillus* türü olan *L. kunkei*'nin in vitro biyofilm oluşturabildiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca *L. kunkei* biyofilminin *P. aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunu engelleyebildiğini bildirmişlerdir. *L. kunkei* suşlarının *Galleria mellonella*'da muhtemelen *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu ve/veya stabilitesini etkileyerek *P. aeruginosa* enfeksiyonunu zayıflattığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca araştırmacılar *L. kunkei*'nin probiyotik özellik gösterdiğinden dolayı bu *Lactobacillus* türünün hem hayvanlarda hem de insanlarda kullanımının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu bozmaya katkıda bulunabileceğini savunan kanıtlar da ortaya koymuşlardır.

Uğraş (2017), yaptığı çalışmada 2015-2016 yılları arasında DAGEM (Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi, Yığılca, Düzce) tarafından temin edilen bal arılarından probiyotik bakterileri taramış, elde ettiği izolatu arı patojeni *Melissococcus plutonius* (*Enterococcaceae*)'a karşı inhibitör aktivitesini in vitro agar kuyu difüzyonu ile belirlemiştir. Araştırmacı, elde ettiği izolatu biyokimyasal, fizyolojik ve 16S rRNA analizi sonuçlarına göre *L. kunkei* olarak tanımlamış ve probiyotik niteliklerini araştırmıştır. Son olarak araştırmacı izolatu gelecekteki preparatlarının arı bağışıklık sistemini desteklemesi ve antibiyotiklerle tedaviye başvurmadan dirençli bal arıları üretmesinin beklendiğini de ifade etmiştir.

Meng ve ark. (2018), *L. kunkei* DSM 12361'den sükras aktivitesini içeren iki katalitik alana sahip bir GH70 proteinin biyokimyasal karakterizasyonu sonucu substrat

olarak sadece sükroz kullanıldığında, GtfZ-CD2'nin esas olarak sükroz hidrolizini; substrat olarak dekstran mevcut olduğunda, GtfZ-CD2 donör substrat olarak sükroz ile etkili bir transglikozidaz aktivitesi sergilediğini ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmaya göre, yararlı laktik asit bakterilerinin yapısal olarak karmaşık α -glukanlar üretme kabiliyetini vurgulamışlar ve bir ($\alpha 1 \rightarrow 3$) dallanma sükrazının moleküler mekanizmasına ilişkin yeni bilgileri ortaya koymuşlardır.

Mathialagan ve ark. (2018), farklı kaynaklardan topladıkları bazı arı ürünlerinde laktik asit bakterilerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, toplam 42 adet LAB'sini izole etmişler ve bu bakterilerin popülasyon yoğunlukları ile morfolojik özelliklerini detaylı olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, morfolojik incelemelerinde izolatların cins düzeyinde dağılımlarının; (%23,8) *Enterococcus*, (18,8%), *Micrococcus*, (13,8%) *Streptococcus*, (13,8%) *Pediococcus*, (10,0%) *Lactobacillus*, (10,0%) *Lactococcus* ve (10,0%) *Leuconostoc* olduğunu ortaya koymuşlardır. Son olarak araştırmacılar LAB popülasyonlarının; bal arılarının midelerinde $16,40\text{--}35,87 \times 10^5$ kab/mL, balda $10,43\text{--}31,30 \times 10^5$ kab/mL, arı poleninde $5,14\text{--}14,35 \times 10^5$ kab/mL, arı ekmeğinde $13,05\text{--}25,15 \times 10^5$ kab/mL ve arı sütünde $10,23\text{--}20,15 \times 10^5$ kab/mL arasında değiştiğini de göstermişlerdir.

Shabnam ve ark. (2018) İran'ın farklı bölgelerine dağılmış olan Asya cüce bal arısı (*Apis florea*) barsak sisteminde bulunan *Lactobacillus* bakterilerini izole etmek ve tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, izole ettikleri 43 adet bakterinin 16S rRNA sekans analizine göre *L. kunkeei*, *L. plantarum* ve *L. apis* olmak üzere 3 farklı türden 8 farklı fenotipe ait olduklarını bildirmişlerdir.

Aldemir ve ark. (2019), derleme çalışmalarında arılarda bağırsak mikroflorasının metabolizma, bağışıklık fonksiyonu, büyüme-gelişme süreçlerinde rol oynadığını ve özellikle arı sağlığının korumasında etkili olduğunu, bal arılarında ki bağırsak yapısına; parazit ve patojenlerle mücadelede kullanılan kimyasal maddeler, mevsim, flora, besin kaynakları, bireyin yaşı veya kovan içi görevi ve birçok diğer faktörlere etki edebildiğini bildirmişlerdir.

Hmood ve ark. (2019), 2017 Nisan ayı boyunca topladıkları 100 adet işçi arıdan yaptıkları bakteri izolasyon çalışmalarında, çoğunluğu sindirim sisteminden olmak üzere ve biyokimyasal test sonuçlarına göre *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus plantrum* ve *Lactococcus lactis* türlerine ait olan yaklaşık 70 adet izolat elde etmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca *L. kunkeei*'nin Okratoksin A'nın (OTA) histolojik etkilerini azaltmadaki koruyucu rolünü inceledikleri çalışmalarının sonucunda, kendi izolatları olan *L. kunkeei*'nin OTA'nın

histolojik etkisine karşı iyi bir koruyucu rol oynayarak bağışıklık duyarlılığını güvenli bir şekilde artırabildiğini ve bu çalışmalarının bal arısı bakterilerinin OTA'ya karşı koruyucu rolününün tespit edildiği ilk çalışma olduğunu ifade etmişlerdir.

Bal (2020), çalışmasında farklı bitkilerden ve arının sindirim sisteminden potansiyel fruktolitik laktik asit bakterileri izole etmiştir. Araştırmacı izolatların fenotipik ve genotipik karakteristiklerini ortaya koyduğu çalışmasında izolatlar probiyotik özellikleri test etmiş ve probiyotik potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir.

Lorizzo ve ark. (2020), yaptıkları araştırmada *L. kunkei* bakterisinin bal arılarının gastrointestinal yollarında en sık bulunan fruktofilik bir laktik asit bakterisi olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada dokuz *L. kunkei* suşunun bazı fonksiyonel özelliklerini değerlendirip bal arısı larvalarının önemli bir patojenik fungusu olan *Ascosphaera apis* DSM 3116'ya karşı antifungal aktivitesine odaklanarak hücre lizati en yüksek antifungal etkiyi gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca araştırmacılar suşların iyi hücre yüzeyi özelliklerine (hidrofobiklik, biyofilm üretimi) sahip olduklarını da bildirmişlerdir.

Suyabatmaz ve ark. (2020), derleme çalışmalarında bal arılarının gastrointestinal sisteminde, mikroflora veya mikrobiyota olarak adlandırılan, çeşitli mikrobiyal tehditlere karşı korunmada, bazı metabolik faaliyetlerinde ve arı mahsullerinin üretiminde rol oynayan, arı bağışıklık sisteminde güçlü etki mekanizmalarına sahip, özgün bir mikroorganizma koleksiyonu bulunduğunu ve özellikle yetişkin bal arılarının çok zengin bir mikrofloraya sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar sahip oldukları mikrofloranın arı sağlığının korunmasında en önemli ve dikkat çekici faktör olduğunu da özellikle vurgulamışlardır.

Yılmaz ve ark. (2022), yaptıkları çalışmada *L. kunkei* AK1 tarafından üretilen eksopolisakkaritin (EPS) yapısal ve tekno-fonksiyonel özelliklerini belirleyerek yapısal ve biyoaktif özelliklerini ortaya koymuşlardır.

Chege ve ark. (2023), bal arılarının popülasyonun azalmasına etki eden *Serratia marcescens* türü patojenin bal arılarında bağırsak ve hemolenf dâhil olmak üzere bal arısının çeşitli dokuları istila ederek ciddi enfeksiyonlara yol açabildiğini ve arı sağlığını tehlikeye atabildiğini, dolayısıyla ikincil enfeksiyonlarla bu patojenin biyofilmler oluşturarak hızla çoğalabildiğini ve dolayısıyla onu kontrol etmeyi ve ortadan kaldırmayı özellikle zorlaştırdığını belirtmişlerdir. *L. kunkei*'nin bal arıları *Apis mellifera scutellata*'nın sağlığını fırsatçı patojen *Serratia marcescens*'e karşı koruduğunu belirten araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada yeni ortaya çıkan işçi arıları gruplara ayrılmışlar ve

bu gruplardan Lk grubunu *L. kunkei* ile beş günlük aşılama sonra, ilgili her gruptaki arıları *S. marcescens*'e maruz bırakılmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri verilere göre *L. kunkei*'nin *S. marcescens* enfeksiyonundan sonra arıların hayatta kalmasını arttırdığını, bağırsakta çoğalmasını engellediğini ve laboratuvar ortamında mikroptan yoksun bırakılan arılara kıyasla bağırsak epitelinde antimikrobiyal peptid genlerinin ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri Büyüme Ortamları

Bu tez çalışması kapsamında izole edilen *L. kunkei* ve diğer laktik asit bakterileri MRS broth ve MRS agar (MERCK 1106610500, MERCK 1106600500) besi yerlerinde 37 °C’de anaerobik ortam koşullarında üretilmişlerdir. Bakterilerin katı besi yerlerinde üretilmesinde anaerobik ortam, ekimi tamamlanmış olan petri kapları yerleştirildikten sonra, desikatör içerisinde mum yakılarak sağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Laktik Asit Bakterileri Ekilmiş MRS Agar Plaklarının Desikatör İçerisinde Anaerobik Koşullarda İnkübasyonu

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ile diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Sigma, Merck, Hibrigen, Zymo Research, Thermo Fisher, İsolab, Axygen ve Brand’den ticari firmalar aracılığı ile satın alma yoluyla temin edilmiştir.

3.1.3. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden otoklav (Hirayama), inkübatörler (Memmert ve Nüve), hassas terazi (Ohaus), vorteks (Ika), manyetik karıştırıcı (Ika), pH metre (Hanna), steril kabin (Bilser), otomatik pipetler (Axygen ve Brand), deepfreez ve no-frost buzdolabı (Arçelik ve Uğur), santrifüj (Hettich), yatay elektroforez takımı (Peqlab), güç kaynağı (Atto), saf su cihazı (Şimşek Labortechnik) çalışmanın yürütüldüğü Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarlarında bulunmaktadır. İzolatların mikroskopik analizlerinde kullanılan mikroskop (Olympus) ise Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında yerinde kullanılmıştır.

3.1.4. Bal Arısı ve Arı Ürünleri

Çalışmada kullanılan bal arısı örnekleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Deneme Çiftliği Arıcılık Ünitesi'ndeki kovanlarda bulunan bal arısı (*Apis mellifera italica*) kolonilerinden alınmış (Şekil 3.2) ve 16 x 100 ml'lik plastik santrifüj tüplerinde bulunan pepton-NaCl çözeltisi (%0.1 w/v pepton, %0.1 w/v NaCl) içerisine konularak (Şekil 3.3) bakteri izolasyonu yapılmak üzere laboratuvara taşınmıştır. Polen ise yine Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan kovanlardan toplanan polenlerden yetecek miktarda alınarak temin edilmiştir. Bal örnekleri ise marketlerden satın alma yoluyla temin edilmiştir.



Şekil 3.2 Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği Arıcılık Ünitesi'nde Bulunan Kolonilerden Bal Arısı Örneklerinin Toplanması



Şekil 3.3 Kolonilerden Toplanan Bal Arısı Örneklerinin Pepton-NaCl Solüsyonu İçeren Tüplerde Muhafazası

3.2. Metot

3.2.1. Baldan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

Bal örneklerinden *Lactobacillus* izolasyonu için 2 farklı protokol birbirinden bağımsız olarak kullanılmıştır.

Protokol 1: Bal örneklerinden *Lactobacillus* izolasyonundan (Bal, 2020)'de verilen protokolden modifiye edilen ve aşağıda maddeler halinde verilen protokol uygulanmıştır:

1. Bal örnekleri alevde sterilize edilmiş öze yardımıyla yaklaşık 40-50 mg olacak kadar alınarak MRS agar katı besiyerine çizme yöntemiyle yayılmıştır (Şekil 3.4).
2. MRS agar plakları steril kabin içerisinde 10-15 dk süreyle kapakları açık bir şekilde bekletilerek örneklerin kuruması sağlanmıştır.
3. Süre sonunda plaklar kapakları kapatılarak ters çevrilmiş ve bir desikatör içerisine konulmuştur. Desikatörde boş bir yere bir adet mum yakılarak desikatörün kapağı kapatılmış ve bu şekilde 24-48 saat süreyle 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4 Bal Örneklerinin Steril Öze Yardımıyla MRS Agar Plaklarına Yayılması



Şekil 3.5 Bal Örnekleri Yayılmış ve Kurumaya Bırakılmış MRS Agar Plakları

Bal örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunda kullanılan ikinci yöntem aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır.

Protokol 2: Bal örnekleri steril bir özenin ucu ile alınmış ve cam tüpler içerisinde bulunan MRS broth sıvı besiyerine aktarılmıştır.

