

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI



ELAZIĞ İLİNDE BALARILARINDA
GÖRÜLEN NOSEMA TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER AYRIMI VE SUBKLİNİK
VAKALARIN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEKLİSANS TEZİ

MEHMET ILGIN

2020

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

...Prof.Dr. Cem Ecmel ŞAKİ.....

...Prof.Dr. Münir AKTAŞ.....

...Prof.Dr. Armağan Erdem ÜTÜK

.....

.....



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Mehmet ILGIN

Tarih

İmza

Danışman

Anabilim Dalı

ELAZİĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ'ye araştırma süresince laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e ve Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK'e, araştırmanın istatistiksel analizlerinin yapımında büyük katkısı olan Prof. Dr. Ü. Gülcihan ŞİMŞEK'e, tez çalışması süresince yardım ve desteğini esirgemeyen Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Ünal KILINÇ ve Müdür Yardımcısı Bünyamin İREHAN'a, çalışma süresince bana desteklerini hiç eksik etmeyen mesai arkadaşlarım Dr. Aysel İTİK EKİNCİ, Kerem KARAKUŞ ve Veysel UZUN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KAPAK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1 Arıcılığın Tarihi ve Gelişmesi	3
3.2 Tarımdaki Önemi ve Uygulanabilirliği	4
3.3 Arıcılığın Ülke Ekonomisindeki Yeri ve Önemi:	5
3.4 Balarısı Sistematigi, Irkları ve Kolonisi	5
3.5 Dünya ve Türkiye’deki Arıcılıkla İlgili Güncel Veriler	8
3.6 Nosemosis	9
3.6.1 <i>Nosema</i> Sistematigi ve Türler	10
3.6.2 Etiyoloji ve Gelişme	11
3.6.3 Bulaşma, Semptomlar ve Patogenez	13
3.6.4 Teşhis ve Tedavi	16
3.6.5 Nosemosis’in Dünyada ve Türkiye’deki Varlığı	17

4. GEREÇ VE YÖNTEM	21
4.1 Saha ve Örneklerin Toplanması	21
4.2 Laboratuvar İncelemeleri	22
4.2.1 Örneklerin Hazırlanması	22
4.2.2 Mikroskopik İncelemeler	22
4.2.3 Moleküler İncelenmeler	23
4.2.3.1 PZR Aşamasına Örneklerin Hazırlanması	24
4.2.3.2 Multipleks PZR Aşaması	25
4.2.4 İstatiksel Analiz	21
5. BULGULAR	27
5.1 Mikroskopik Analiz Sonuçları	27
5.2. Spor Sayımı	31
5.3 Moleküler Analiz Sonuçları	33
6. TARTIŞMA	35
7. KAYNAKLAR	38
8. ÖZGEÇMİŞ	422

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>Nosema apis</i> ve <i>Nosema ceranae</i> sporlarının elektron mikroskopik görüntüsü	11
Şekil 2. <i>Nosema apis</i> 'in hayat döngüsü	13
Şekil 3. Elazığ il haritası	21
Şekil 4. A.Neubauer lamı B.Spor sayımı yapılacak alanlar (48)	23
Şekil 5. Mikroskopta <i>Nosema</i> sporlarının görünüşü (orijinal) (X 40).	29
Şekil 6. Neubauer lamda sayım alanındaki sporların görünümü	31
Şekil 7. Nosemosis enfeksiyonun hastalık etkenlerinin agaroz jel elektroforezi	34



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Primer dizilimleri ve özellikleri	24
Tablo 2. Odaklardan toplanan işçi arı sayısı	27
Tablo 3. Tespit edilen spor sayılarının odaklardaki arı başına düşen aylık ortalamaları ($\times 10^6$ spor/ml).	28
Tablo 4. 2019 yılı süresince çalışmada örnek toplanan arılıklarda aylara göre ortalama sıcaklık ve nem (nisbi) oranları	30
Tablo 5. Odakların aylara göre spor sayısı karşılaştırılması	32
Tablo 6. Sporlar ile sıcaklık ve nem arasındaki ilişki değerleri	33



1. ÖZET

Balarısı (*Apis mellifera* Linnaeus) insan sağığı ve beslenmesi için önemli katkılar sağılayan bal, arı sütü, polen, propolis, bal mumu ve arı zehri gibi ürünleri ile tarım ürünlerinin polinizasyonuna da büyük katkıları olan önemli canlılardandır. Günümüzde ise bu faydalarına büyük oranda zarar veren hastalıklarının arttığı ve yararlarının kısıtlanmasına sebep olduğu görölmektedir. Bu hastalıkların en önemlilerinden bir tanesi de nosemosistir.