1. Ekimi tamamlanan cam tüpler kapakları kapatıldıktan sonra 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre konulmuş ve çalkalamaksızın 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Polenden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden steril cam tüpler içerisinde laboratuvara getirilen polen örneklerinden laktik asit bakterisi izolasyonu Bal (2020)'de belirtilen protokolden polen için modifiye edilerek aşağıda verildiği şekilde izole edilmiştir:

1. Polen örneklerinden 50 mg tartılarak 1.5 ml hacimli steril bir mikrosantrifüj tüpüne (eppendorf tüpüne) alınmıştır.
2. Örneklerin üzerine 1 ml steril MRS broth eklenerek 1 dk süreyle vortekslenmiştir.
3. Örnekler 10 dk süreyle dinlendirilerek polenlerin tüplerin dibine çökmesi sağlanmıştır.
4. Üstteki sıvı kısımdan 500 µl alınarak 20 ml hacimli steril MRS broth içeren vida kapaklı cam tüplere aktarılmıştır.
5. Aktarımı tamamlanan cam tüpler 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 96 saat süreyle çalkalamaksızın inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre sonunda bakteri kültürlerinden 10^{-5} 'e kadar seri seyreltmeler yapılmıştır.
7. 10^{-4} ve 10^{-5} oranlarında seyreltilmiş örneklerden 200'er µl alınarak alevle sterilize edilmiş cam çubukla (drigalski spatülü) yayma yöntemiyle MRS agar plaklarına ekimleri yapılmıştır.
8. Ekimleri tamamlanan petri plakları desikatör içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde anaerobik ortamda 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
9. Süre sonunda besiyerinde gelişmiş olan koloniler steril kürdanlarla alınmış ve yukarıda belirtildiği şekilde önce sıvı MRS broth besiyerlerinde, sonra da MRS agar besiyerinde saf stok kültürleri oluşturulmuştur.

3.2.3. Arıların Bal Midesinden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

Kovanlardan toplanan işçi arıların bal midelerinden (Şekil 3.6.) laktik asit bakterilerinin izolasyonu, (Bal, 2020)'de belirtilen protokolden modifiye edilerek aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

1. Steril ortamda (steril kabin içerisinde) sterilize edilmiş bir bisturi ile arıların bal mideleri çıkarılmıştır.

2. Bal mideleri MRS agar katı besiyerlerinin yüzeyine steril bir öze yardımıyla yayılmıştır.
3. Petri plakları kapakları kapatıldıktan sonra ters çevrilmiş ve 24-48 saat süreyle anaerobik ortamda (desikatör içerisinde) 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır.
4. Karışık kültür olarak gelişen izolatlar steril öze yardımıyla toplanarak tek tek olacak şekilde MRS broth besiyerine aktarılmış ve 48 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır.
5. Süre sonunda üreyen bakteri kültürlerinden 10⁻⁵'e kadar seri seyreltilmeler yapılmıştır.
6. 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ oranlarında seyreltilmiş örneklerden 200'er µl alınarak alevle sterilize edilmiş cam çubukla (drigalski spatülü) yayma yöntemiyle MRS agar plaklarına ekimleri yapılmıştır.
7. Ekimleri tamamlanmış petri plakları kapakları açık bir şekilde 10-15 dk süreyle kurumaya bırakılmış, sonrasında ise kapakları kapatılarak ter çevrilmiş ve desikatör içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
8. Süre sonunda besiyerinde gelişmiş olan steril kürdanlarla alınmış ve yukarıda belirtildiği şekilde önce sıvı MRS broth besiyerlerinde, sonra da MRS agar besiyerinde saf stok kültürleri oluşturulmuştur.



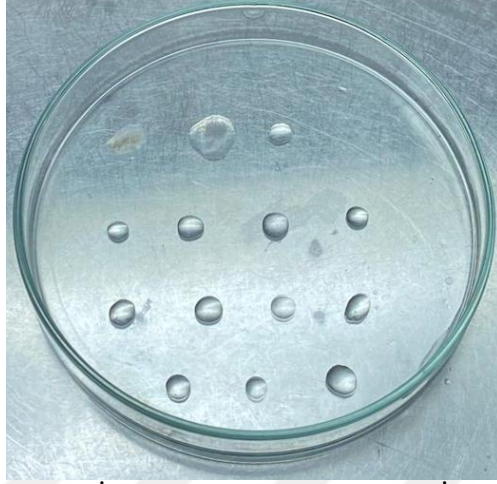
Şekil 3. 6 Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu Yapılan Arı ve Bal Midesi

3.2.4. İzolatların Katalaz Testi

İzolatların katalaz testi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Adnan ve ark., 2007):

1. İzolatlar tek koloni olacak şekilde alınmış ve bir damla %30'luk hidrojen peroksit ile lam üzerine süspanse edilmişlerdir (Şekil 3.7).

2. Süspansiyonlar dikkatli bir şekilde gözlemlenerek kabarcık şeklinde gaz çıkışlarının olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.
3. Gaz çıkışı olan izolatlar katalaz (+), olmayan izolatlar ise katalaz (-) olarak değerlendirilmiştir.

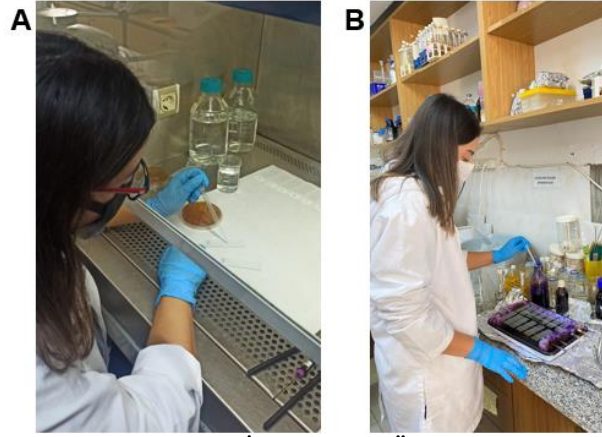


Şekil 3. 7. İzolatların Hidrojen Peroksit İle Katalaz Testi

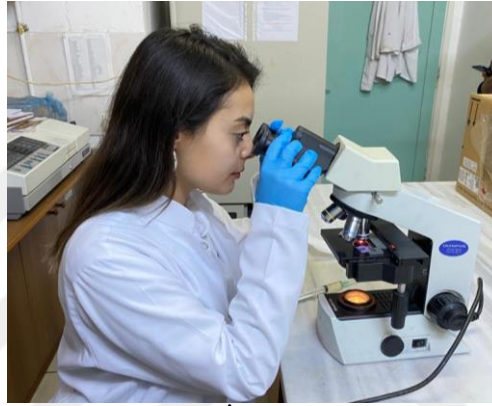
3.2.5. İzolatların Gram Boyaması

İzolatların Gram boyaması aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Omeonu ve ark., 2022):

1. Saf kültür olarak elde edilen bakteriler numaralandırılarak steril ortamda ayrı ayrı lam üzerinde fizyolojik su ile çözdürülmüş ve kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.8A.).
2. Preparatlar 3 kez alevden geçirilerek lam üzerine fikslenmişlerdir.
3. Hazırlanan preparatlar üzerine kristal viyole çözeltisi eklenerek kaplanmış ve 1 dakika süreyle beklenmiştir. Süre sonunda preparatlar distile su ile yıkanmıştır.
4. Preparat üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplanmış ve 1 dakika süreyle beklenmiştir.
5. Preparatlar distile su ile yıkanmış ve üzerine %95'lik etonal çözeltisi eklenerek 10-15 saniye bekletilmiştir.
6. Preparat tekrardan distile su ile yıkanmıştır. Preparat üzerine lam eklenerek kaplanmış ve 30 saniye bekletilmiştir.
7. Preparat distile su ile yıkanmış (Şekil 3.8B) ve sonrasında kurumaya bırakılmıştır.
8. Son aşamada preparatlar mikroskopta (1000X büyütme) incelenmiş (Şekil 3.9), mor renkte görülen mikroorganizmalar Gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.8 Bakterilerin Gram Boyama İçin Lamlar Üzerinde Distile Su ile Seyreltilmesi (A) ve Boyama Sonrası Kurumaya Bırakılması (B).



Şekil 3.9 Gram Boyanan İzolatların Mikroskopik İncelemesi

3.2.6. İzolatların 16S rRNA Sekans Analizi ile Tür Tayini

Tek koloni olacak şekilde saf kültür olarak alınan izolatların 16S rRNA sekans analizi ticari bir firma (BMLabosis, Ankara, Türkiye (<https://www.bmlabosis.com/>), Macrogen Europe, Amsterdam, Hollanda (<https://www.macrogen-europe.com/>)) aracılığı ile hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. Ticari firmadan sonuçlarla birlikte temin edilen deney aşamaları maddeler halinde aşağıda verilmiştir:

1. İzolatların tür tayini çalışmasında örneklerin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır.
2. Genomik DNA'ların miktar ve saflığını Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
3. PCR çalışmasında universal primerler (Çizelge 3.1) kullanılarak, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2.-3.3).
4. PCR (Kyrathec Thermocyclers) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1 TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide (EtBr) boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. Yaklaşık

1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® Taq DNA polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir ve örnekler için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu teyit edilmiştir.

5. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmış olup, örnekler kitin protokolüne uyularak saflaştırılmıştır.
6. Örneklerin Sanger dizilenmesi MacroGen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Applied Biosystems, Foster City, CA).
7. Ünlversal primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan ünlversal primerler

İzolat Kodu	Ünlversal Primer Kodu	Primer Dizisi (5'→3')	Tm (°C)
MA5, MA43	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	57
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	57
MA2, MA3, MA44	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	57
	1387R	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	57

Çizelge 3.2 İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 Mm
dNTP karışımı	20 mM	0.2 mM
Primer-F	10 µM	0.3 µM
Primer-R	10 µM	0.3 µM
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	2 U
Kalıp DNA		3 µl
PCR grade su	Toplam hacim 35 µl'ye tamamlandı	

Çizelge 3.3 İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonlarında kullanılan PCR reaksiyonu

Döngü Sayısı	Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre
1	Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk
	Denatürasyon	95	45 sn
30	Primer bağlanma	57	45 sn
	Uzama	72	60 sn
1	Son uzama	72	5 dk
1	Bekleme	4	∞

3.2.7. Gliserol Stok Hazırlama ve Bakterilerin Muhafazası

Tür tayini gerçekleştirilen izolatların uzun süreli muhafazası amacıyla gliserol stokları hazırlanmıştır. Gliserol stok için MRS Broth besiyerinde 24-48 saat süreyle 37 °C’de üreyen bakteriler 4 °C’de 4000 devirde 8 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant (hücre dışı sıvı) kısım atılarak kalan bakteri çökeltisinin üzerine 0,5 ml MRS Broth ve 0,5 ml %60’lık steril gliserol eklenmiş ve sonrasında vortekslenmiştir. Oluşan karışım steril eppendorf tüplerine alınarak etiketlenmiş ve -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.8. İzolatların Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

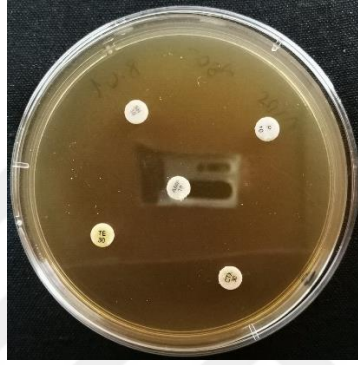
Elde edilen izolatlar özellikle hayvancılık sektöründe önemli kullanım alanına sahip olan α -amilaz, karboksimetil selülaz (CMCaz), ksilanaz, likenaz ve laminarinaz enzim aktivitelerine sahip olup olmadıkları konusunda araştırılmıştır. Bunun için, MRS agar plaklarına α -amilaz aktivitesi için %0.5 (w/w) suda çözünür nişasta, CMCaz, ksilanaz, likenaz ve laminarinaz aktiviteleri içinse %0.1 (w/w) oranlarında sırasıyla karboksimetil selüloz (CMC), ksilan, likenan ve laminarin ilave edilmiştir. İzolatların ayrı ayrı olacak şekilde substrat içeren plaklara steril öze ile MRS-broth besiyerlerinden ekimleri yapılmış ve desikatör içerisinde 37 °C sıcaklık koşullarında 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Bakterilerde belirgin koloni gelişimi gözlemlendikten sonra, nişasta içeren plaklar iyot buharı ile boyanmıştır. Bunun için petri kaplarının kapağına birkaç iyot kristali ezilmiş ve bakteriler üzerine ters çevrilerek oda sıcaklığında 3-5 dk süreyle besiyerinin iyot buharı ile boyanması sağlanmıştır (Gültekin ve Özcan, 2020). CMC, ksilan, likenan ve laminarin içeren plaklar ise Congo-red ile boyanmıştır. Bunun için besiyerinin üzerine bakteri kolonilerini örtecek şekilde Congo-red boyası solüsyonu (%0.2 w/v Congo-red) eklenmiş ve 15 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda boya solüsyonu plaklardan dökülerek, bu sefer bakterilerin üzerine NaCl solüsyonu (1 M) eklenmiş ve 15 dk daha bekletilerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Boyama işlemleri tamamlandıktan sonra, plaklar kolonilerin etrafında enzim aktivite zonlarının bulunup bulunmadığı gözlem yoluyla muayene edilmiş ve enzim aktivite durumları not edilmiştir (Teather ve ark., 1982; Özcan ve ark., 2013).

3.2.9. Antibiyogram Testi

İzolatlardan 16S rRNA sekans analizine gönderilen 5 adet bakterinin antibiyogram testleri farklı antibiyotikler emdirilmiş ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılarak aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Hudzicki, 2009):

1. Bakteriler MRS broth besiyerinde 24 saat süreyle 37 °C’de inkübasyona bırakılmışlardır.
2. Süre sonunda izolatlardan steril steril ortamda 100’er μ l alınarak MRS agar plaklarına drigalski spatülü ile yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır.

3. Ekimi tamamlanan plaklar üzerine, belirli mesafe aralıkları ile ve sterilize edilmiş laboratuvar pensi ile antibiyotik emdirilmiş diskler (P: Penisilin (10 µg), AMP: Amfisilin (10 µg), CTX: Sefotaksim (30 µg), SH: Spektinomisin (10 µg), TE: Tetrasiklin (30 µg)) yerleştirilmiştir (Şekil 3.10.).
4. Plaklar kapakları açık şekilde 10 dk süreyle kurumaya bırakılmış ve sonrasında kapakları kapatılarak ters çevrilmiş ve bir desikatörün içerisinde 37 °C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
5. Süre sonunda plaklar incelenerek, antibiyotik diski etrafında bakteri gelişiminin bulunma durumuna göre dirençli veya duyarlı olma durumları not edilmiştir.



Şekil 3.10 Bakteri Ekimleri Yapılmış Ve Antibiyotik Diskleri Yerleştirilmiş MRS Agar Plakları

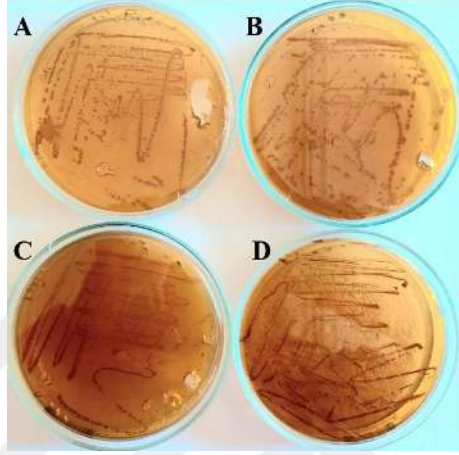
3.2.10. Plazmid DNA İzolasyonu

İzolatlarda kriptik plazmid DNA bulundurma durumları plazmid DNA izolasyon kiti (ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit, D4200) kullanılarak, kitin kullanma klavuzunda belirtilen protokol uyarınca yapılmıştır. Örnekler %0.8’lik agaroz jelde 80 volt, 40 mA’de 45 dk süreyle koşturulduktan sonra, kriptik plazmid DNA varlığı/yokluğu EtBr boyaması ile transillüminatör cihazında 260 nm dalga boyunda görüntülenerek belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklerin Toplanması ve Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan bal arısı, polen ve bal numunelerinden toplam 44 adet laktik asit bakterisinin izolasyonu gerçekleştirilmiş, bu izolatların gliserol stok ve master plakları yapılmıştır (Şekil 4.1.). Bal örneklerinden ise iki farklı yöntem kullanılmasına rağmen LAB izolatu elde edilememiştir. İzolatlar ve izolat kodları ile izolasyon kaynakları Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Bazı *L. kunkeei* izolatlarına ait master plak görüntüsü (A: MA2, B: MA3, C: MA43, D: MA44)

Çizelge 4.1 İzole edilen laktik asit bakterileri ve izolasyon kaynakları

İzolasyon Kaynağı	İzolat Sayısı	İzolat Kodu	Çalışılan İzolatlar
Bal Arısı Midesi	42	MA1-MA42	MA2-MA3-MA5
Polen	2	MA43-MA44	MA43-MA44
Toplam	44		

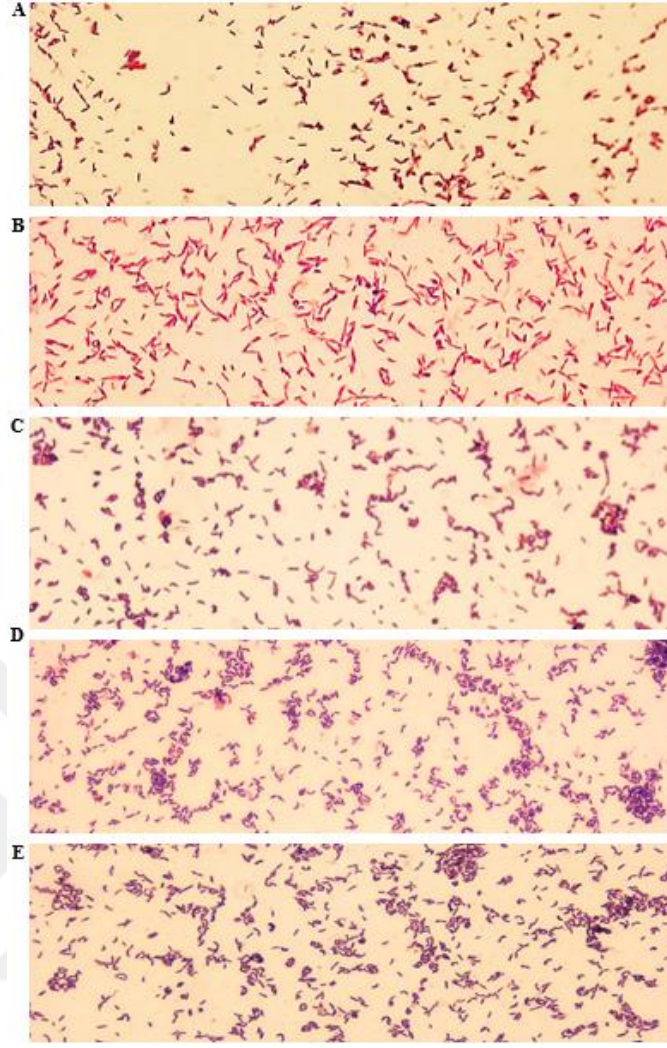
4.2 İzolatların Kısmi Karakterizasyonu

4.2.1 İzolatların Gram Boyaması

İzolatların Gram boyamaları sonucunda bal arısı midesinden izole edilen toplam 42 adet izolat (izolat kodları: MA1-MA42 arası) ile polen örneklerinden izole edilen 2 adet izolat (izolat kodları: MA43 ve MA44) Gram (+) olarak belirlenmişlerdir (Çizelge 4.2). Mikroskopik incelemeler tüm izolatlar için basil şeklinde hücre morfolojisi ortaya koymuşlardır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 İzolatların gram boyama sonuçları

İzolat Kodu	Kaynağı	Gram Boyanma
MA1-MA42	Bal Arısı Midesi	Pozitif
MA43-MA44	Polen	Pozitif



Şekil 4.2 Bazı İzolatlara Ait Gram Boyama Reaksiyonları ve Hücre Morfolojileri (1000X Büyütme; A: MA2, B: MA3, C: MA5, D: MA43, E: MA44)

Gerek bal arısı midesi, gerekse polen örneklerinden izole edilen tüm LAB izolatların katalaz test sonuçları negatif çıkmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. İzolatların katalaz testi sonuçları

İzolat Kodu	Kaynağı	Gram Boyanma
MA1-MA42	Bal Arısı Midesi	Negatif
MA43-MA44	Polen	Negatif

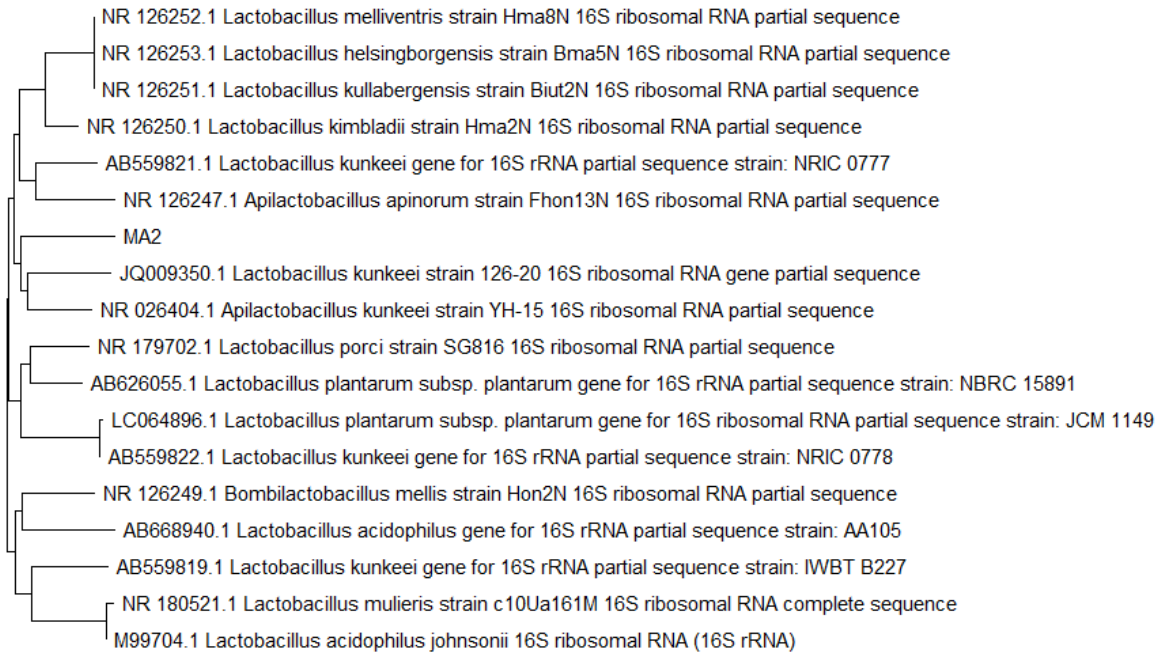
4.3. İzolatların Genotipik Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında elde edilen LAB izolatlarından 5 tanesi (MA2 (bal arısı midesi), MA3 (bal arısı midesi), MA5 (bal arısı midesi), MA43 (polen) ve MA44 (polen)) belirlenerek 16S sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlara ait 16S rRNA sekanslarının (Çizelge 4.4-4.8) NCBI üzerinden analiz sonuçları, beş izolatın da *Lactobacillus kunkeei* bakterisi ile 99,79-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. İzolatların filogenetik ağaç

görüntüleri Şekil 4.3-4.7’de, 16S rDNA dizileme sonucuna ait kromatogram görüntüleri Şekil 4.8-4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 MA2 izolatına ait 16S rRNA sekansı

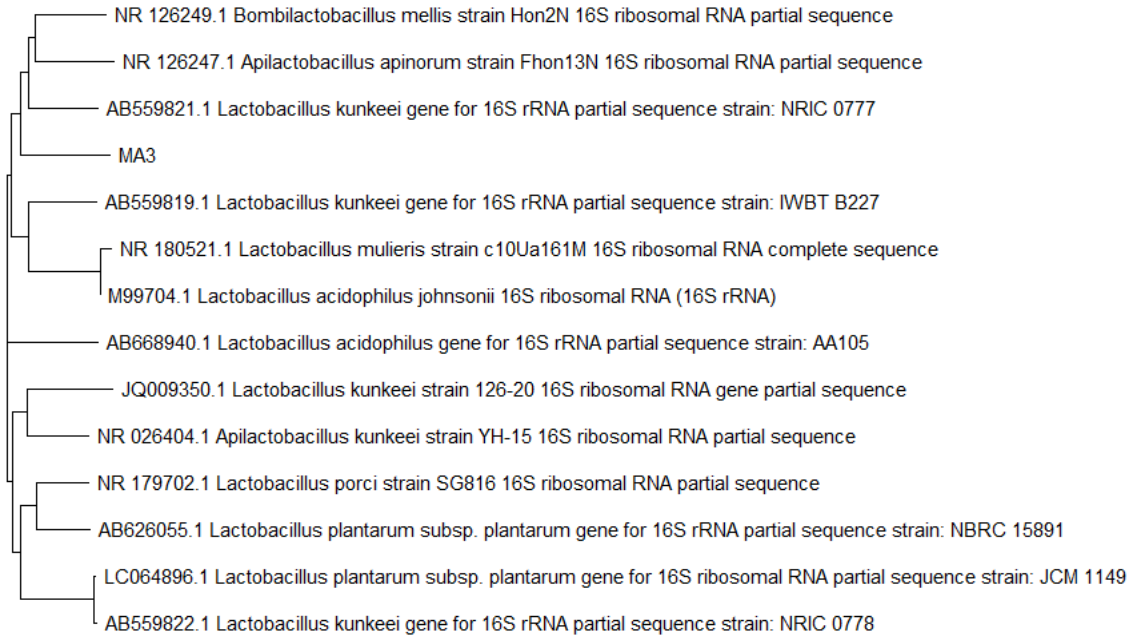
Primerler: 27F-1492R	KX926551.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i>	Benzerlik Oranı: %100
1 TTTATGCTTG	CATAAATGAT	TTTTGGATTG
61 TGGGTAACCT	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC
121 TAGTTGGAAC	CGCATGGTTC	CAACTTGAAA
181 CGCGCCGTAT	TAGTTAGTTG	GTGAGATAAA
241 CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301 CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA	TGGACGAAAG
361 AGGTTTTCGG	ATCGTAAAAC	TCTGTTGTTA
421 CACTTTGACG	GTATTTAACC	AGAAAGCCAC
481 ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGGATTTAT
541 AAGTCTGCTG	TGAAAGCCCT	CAGCTCAACT
601 AGTACAGAAG	AGGAAAGTGG	AACTCCATGT
661 AACACCAGTG	GCGAAGGCGG	CTTTCTGGTC
721 GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT
781 GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCCGCAGCT
841 GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901 GTTTAATTCG	ATGCTACGCG	AAGAACCCTA
961 AGATTGGGCG	TTCCCTTCGG	GGACAGAATG
1021 GTCGTGAGAT	GTTGGGTTAA	GTCCCGCAAC
1081 TTTAGTTGGG	CACTCTAGTG	AGACTGCCGG
1141 CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GAGCTGGGCT
1201 TCGCGAAAAC	CGCGAGGTCA	AGCTAATCTC
1261 TGCAACTCGC	CTGCATGA	



Şekil 4. 3. MA2 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç

Çizelge 4. 5 MA3 izolatına ait 16S rRNA sekansı

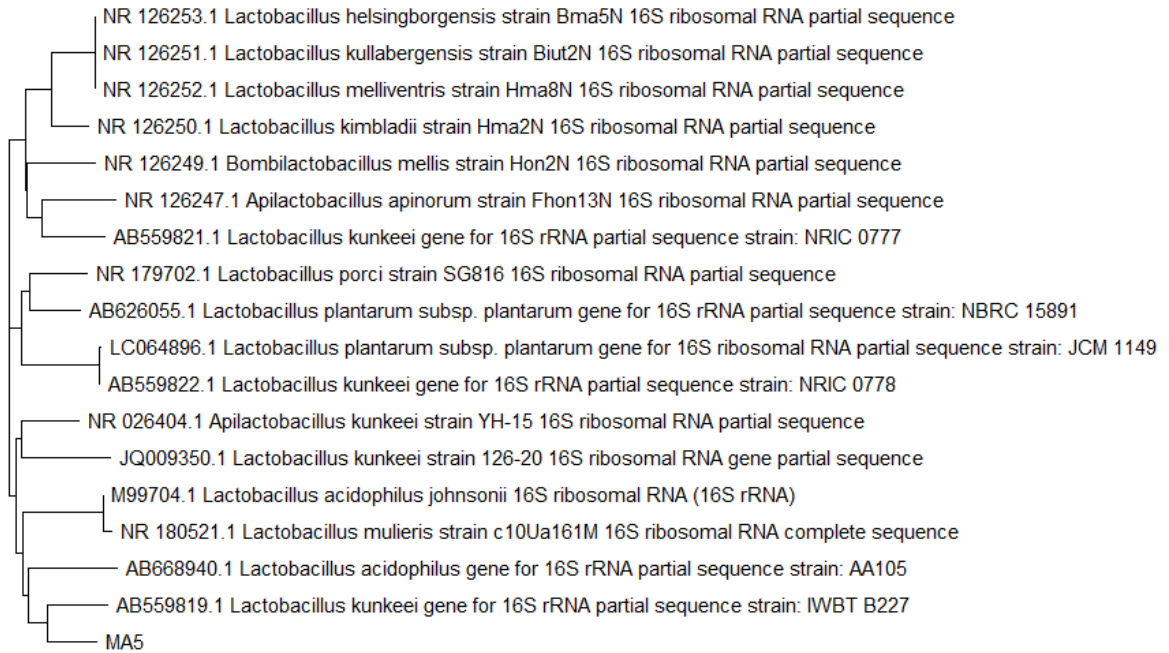
Primerler: 27F-1492R	MT381714.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i>	Benzerlik Oranı: %100
1	CGAGCTCTCC	CAAATTGATT TTATGCTTGC ATAAATGATT TTTGGATTCTG GAGCGAGTGG
61	CGAACTGGTG	AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCCGAAGCG GGGGATAACA TTTGGAAACA
121	AGTGCTAATA	CCGCATAATT AGTTGGAACC GCATGGTTCC AACTTGAAAG ATGGCTCTGC
181	TATCACTTTG	GGATGGACCC GCGCCGTATT AGTTAGTTGG TGAGATAAAA GCCCACCAG
241	ACGATGATAC	GTAGCCGACC TGAGAGGGTA ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC
301	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGAAAGT CTGATGGAGC
361	AACGCCGCGT	GAGTGATGAA GGTTTTCGGA TCGTAAACT CTGTTGTTAA AGAAGAACAA
421	GTGTTAGAGT	AACTGTTAAC ACTTTGACGG TATTTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG
481	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTGTC CGGATTTATT GGGCGTAAAG
541	CGAGCGCAGG	CGGTTTTGTA AGTCTGCTGT GAAAGCCCTC AGCTCAACTG AGGAAGTGCA
601	GTGGAAACTA	CAAACTTGA GTACAGAAGA GGAAAGTGGG ACTCCATGTG TAGCGGTGAA
661	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA ACACCACTGG CGAAGGCGGC TTTCTGGTCT GTTACTGACG
721	CTGAGGCTCG	AAAGCATGGG TAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CATGCCGTAA
781	ACGATGAATA	CTAGGTGTTG GAGGGTTTCC GCCCTTCAGT GCCGCAGCTA ACGCATTAAG
841	TATTCCGCCT	GGGGAGTACG ACCGCAAGGT TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCCG
901	ACAAGTGGTG	GAGCATGTGG TTTAATTCGA TGCTACGCGA AGAACCTTAC CAGCTCTTGA
961	CATCTTCTGC	CAACCCAAGA GATTGGGCGT TCCCTTCGGG GACAGAATGA CAGGTGGTGC
1021	ATGGTTGTCTG	TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC
1081	TTATTATTAG	TTGCCAGCAT TTAGTTGGGC ACTCTAGTGA GACTGCCGGT GATAAACCGG
1141	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG AGCTGGGCTA CACACGTGCT
1201	ACAATGGATG	GTACAACGAG TCGCGAAACC GCGAGGTCAA GCTAATCTCT TAAAGCCATT
1261	CTCAGTTCGG	ATTGCAGGCT GCAACTCGCC TGCATGAAG



Şekil 4. 4MA3 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç

Çizelge 4. 6. MA5 izolatına ait 16S rRNA sekansı

Primerler: 27F-1492R		MT381714.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i>			Benzerlik Oranı: %99.92	
1	TGGGTAACCT	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AAGTGCTAAT	ACCGCATAAT
61	TAGTTGGAAC	CGCATGGTTC	CAACTTGAAA	GATGGCTCTG	CTATCACTTT	GGGATGGACC
121	CGCGCCGTAT	TAGTTAGTTG	GTGAGATAAA	AGCCCACCAA	GACGATGATA	CGTAGCCGAC
181	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG	AGACACGGCC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG
241	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA	TGGACGAAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA
301	AGGTTTTTCGG	ATCGTAAAAC	TCTGTTGTTA	AAGAAGAACA	AGTGTTAGAG	TAACTGTTAA
361	CACTTTGACG	GTATTTAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG	CCGCGGTAAT
421	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGATTTTAT	TGGGCGTAAA	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTGT
481	AAGTCTGCTG	TGAAAGCCCT	CAGCTCAACT	GAGGAAGTGC	AGTGGAACT	ACAAAACCTTG
541	AGTACAGAAG	AGGAGAGTGG	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG
601	AACACCAGTG	GCGAAGGCGG	CTTCTGGTTC	TGTTACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
661	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAAT	ACTAGGTGTT
721	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA	GTATTCCGCC	TGGGGAGTAC
781	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCG	CACAAGTGGT	GGAGCATGTG
841	GTTTAATTTCG	ATGCTACGCG	AAGAACCCTTA	CCAGCTCTTG	ACATCTTCTG	CCAACCCAAG
901	AGATTGGGCG	TTCCCTTCGG	GGACAGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
961	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCACAAC	GAGCGCAACC	CTTATTATTA	GTTGCCAGCA
1021	TTTAGTTGGG	CACTCTAGTG	AGACTGCCGG	TGATAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGACGACGT
1081	CAAATCATCA	TGCCCCTTAT	GAGCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGAT	GGTACAACGA
1141	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA	AGCTAATCTC	TTAAAGCCAT	TCTCAGTTTCG	GATTGCAGGC
1201	TGCAACTCGC	CTGCATGAAG	TTGGAATCAC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGT



Şekil 4. 5. MA5 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç

Çizelge 4. 7. MA43 izolatına ait 16S rRNA sekansı

Primerler: 27F-1492R	MT381714.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i>	Benzerlik Oranı: %99.79
1	TGGTGAGTAA	CACGTGGGTA
61	TAATACCGCA	TAATTAGTTG
121	CTTTGGGATG	GACCCGCGCC
181	GATACGTAGC	CGACCTGAGA
241	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG
301	CGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT
361	AGAGTAACTG	TTAACACTTT
421	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG
481	GCAGGCGGTT	TTGTAAGTCT
541	AACTACAAAA	CTTGAGTACA
601	TAGATATATG	GAAGAACACC
661	GCTCGAAAGC	ATGGGTAGCG
721	GAATACTAGG	TGTTGGAGGG
781	CGCCTGGGGA	GTACGACCGC
841	TGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA
901	TCTGCCACCC	CAGAGATTGG



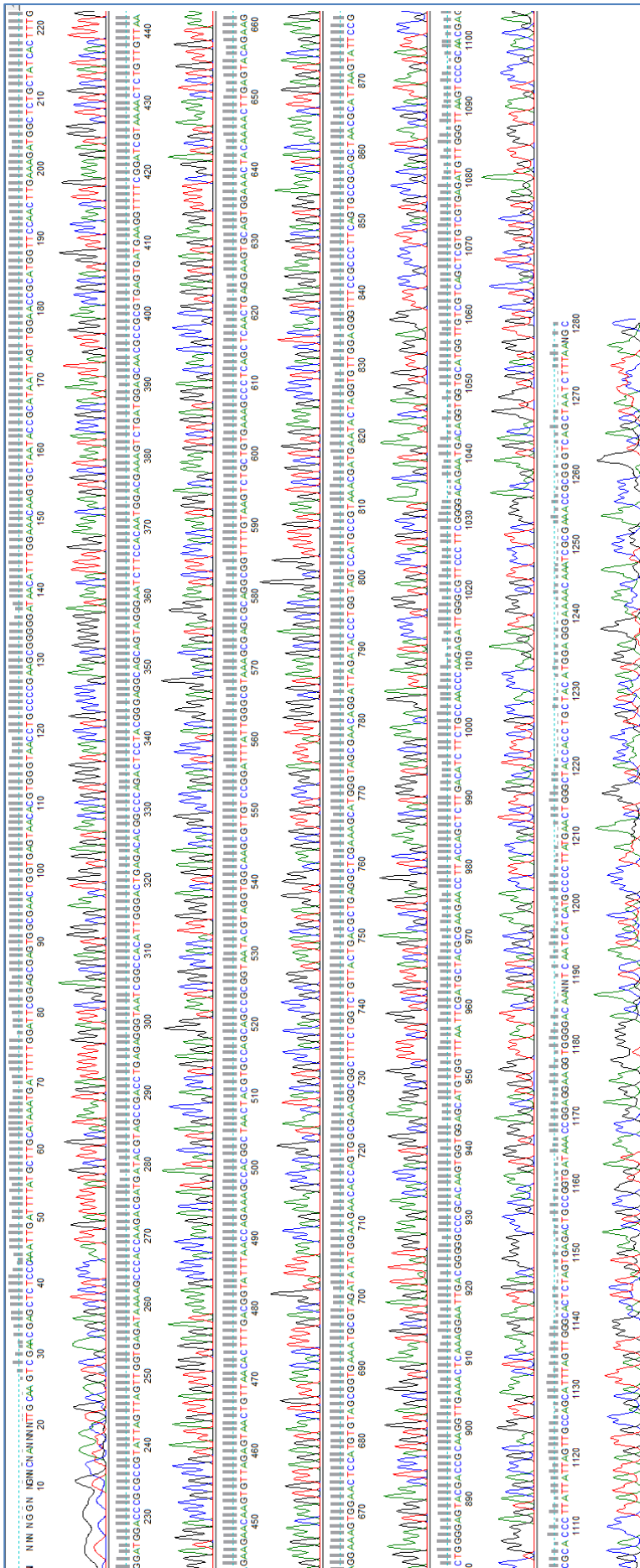
Şekil 4.6 MA43 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç

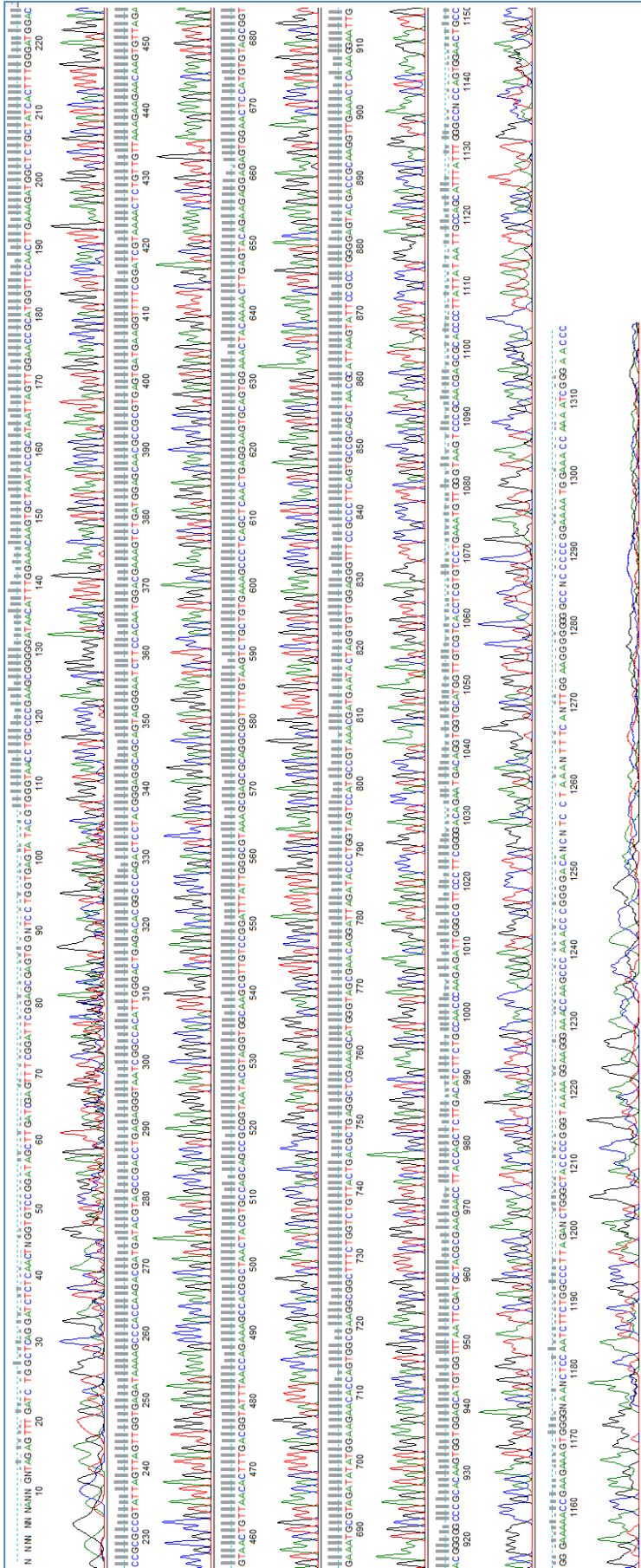
Çizelge 4.8. MA44 izolatına ait 16S rRNA sekansı

Primerler: 27F-1492R		MT381714.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i>			Benzerlik Oranı: %99.92	
1	AGCTCTCCCA	AATTGATTTT	ATGCTTGCAT	AAATGATTTT	TGGATTTCGGA	GCGAGTGGCG
61	AACTGGTGAG	TAACACGTGG	GTAACCTGCC	CCGAAGCGGG	GGATAACATT	TGGAAACAAG
121	TGCTAATACC	GCATAATTAG	TTGGAACCGC	ATGGTTCCAA	CTTGAAAGAT	GGCTCTGCTA
181	TCACCTTGGG	ATGGACCCGC	GCCGTATTAG	TTAGTTGGTG	AGATAAAAGC	CCACCAAGAC
241	GATGATACGT	AGCCGACCTG	AGAGGGTAAT	CGGCCACATT	GGGACTGAGA	CACGGCCCAG
301	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TAGGGAATCT	TCCACAATGG	ACGAAAGTCT	GATGGAGCAA
361	CGCCGCGTGA	GTGATGAAGG	TTTTCGGATC	GTAATACTCT	GTTGTTAAAG	AAGAACAAGT
421	GTTAGAGTAA	CTGTTAACAC	TTTGACGGTA	TTTAACCAGA	AAGCCACGGC	TAAGTACGTG
481	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	TAGGTGGCAA	GCGTTGTCCG	GATTTATTGG	GCGTAAAGCG
541	AGCGCAGGCG	GTTTTGTAAG	TCTGCTGTGA	AAGCCCTCAG	CTCAACTGAG	GAAGTGCAGT
601	GGAAACTACC	AACTTGAGT	ACAGAAGAGG	AAAGTGGAAC	TCCATGTGTA	GCGGTGAAAT
661	GCGTAGATAT	ATGGAAGAAC	ACAGTGGCG	AAGGCGGCTT	TCTGGTCTGT	TACTGACGCT
721	GAGGCTCGAA	AGCATGGGTA	GCGAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	TGCCGTAAAC
781	GATGAATACT	AGGTGTTGGA	GGGTTTCCGC	CCTTCAGTGC	CGCAGCTAAC	GCATTAAGTA
841	TTCCGCTTGG	GGAGTACGAC	CGCAAGGTTG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGGCCCCGAC
901	AAGTGGTGGG	GCATGTGGTT	TAATTCGATG	CTACGCGAAG	AACCTTACCA	GCTCTTGACA
961	TCTTCTGCCA	ACCCAAGAGA	TTGGGCGTTC	CCTTCGGGGA	CAGAATGACA	GGTGGTGCAT
1021	GGTTGTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT
1081	ATTATTAGTT	GCCAGCATTT	AGTTGGGCAC	TCTAGTGAGA	CTGCCGGTGA	TAAACCGGAG
1141	GAAGGTGGGG	ACGACGTCAA	ATCATCATGC	CCCTTATGAG	CTGGGCTACA	CACGTGCTAC
1201	AATGGATGGT	ACAACGAGTC	GCGAAACCGC	GAGGTCAAGC	TAATCTCTTA	AAGCCATTCT
1261	CAGTTCGGAT	TGCAGGCTGC	AACTCGCCTG	CATGAAGTTG	GAATCAC	

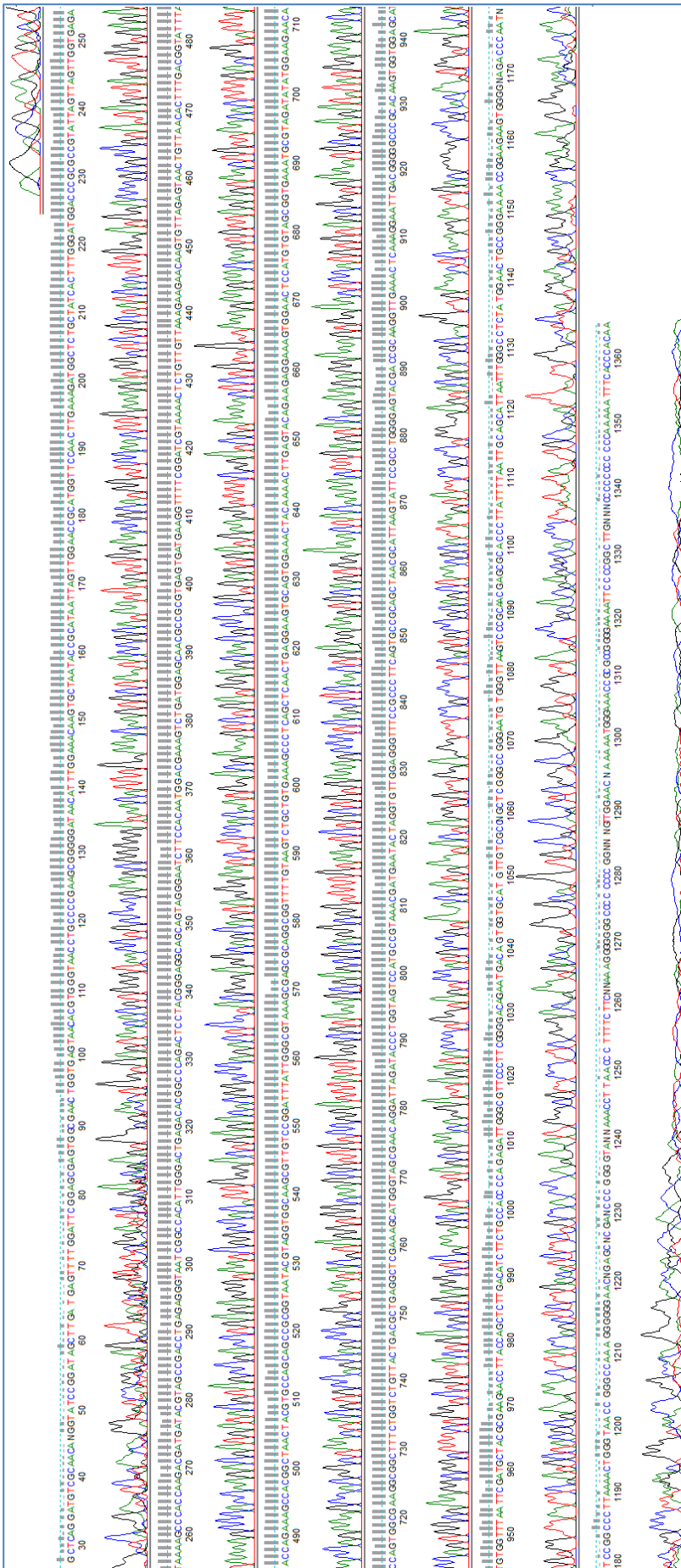


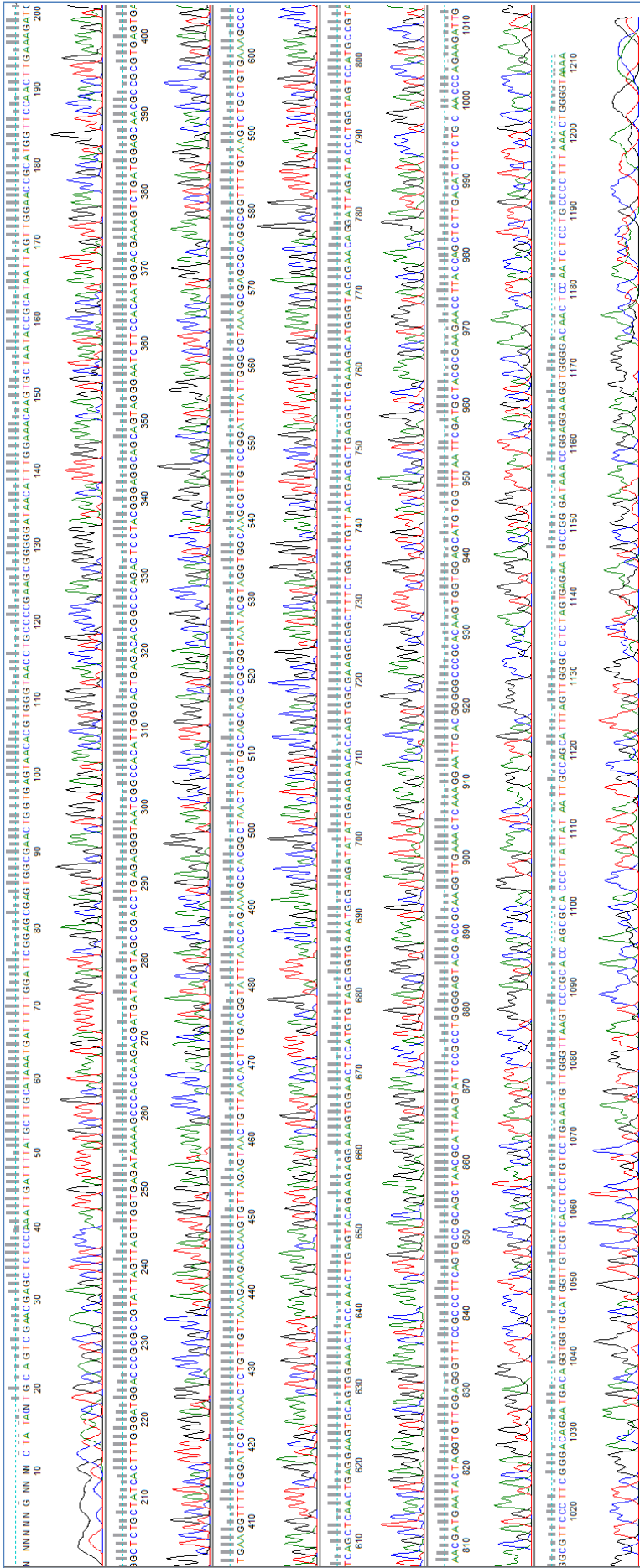
Şekil 4. 7 MA44 İzolatına Ait Filogenetik Ağaç





Şekil 4.10. *L. kunkeei* MA5 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü

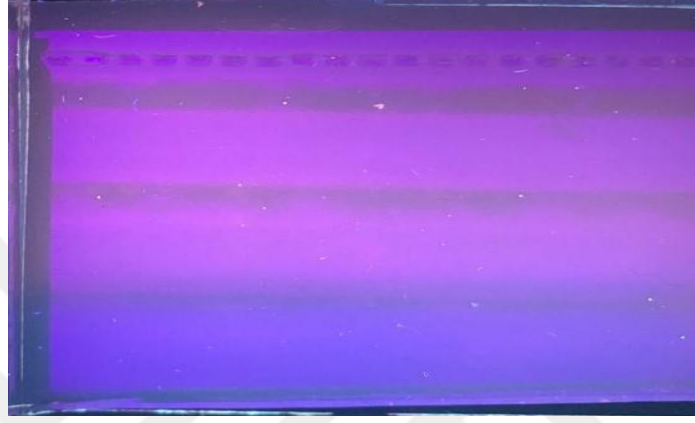




Şekil 4.12. *L. kumkei* MA44 İzolatının 16S rDNA Dizileme Sonucuna Ait Kromatogram Görüntüsü

4.3.1. İzolatlardan Plazmid DNA İzolasyonu

İzolatların kriptik plazmid DNA varlıklarını belirlemek amacıyla D6105 Quick-DNA Fungal/Bacterial Midiprep Kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu çalışması yapılmıştır. İzolasyon sıvısı %0.8 (w/v)'lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra transilluminator cihazında UV ışığı altında (OD_{260} nm) görüntülenmiş, fakat hiçbir izolat da kriptik plazmit DNA bulgusu belirlenememiştir (Şekil 4.8).



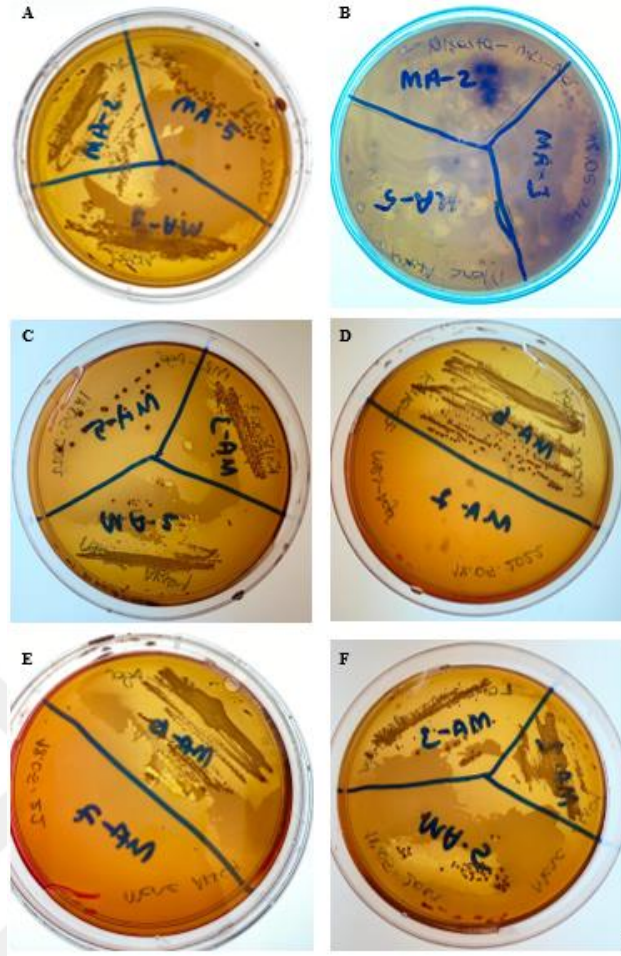
Şekil 4.13 İzolatlarda Kriptik Plazmit DNA Varlığının/Yokluğunun Agaroz Jelde Belirlenmesi

4.4. Suşların Enzim Aktiviteleri

İzolatların bazı enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla, uygun substratları içeren katı besi ortamlarında izolatlar kültüre alınmış, koloni gelişimleri tamamlandıktan sonra ise uygun boyalarla boyamaları yapılmıştır. Substratları içeren MRS-agar plaklarının boyama sonucundan, hiçbir izolatın laminarinaz, α -amilaz, ksilanaz, CMCaz ve likenaz enzim aktivitelerine sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14.).

4.5. Antibiyogram Testi

16S rRNA sekans analizi yapılan 5 adet izolatın antibiyogram testleri yapılmıştır. Test sonuçları tüm izolatların amfisilin, penisilin ve tetrasikline karşı değişik oranlarda (zon çapları göz önünde bulundurularak) duyarlı, sefotaksim ve spektinomisin antibiyotiklerine karşı ise dirençli olduklarını ortaya koymuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4. 14. İzolatların Farklı Substratlar İçeren MRS-Agar Plaklarında Enzim Aktivite Tayinleri (A: Likenaz, B: α -Amilaz, C-D: Ksilanaz, E: CMCaz, F: Laminarinaz)



Şekil 4.15. İzolatlara Ait Antibiyogram Testlerinin Plak Görüntüleri (P: Penisilin, AMP: Amfifilin, CTX: Sefotaksim, SH: Spektinomisin, TE: Tetrasiklin)

4.6. Tartışma

Fermentatif bakteri grubu olan laktik asit bakterileri (LAB), bu özellikleri ile fermente gıdaların üretiminde önemli bir rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda gerek insan gerekse hayvanlar için önemli probiyotik özelliklere sahip olan bu mikroorganizma grubu, canlıların bağırsak mikroflorasının da doğal konukçularıdır. *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait birçok LAB türü probiyotik olarak tanımlanmıştır (Diker, 2019).

Bir doğa koruma alanındaki mikroorganizma envanteri projesi, çiçeklerin bazen çiçek açmaya başladıkları andan itibaren böceklerden kaynaklanan yararlı bakteriler tarafından kirletildiği sonucuna ulaşmıştır. Bal arılarının nektar toplamak üzere uğradıkları çiçeklerden topladıkları bu yararlı bakterileri kovana ve peteklere taşımaları, bal ve polenin bu bakteriler ile bulaşması sonucunu doğurmaktadır (Olofsson ve Vasquez, 2018). Bir çalışmada bal arılarının midesinde dokuz adet *Lactobacillus* cinsine (*L. kunkeei*, *L. apinorum*, *L. mellifer*, *L. mellis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*, *L. helsingborgensis*, *L. kullabergensis* ve *L. apis*) ve dört adet *Bifidobacterium* cinsine (*B. coryneforme*, *B. asteroides* ve muhtemelen iki yeni *Bifidobacterium* türü) ait bakterilerden oluşan geniş bir mikrobiyata bulunduğunu ortaya koymuştur (Olofsson ve Vásquez 2008; Olofsson ve ark., 2014a,b).

Lactobacillus kunkeei bakterisinin ilk izolasyonu olan YH-15 suşu Kaliforniya'da şarap üretiminde zarar görmüş üzümlerden izole edilmiştir (Huang ve ark., 1996). Mayaları güçlü bir şekilde inhibe etmesi ve böylece şarabın bozulmasını önlemesi sebebiyle bu bakteri şarabın bozulmasına neden olan organizma olarak tanımlanmıştır (Edwards ve ark., 1998). Özellikle bal, arı ekmeği, şarap ve çiçek nektarı gibi früktoz bakımından zengin maddelerde bulunan *L. kunkeei*'nin bal arılarının sindirim sisteminden izolasyonunun daha çok yaz aylarında yapıldığını ortaya koyan çalışmalar artmaktadır (Uğraş, 2017).

Yapılan literatür taramaları, *L. kunkeei* bakterisine plazmit DNA taransformasyonu yapılan 1 adet çalışmanın olduğunu göstermektedir. Yapılan bu çalışmada pTW8 ve pTRKH2 plazmid DNA'ları *L. kunkeei*'nin YH15 ve 3L suşlarına transformasyonları gerçekleştirilmiş ve transformasyon etkinlikleri araştırılmıştır (Welker ve ark., 2020). Bu bakteri üzerinde klonlama çalışmalarının kısıtlı olması, *L. kunkeei*'nin yeni tanımlanan bir tür olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte, gerek arıcılıkta biyolojik mücadelede kullanım potansiyeli olması, gerekse probiyotik özellikler taşıması sebebiyle, gen klonlama yöntemleriyle bu bakteriye rekombinant enzim üretimi gibi bazı özelliklerin kazandırılması düşünülebilir. Bu durumda *L. kunkeei* suşlarında kullanılabilecek klonlama vektörlerinin nitelik ve nicelik olarak zenginleştirilmesi önemli hale gelmektedir. Bu çalışmada, yeni klonlama vektörlerinin geliştirilmesinde kaynak olarak kullanılabilecek *L. kunkeei* orijinli kriptik plazmit DNA'ların varlığı araştırılmıştır. Fakat her 5 adet izolatta da yapılan çalışmalar sonucunda herhangi bir kriptik plazmit DNA varlığına rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, ileride elde edilebilecek yeni izolatlarda kriptik plazmit DNA

varlığının araştırılması, yeni klonlama vektörlerinin geliştirilmesinde kaynak olarak kullanılabilecek bir kriptik plazmit DNA kütüphanesinin oluşturulması açısından önemlidir.

L. kunkeei bakterisinin bazı arı patojenlerine karşı inhibisyon ve koruyucu etki gösterdiğine dair literatürlerin yaygınlaşması, arı ve bazı arı ürünlerinden bu bakterilerin izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Arı midesi ile bal ve polenden yeni *L. kunkeei* bakterilerinin izolasyonunu amaçlayan bu çalışmada, izolasyonu gerçekleştiren 45 adet laktik asit bakterisinden 16S rRNA sekans sonuçlarına göre 5 izolatın da *L. kunkeei* bakterisi ile yüksek oranlarda benzerlik gösterildiği tespit edilmiştir. 16S rRNA geni yaklaşık 1.500 bp uzunluğunda, tüm bakterilerde aynı diziye sahip, son derece korunmuş bölgeler içermekte ve böylece bakterilerin tür ve alt-tür seviyesinde tanımlanmalarına olanak sağlamaktadır. 16S rRNA analizi yapılan 5 adet izolatdan 2 tanesi *L. kunkeei* ile %100 sekans benzerliği göstermiştir. Diğer 3 izolat her ne kadar yüksek oranlarda sekans benzerliği gösterse de, bu izolatlar için ayrıca belirli biyokimyasal testlerin uygulanması ve elde edilen sonuçların ilgili kaynaklardaki bilgiler ve tanımlama listeleri ile karşılaştırılarak daha kesin sonuçların ortaya konması, böylece moleküler tanı yönteminden elde edilen sonuçların biyokimyasal tanı yönteminden elde edilen sonuçlar ile desteklenmesi daha isabetli olacaktır.

L. kunkeei bakterisinin izolasyonuna yönelik çalışmalar kısıtlıdır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Uğraş (2017) Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen arıların bal midesinden izole ettiği bakteriyi 16S rRNA analizine göre *L. kunkeei* olarak tanımlamış ve bu bakterinin probiyotik özelliklerini araştırmıştır. Araştırmacının elde ettiği izolatın *Melissococcus plutonius* (Enterococcaceae)'a karşı inhibisyon etkisi göstermesi, bu türe ait izolatların gelecekte preparatlarının hazırlanarak, arıların bağışıklık sistemlerini destekleyici ve patojenlere karşı koruyucu etkilere sahip ürünlere dönüştürülebileceği fikrini güçlendirmektedir. Benzer şekilde Meradji ve ark. (2023) *Apis mellifera intermissa* ve işlenmemiş balıdan izole ettikleri toplam 100 adet LAB'dan 5 tanesini *Apilactobacillus kunkeei* olarak tanımlamışlardır. Heterofermentatif ve fruktofilik (karbon kaynağı olarak früktozu kullanan) bir LAB olması (Leska ve ark., 2023) *L. kunkeei*'nin balıdan izolasyonunu kolaylaştırabilir. Bal arılarının bal midesi ve polene ilave olarak balıdan *L. kunkeei* bakterisinin izolasyonuna yönelik çalışmaların bulunması bu görüşü desteklemektedir. Bununla birlikte, yapılan bu tez çalışmasında bal örneklerinden herhangi bir LAB izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu çalışmada kullanılan balların daha önce ısıtılma işlemlerinden geçirilmemiş (işlenmemiş) ballardan olması, öncesinde uygulanan ısıtılma işlemi sebebiyle doğal bakteri popülasyonlarının ortadan kalkmış olması olasılığını ortadan kaldırmaktadır. Diğer taraftan farklı coğrafyalarda üretilen ballarda bulunan *L. kunkeei* bakteri yoğunluğu farklılık gösterebilir. Nitekim *L. kunkeei* bakterisinin en yoğun Nepal'deki *A. laboriosa* balında (10^8 cfu/gr bal) ve ardından Afrika'daki *A. mellifera* balında bulunduğu rapor edilmiştir (Mathialagan ve ark., 2018; Endo ve ark., 2012; Rangberg ve ark., 2012; Corby-Harris ve ark., 2014). Bu tez çalışması kapsamında bal örneklerinden herhangi bir LAB'nin izole edilememiş

olması, çalışmada kullanılan bal örneklerinin, üretildiği coğrafik koşullara bağlı olarak oldukça düşük popülasyon yoğunluğuna sahip LAB'leri içermesi ve bu sebepten dolayı herhangi bir LAB izole edilebilmiş olması olasılığı ile açıklanabilir. *L. kunkeei* bakteri yoğunluğu sadece coğrafik farklılıklara göre varyasyon göstermekle kalmayıp bal arılarının tür farklılıklarına göre de değişiklik gösterebilir. Zira bu bakteri türünün aynı zamanda *Apis dorsata*'nın bal midesinde de baskın olduğu bildirilmiştir (Tajabadi ve ark., 2011). Günümüzde tüm dünyada bal arılarında koloni çöküş bozuklukları arasında ki en önemli faktörlerden birinin aralarında viral hastalıklar, Tayland yavru çürüklüğü (TSBV), Avrupa yavru çürüklüğü (AvYÇ), parazitik akar *Varroa jacobsoni*'nin de yer aldığı stres faktörlerinin olduğu bildirilmektedir (Ellis ve ark., 2013; Rao ve ark., 2016; Mathialagan ve ark., 2017). Etkili kontrol önlemlerinin yetersiz oluşu ve balda bulunan antibiyotik kalıntıları dikkate alındığında, stres faktörü olan bu hastalık ve zararlı etmenlerini kontrol etmek için alternatif stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Mathialagan ve ark., 2018). Bu sebeple, bal arılarının bal midesi gibi vücut kısımlarından ve bal arısı ürünlerinden *L. kunkeei* bakterilerinin izolasyonu, bu izolatlardan uygun prepparatların hazırlanması ve bu preparatların kovanlarda kullanılması bal arıların stresin üstesinden gelmelerine ve sağlıklarını sürdürmelerine yardımcı olabilir.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında bal arısı ile bal arısı ürünleri olan bal ve polenden 44 adet laktik asit bakterisinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gram boyama tüm izolatların Gram (+) olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca yine tüm izolatlar katalaz testinde negatif sonuçlar üretmişlerdir. Bu izolatlar arasından rastgele seçilen 5 adet izolat için 16S rRNA sekans analizi yaptırılmış, sekans analizlerinin benzerlik testleri (alignment) bu 5 adet izolatın %100 ile %99,79 arasında değişen oranlarda *L. kunkei* bakterisi ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. İzolatların hiç birisi CMCaz, α -amilaz, ksilanaz likenaz ve laminarinaz enzim aktiviteleri bakımından pozitif sonuç ortaya koymamıştır. Bu bulgular göz önünde bulundurularak, çalışma ile ilgili aşağıda belirtilen önerilerde bulunulabilir:

1. Çoğunlukla 16S rRNA geni yaklaşık 1,500 bp uzunluğunda, tüm bakterilerde aynı diziye sahip, son derece korunmuş bölgeler içermekte ve böylece bakterilerin tür ve alt-tür seviyesinde tanımlanmalarına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte bu çalışma kapsamında elde edilen izolatlar için ayrıca belirli biyokimyasal testler uygulanabilir ve elde edilen sonuçların ilgili kaynaklardaki bilgiler ve tanımlama listeleri ile karşılaştırılabilir. Böylece moleküler tanı yönteminden elde edilen sonuçlar biyokimyasal tanı yönteminden elde edilen sonuçlar ile desteklenebilir.
2. Elde edilen izolatların nosema ve varroa gibi bir takım arı hastalık ve zararlıları üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.
3. Elde edilen izolatların probiyotik ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmelidir.
4. Tüm bu ilave çalışmalar sonucunda izolatların probiyotik özellik göstermesi, nosema ve varroa gibi bir takım arı hastalık ve zararlılarına karşı koruyucu özellik ortaya koyması durumunda, bu izolatların bireysel veya karışım olarak kullanılacağı preparatlar hazırlanabilir ve bu preparatlar kovanlarda arıların bağışıklık sistemlerini destekleyici ürünler olarak kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- Açık, M. N. 2023. The Most Important Etiological Agent of Nosema Disease in Honey Bees: *Nosema ceranae*. International Journal of Food Agriculture and Animal Sciences, 3(1): 24-39.
- Akyol E., Korkmaz A., 2008. Peteklerin Büyük Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ne Karşı Korunmasında-5°C Soğuk Uygulamasının Etkisi. Ulusal Arıcılık Dergisi, 8(1): 26-29.
- Aldemir S., Tunca R. İ., Topal E., Margaoan R., 2019. Bal Arılarının Bağırsak Yapısına Etki Eden Faktörler. Journal of Apiculture Research, 11(1): 28-34.
- Alponsus E. C., 1935. The Cause of Dysentery in Honeybees, 28(3): 568-576.
- Anderson K. E., Sheehan T. H., Eckholm B. J., Mott B. M., Hoffman G. D., 2011. An Merging Paradigm of Colony Health: Microbial Balance of the Honey Bee and Hive (*Apis mellifera*), 58: 431-444.
- Anonim 1: <http://www.genbilim.com/fen-bilimleri/biyoloji/arycylydyn-tarymsal-uretimdeki-yeri-ye-onem/> [Son erişim tarihi: 11.08.2023]
- Arıgül Apan, M., Zorba, M., Kayaboynu, Ü., 2021. Bal Arısı ve Bal Arısı Ürünleri, 6(2): 202-223.
- Arredondo D., Castelli L., Porrini M. P., Garrido P. M., Eguaras M. J., Zunino P., Antunez K., 2017. *Lactobacillus kunkeei* Strains decreased the Infection by Honey Bee Pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*, 9 (2): 279 – 290.
- Asama T., Arima T. H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y., Tatefuji Y., Hashimoto K., 2015. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from Honey Bee Products Enhances IgA Production in Healthy Adults, 119: 818-826.
- Asenjo F., Olmos A., Pisculich P., Polanco V., Aldea P., Ugalde J. A., Trombert A. N., 2016. Genome sequencing and analysis of the first complete genome of *Lactobacillus kunkeei* strain MP2, an *Apis mellifera* gut isolate.
- Aydın L., Güleğen E., Çetinbaş H., 2001. Bursa yöresi bal arılarında *Nosema apis*' in (Zander, 1909) Yaygınlığı. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana, 2001. Topçu B, Arslan M. Ö., 2004. The Prevalence of Nosemosis in Honey Bee in the Province of Kars. 164-170.
- Aydın Y., Tekeloğlu İ., 2018. Tamamlayıcı Tıp ve Güncel Apiterapi Uygulamaları, 2(2):64-73.
- Bal M., 2020. Farklı Bitkilerden ve Arı Sindirim Sisteminden Potansiyel Probiyotik Fruktofilik Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 89s.
- Berrios P., Fuentes J.A., Salas D., Carreno A., Aldea P., Fernandez F., Trombert A. N., 2017. Inhibitory Effect of Biofilm-Forming *Lactobacillus kunkeei* Strains Against Virulent *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro and in Honeycomb Moth (*Galleria mellonella*) Infection Model, 9 (2): 257 – 268.

- Betts, A.D. 1932. Fungus Diseases of Bees. Bee World 40:156.
- Borum A. E., 2021. Bal Arılarında Probiyotik Bakterilerin Kullanımı, 21 (1): 104-118.
- Borum E., 2014. Arıların Yavru Çürüklüğü İnfeksiyonlarında Doğru Teşhis, Mücadele ve Korunma Yöntemleri. 1(44): 44-55.
- Buchmann, S. L., Nabhan, G. P., 1996. Forgotten Pollinators. Island Pres, Washington, D.C.
- Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, T. C., Karlsson, C., Malmström, J., Vásquez, A., 2013. Proteins of Novel Lactic Acid acteria from *Apis mellifera mellifera*: an Insight Into the Production of Nown Extra- Cellular Proteins During Microbial Stress. BMC Microbiol. 22:13:235. doi:10.1*186/1471-2180-13-235.
- Chege, M., Kinyua, J., Paredes, J. C., 2023. *Lactobacillus kunkeei* Impacts the Health of Honey Bees, *Apis mellifera scutellata*, and Protects the Bees Against the Opportunistic Pathogen *Serratia marcescens*, 43: 1947–1955.
- Claverys, J.P., 2006. Induction of Competence Regulons as General Stress Esponses in Gram Positive Bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 60: 451-475.
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K. E., 2014. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. 9:(4), e95056.
- Crane, E., 1984. The World's Beekeeping: Past and Present. Ed: Dadant and Sons. The Hive and the Honey Bee. Dadant and Sons Inc. İllinois. 1-18.
- Çakmak, I., 1999. Honeybees and Agriculture, 3(7): 7-9.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F., 2010. Lactic Acid Bacteria–Potential for Control of Mould Growth and Mycotoxins: a Review Food Control 21: 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>.
- Danihlík, J., Aronstein, K., Petřivalský, M., 2016. Antimicrobial Peptides: A Key Component of Honey Bee İnnate İmmunity. J Apic. Res. doi:<https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>.
- Diker, E., 2019. Baldan İzole Edilen *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 86s.
- Doğaroğlu, M., Sıralı, R., Survey Esults on Honey Bee Estsand Diseases in Thracian Region of Turkey. Uludag Bee J, 5: 71-78.
- Edwards ,C. G., Haag, K. M., Collins M. D., Hutson, R. A., Huang, Y. C., 2002. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov. : A Spoilage Organism Associated with Grape Juice Fermentations. 10.1046/j.1365-2672.1998.00399.x.
- Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D., Hutson, R. A., Huang, Y.C., 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a Spoilage Organism Associated with Grape Juice Fermentations, 84: 698-702.

- Edwards, C. G., Haag, K. M., Semon, M. J., Rodriguez, A. V., Mills, J. M., 1999. Evaluation of Processing Methods to Control the Growth of *Lactobacillus kunkeei*, a Micro-Organism Implicated in Sluggish Alcoholic Fermentations of Grape Musts, 20(1).
- Ellis, J.D., Evans, J. D., Pettis, J., 2010. Colony Losses, Managed Colony Population Decline and Colony Collapse Disorder in the United States, Journal of Apicultural Research 49: (1), 134-136.
- Evans, J. D., Lopez, D. L., 2004. Bacterial Robiotics Induce an Immune Response in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae), 97(3):752-6. doi:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:bpiair]2.0.co;2.
- Genç, F., Dodoloğlu, A., 2002. Arıcılığın Temel Esasları. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. No:166, 338 s, Erzurum.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in Honey Bees and its Causative Agent, *Paenibacillus larvae*. J Invertebr Pathol. 103Suppl 1: S10-9. doi:10.1016/j.jip.2009.06.015.
- Gross, H. J., Pahl, M., Si A., Zhu, H., Tautz, J., Zhang, S., 2009. Number-Based Visual Generalisation in the Honey Bee, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004263>.
- Gurung, M., B., Partap, U., Shrestha, C., Sharma, H. K., Islam, N., 2012. Beekeeping Training for Farmers in the Himalayas – Resource Manual for Trainers. Kathmandu: ICIMOD.
- Güler, A., 2006. Bal arıları (*Apis mellifera l.*)’nda Yapay Tohumlama ve Türkiye İçin Önemi, 21(3): 370 – 378.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2005. Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri. (3)11:361-371.
- Hmood, K. A., Habeeb, A. H., Al- Mhanna, K. I., 2019. Antioxidant role of *Lactobacillus* sp. Isolated from Honey Bee Against Histological Effects of Ochratoxin in Vivo, 11:(5).
- Huang, Y.C., Edwards, C.G., Peterson, J.C., Haag, K.M., 1996. Relationship Between Sluggish Fermentations and the Antagonism of Yeast by Lactic Acid Bacteria. 47: 1-10.
- Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology.
- Ilyasv, R. A., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., Nikolenko, A. G., 2012. Review of The Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis mellifera* l. J Apic Sci. 56(1): 115-123. doi:<https://doi.org/10.2478/v10289-012-0013-y>.
- Janashia, I., Alaux, C. C., 2016. Specific Immune Stimulation by Endogenous Bacteria in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). 109: 1474–1477. <https://doi.org/10.1093/jee/tow065>.
- Kacaniova, M., Gasper, J., Terentjeva, M., Kunova, S., Kluz, M., Puchalski, C., 2018. Antibacterial Activity of Bees Gut Lactobacilli Against *Paenibacillus larvae* in Vitro.. 2 (1): 7-10. doi: <https://doi.org/10.1515/arls-2018-0020>.
- Karacaoğlu, M., Fıratlı, Ç., 1998. Bazı Anadolu Bal Arısı Ekotipleri (*Apis mellifera anatoliaca*) ve Melezlerinin Özellikleri, 22: 17-21.

- Karadeniz, T., 2012. Meyve Yetiştiriciliğinde Polinasyonun Önemi, Verim ve Kaliteye Etkisi. 3. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi (01-04 Kasım 2012) Bildiriler Kitabı. Sayfa 275-282. Muğla.
- Kazimierczak-Baryczko, M., Szymaś, B. 2006. Improvement of the Composition of Pollen Ubstitute for Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Through mplementation of Robiotic Preparations. J. Apic. Sci. 50: 15–23.
- Kesdek, M., 2012. Bal Arılarının Tozlaşmadaki Önemi. 3. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi (01-04 Kasım 2012) Bildiriler Kitabı. Sayfa 299-306. Muğla.
- Kırpık M. A., Gülen M., 2014. Ülkemizde Arıcılık Faaliyetleri, 1(1): 37-46.
- Korkmaz, A., 2013. Anlaşılabilir Arıcılık. Samsun Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Yayını, İlkadım, Samsun. *Lactobacillus* spp. isolated from the Honey Comb of the Honey Bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA Gene Sequencing. J. Apic. Res. 52: 235–241. doi:10.3896/ibra.1.52.5.10
- Kumova, U., 2004. Varroa ile Mücadele Yöntemleri, 2(83): 131.
- Kwong, W. K., Moran N. A., 2013. Cultivation and haracterization of the Gut Symbionts of Honey Bees and Bumble Bees: escription of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a Member of the Family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria , and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a Sister Taxon to the Order ‘ Enterobacteriales ’ of the Gammaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013), 63: 2008–2018. Doi: 10.1099/ijls.0.044875-0.
- Kwong, W. K., Moran, N. A., 2013. Cultivation and Characterization of the Gut Symbionts of Honey Bees and Bumble Bees: Description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a.
- Laidlaw, H. H., Page R. E., 1997. Queen Rearing and Bee Breeding. Wicwas Press, USD.
- Lampeitl, F., 2007. Arıcılık. Bilge Kültür Sanat, İstanbul, 182s.
- Leska, A., Nowak, A., Rosicka-Kaczmarek, J., Ryngajłło, M., Czarnecka-Chrebelska, K. H., 2023. Characterization and Protective Properties of Lactic Acid Bacteria Intended to Be Used in Probiotic Preparation for Honey Bees (*Apis mellifera* L.)-An In Vitro Study. Animals, 13, 1059.
- Lorizzo M., Lombardi S. J., Ganassi S., Testa B., Laniri M., Letizia F., Succi M., Tremonte P., Vergalito F., Cozzolino A., Sorrentino E., Coppola R., Petrarca S., Mancini M., Cristofaro A., 2020. Antagonistic Activity Against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains 9(5): 262. <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/262>.
- Martinson, V.G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N.A., 2011. A Simple and Istinctive Microbiota Associatedwith Honey Bees and Bumble Bees. Molecular Ecology, 20,3, s., 619–628. doi:10.1111/J.1365-294x.2010.04959.X.

- Mathialagan, M., Johnson Thangaraj Edward, Y. S., David, P. M. M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M. R., Mohankumar, S., 2018. Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees, 7(4): 894-906.
- Mathialagan, M., Johnson, T., Edward, Y. S., David, P. M. M., Srinivasan, M. R., Mohankumar, S., Senthilkumar, M., 2017. A Survey in Tamil Nadu of *Varroa jacobsoni* (Oudemans) Ectoparasitic on Indian Honey Bees, 5 (6): 190-200.
- McGregor, S.E., 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agriculture Handbook 496. Washington Dc., U.S. Depart. of Agric., 411s.
- Memmedov H., Aldemir O., Aliyev E., 2018. Propolisin Antikanser Etkisi, 10(1):20-27.
- Meng X., Gangoiti J., Wang X., Grispstra P., Leeuwen S. S., Pijning T., Dijkhuizen L., 2018. Biochemical characterization of a GH70 protein from *Lactobacillus kunkeei* DSM 12361 with Two Catalytic Domains Involving Sucrase Activity. 102: 7935–7950.
- Meradji, M., Bachtarzi, N., Mora, D., Kharroub, K., 2023. Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Algerian Honey Bee and Honey and Exploration of Their Potential Probiotic and Functional Features for Human Use Foods, 12: 2312.
- Moran, NA 2015. Genomics of the Honey Bee Microbiome. Current Opinion in Insect Science, 10: 22–28. Doi: 10.1016/j.cois.2015.04.003.
- Mutlu C., Erbaş M., Tontul S. A., 2016. Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, 15(1):75-83.
- Muz MN., Solmaz H., Yaman M., Karakavuk M., 2012. Kış Salkımı Erken Bozulan Arı Kolonilerinde Paraziter ve Bakteriyel Patojenler. YYU Vet Fak Derg, 23(3): 147-150.
- of Food Agriculture and Animal Sciences, 3 (1): 24-39. Adnan, A.F.M., Tan, I.K., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. Bioresource Technology, 98(7): 1380-1385.
- Olofsson, T., Vasquez, A., 2018. Honey Bee-Specific Bifidobacteria and Lactobacilli In: The Bifidobacteria and Related Organisms. Eds: Mattarelli, P., Biavati, B., Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. Academic Press, Pages, 235-241, ISBN 9780128050606.
- Olofsson, T.C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E., Vásquez, A., 2014a. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov., and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 3109-3119.
- Olofsson, T.C., Butler, E., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A., 2014b. Lactic acid bacterial symbionts in Honey bees an unknown key to honeys antimicrobial and therapeutic activities. Wound J. Int 13 (5), 668-679.
- Olofsson, T.C., Vásquez, A., 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honey bee *Apis mellifera*. Curr. Microbiol. 57, 356–363.

- Olofsson, TC., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A. 2016. Lactic Acid Bacterial Symbionts in *Honey bees*-an Unknown ey to Honey's Antimicrobial and Therapeutic Activities. *Int Wound J.* 13(5): 668-679. doi: 10.1111/iwj.12345.
- Omeonu, F. C., Onilude, A.A., Azuh, V.O., Laba, S.A., 2022. Phylogenetic Identification and Some Physiological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Oral Cavities of Some Selected Students from University of Ibadan, Nigeria. *Journal of Advances in Microbiology*, 22(8), 70–83. <https://doi.org/10.9734/jamb/2022/v22i830482>
- Ordu Ticaret Borsası, 2020. Arıcılık Raporu, Dünya’da Toplam Kovan Sayısı ve Verimliliği (FAO, 2018).
- Özbilgin, N., 1999. Bitkisel Üretimde Tozlaşma ve Tozlaşmada Arıların Rolü ve Önemi. ETAE Polinasyon Projesi (16-18 Şubat 1999). Menemen- İzmir.
- Özcan., B.D., Özcan, N., Baylan, M., Güzel, A.İ., 2013. Cloning and Expression of β -1,3-Glucanase Gene from *Cellulosimicrobium cellulans* in *Escherichia coli* DH5 α . *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(3): 523-528. Doi: 10.9775/kvfd.2012.8225
- Özdemir, G., Özcan, B.D., 2020. Sıcaklığa Dirençli α -Amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2): 146-153.
- Pachla, A., Wicha, M., Ptasińska, AA., Borsuk, G., Trokenheim, ŁŁ., Małek, W. 2018. The Molecular and Phenotypic Characterization of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the Guts of *Apis mellifera* L. Derived from a Polish Apiary. *J. Appl. Genet.* 59, 503–514. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0467-0>.
- Pătruică, S., Dumitrescu, G., Popescu, R., Filimon, NM. 2013. The ffect of Prebiotic and Probiotic Products Used in Feed to Stimulate the Bee Colony (*Apis mellifera*) on Intestines of Working Bees. *J. Food. Agric. Environ.* 11: 2461–2464.
- Rangberg, A., Diep, D.B., Rudi, K., Amdam, G.V., 2012. Paratransgenesis: an approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*). *Integrative Comparative Biology* 52 (1): 89-99.
- Rao, K.M., Katna, S., Rana, B.S., Rana, R., 2016. Thai sacbrood and sacbrood viruses versus European foulbrood of hive bees in India - a review. *Journal of Apicultural Research* 1-8. Doi: 10.1080/00218839.2016.1145417.
- Raymann, K., Bobay LM., Moran NA. 2018. Antibiotics Reduce Genetic Diversity of Core Species in the Honey Bee Gut Microbiome. *MolEcol.* 27(8): 2057-2066. Doi:10.1111/mec.14434.
- Raymann, K., Moran, NA. 2018. The Role of the Gutmicrobiome in Health and Disease of Adult Honey Bee Workers. *Curr. Opin. Insect. Sci.* Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>.

- Rinderer T E., Guzman L. L., Delatte G. T., Stelzer J. A., Lancaster V. A., Kuznetsov V., Beaman L., Watts R., Harris J. W., 2001. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in Honey Bees From far-eastern Russia, 32(4): 381 – 394.
- Ruttner F., 1988. Morphometric Analysis and Classification In: Biogeography and Taxonomy of Honey Bees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 978-3-642-72649-1. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>.
- Sandi, NA., Salasia, SIO. 2016. Alternative Antibiotics Source From Symbiont of Lactid Acid Bacteria Inside Stomach of *Honey bees (Apis mellifera and Apis dorsata)* Against Multiresistant Antibiotics Pathogenic Bacteria. Res J. Microbiol. 11(2-3): 93-100. doi: <https://doi.org/10.3923/jm.2016.93.100>.
- Schnürer, J., Magnusson, J. 2005. Antifungal Lactic Acid b as Biopreservatives. Trends Food Sci Technol 16:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>.
- Shabnam P., Gholamhosein T, Alimorad S., Sohrab I., Naser T., 2018. Isolation and Identification of Lactobacillus Bacteria Found in the Gastrointestinal Tract of the Dwarf *Honey bee, Apis florea Fabricius*, 1973 (Hymenoptera: Apidae). 49: 430-438.
- Silici S., Özkök D., 2009. Bal arısı biyolojisi ve yetiştiriciliği. Efil Yayınevi, Ankara, 236s.
- Soomro A.H., Masud T., 2007. Protein Pattern and Plasmid Profile of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi, A Traditional Fermented Milk Product of Pakistan. Food Technology and Biotechnology, 45, 447-453.
- Suyabatmaz Ş., Bozdeveci A., Karaoğlu Ş., 2020. Bal Arılarında Gastrointestinal Bakteriyel Flora 20 (1): 97-113.
- Szymaś, B., Łangowska, A., Kazimierczak Baryczko, M. 2012. Obraz Histologiczny Jelitas'rodkowego Pszczół (*Apis mellifera* L.)_zywionych amiatkami Pyłku Kwiatowego Wzbogaconymi Probiotykami. J. Apic. Sci. 56:5–12. doi: <https://doi.org/10.2478/v10289-012-00012>.
- Şimşek, H., 2005. Elazığ yöresi Bal Arılarında Bazı Parazit ve Mantar Hastalıklarının Araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 52: 123-126.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M., Y., A., Shuaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L., 2011. Detection and Identification of *Lactobacillus* Bacteria Found in the Honey Stomach of the Giant Honey Bee *Apis dorsata*, 42: 642–649.
- Tamarit, D., Ellegaard, K., M., Wikander, J., Olofsson, T., Vasquez, A., Andersson, S., G., V., 2015. Functionally Structured Genomes in *Lactobacillus kunkeei* Colonizing the Honey Crop and Food Products of Honey Bees and Stingless Bees, 1455–1473.
- Teather, R.M., Wood, P.J., 1982. Use of Congo-red Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. Appl. Environ. Microbiol. (43): 777-780.

- Topal, E., Adamchuk, L., Negri, I., Kösoğlu, M., Papa, G., Dârjan, M., S., Cornea-Cipcigan, M., Mărgăoan, R., 2021. Traces of Honey Bees, Api-Tourism and Beekeeping: From Past to Present. *Sustainability*, 13, 11659. <https://doi.org/10.3390/su132111659>.
- Uğraş, S., 2017. Yığılca (Türkiye) Bal arılarının Bal Midelerinden Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve Probiyotik Özelliklerinin Karakterizasyonu. *Türk Entomoloji Dergisi*, 41(3): 253-261.
- Uygur, S.O., Girişgin, A.O. 2008 Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. *U. Arı Drg.* 8(4):130-142.
- Vasileva, T., Bivolaski V., Michailova, G., Salim, A., Robadjiev, Y., Ivanova, I., Iliev, I., 2016. Glucansucrases Produced by Fructophilic Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus kunkeei* H3 and H25 Isolated from Honey Bees.
- Vasquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton R., J., Flaberg, E., et al., 2012. Correction: Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honey Bees, 7(7): 10. 1371/annotation/3ac2b867-c013-4504-9e06-bebf3fa039d1.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C., 2009. The Lactic Acid Bacteria Involved in the Production of Bee Pollen and Bee Bread. *J. Apic. Res.* 48: 189–195. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>.
- Winston, M. L., 1987, *The Biology of the Honey Bee*, Harvard University Press, ABD, 294s.
- Wright, A.V., Morelli, L., Vogensen, F.K., 2004. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press. Third Edition.
- Yılmaz, K., 2016. Bal Arılarının Bitkisel Üretimdeki Önemi. *Ordu'da Tarım*. Yıl 20, sayı 118s, 1-2. Ordu.
- Yılmaz, M. T., İspirli, H., Taylan, O., Bilgrami, A. L., Dertli, E., 2022. Structural and Bioactive Characteristics of a Dextran Produced by *Lactobacillus kunkeei* AK1. 293-302.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. *Gıda*, 34(2): 91-98.

ÖZGEÇMİŞ

Merve AKSOY, İlk öğrenimini Çınarlı İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. Orta öğrenimini Mustafa Kemal İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. Lise öğrenimini Demirçelik Lisesi'nde tamamlamıştır. 2016 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Zootekni Lisans Bölümünden 2020 yılında mezun olmuştur. 2018 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Lisans Bölümünden 2023 yılında mezun olmuştur. 2020 yılında Çukurova Üniversitesi Zootekni Bölümü Genetik ve Biyometri Ana Bilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