Nosemosis, *Nosema apis* veya *Nosema ceranae* türlerinin ergin bal arılarının sindirim sistemlerinde bozukluklara yol açan önemli bir arı hastalığıdır. Etkenler kimi zaman tek başına kimi zaman da miks enfeksiyonlara sebep olmaktadır.

Bu çalışmada, Elazığ ili, Sivrice ilçesinde sabit üç arılıktan 12 ay boyunca her ay toplanan en az 20 adet ölü ya da canlı işçi arıdan oluşan materyaller Fırat Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarında mikroskobik ve moleküler olarak incelenmeye alınmıştır. Materyalin mikroskobik incelenmesinde tümünde *Nosema* sporları tespit edilmiş olup daha sonraki aşamada mütipleks PZR yapılarak pozitif örneklerin tamamında hastalık etkeninin *N. ceranae* olduğu belirlenmiştir.

Elazığ ilinde yapılan bu tez çalışması ile moleküler düzeyde ilk defa *Nosema ceranae* belirlenmiş olup yine ilk defa Elazığ Sivrice’de yıl boyu subklinik vakaların incelenmesi sağılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nosemosis, *Apis mellifera* L., Elazığ, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, Multipleks PZR

2. ABSTRACT

MOLECULAR DISCRIMINATION OF NOSEMA SPECIES SEEN IN HONEYBEE IN ELAZIG PROVINCE AND INVESTIGATION OF SUBCLINICAL CASES

Honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus) are important creatures that contribute to the pollination of agricultural products with their products such as honey, royal jelly, pollen, propolis, beeswax and bee venom, which make important contributions to human health and nutrition. Nowadays, it is observed that their illnesses, which greatly harm these benefits, have increased and their benefits have been restricted. One of the most important of these diseases is Nosemosis

Nosemosis is an important bee disease caused by *Nosema apis* or *Nosema ceranae* that causes disorders in the digestive tracts of adult honey bees of species. The species sometimes cause alone and sometimes mixed infections.

In this study, materials consisting of at least 20 dead or live worker bees collected every month for 12 months from three fixed bees in Sivrice district of Elazig province were examined microscopically and molecularly in Firat University Parasitology Laboratory. In the microscopic examination of the materials, *Nosema* spores were determined in all, and multiplex PCR was performed in the next stage, and the disease factor was determined to be *N. ceranae* in all positive samples.

With this study, for the first time, *Nosema ceranae* was detected molecularly in Elazig province, and for the first time, subclinical cases were investigated throughout the year in Elazig Sivrice.

Key Words: Nosemosis, *Apis mellifera* L., Elazığ, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, Multiplex PCR

3. GİRİŞ

Günümüzde dünyanın birçok yöresinde yapılan arıcılık, tarım ekonomisi içerisinde alt kollardan biri olarak sürdürülmekte ve elde edilen bal, balmumu ve propolis gibi ürünleriyle pazar payında önemli bir yeri işgal etmektedir. Böyle olmasına rağmen bu durumu etkileyecek özellikle noseimosi gibi arı hastalıkları geniş alanlara yayılmakta ve her geçen gün bu ve benzeri hastalıklar hakkında yeni bilgiler elde edilmektedir.

3.1 Arıcılığın tarihi ve gelişmesi

Arıcılığın hikâyesi insanlığın tarihi kadar eskidir. İnsanlar, ilköğretilerde ormanlarda ağaç gövdelerinde, oyuk ve kaya kovuklarında yerleşen arılardan büyük oranda faydalanmışlardır. Arıcılığın insanlık tarihi kadar eski olduğu çalışmalarda kaydedilmiştir. Seyyar arıcılık sayesinde de arıcılık geniş alanlara yayılmıştır. Aristo (M.Ö. 384-322), Hayvanlar Tarihi adlı eserinde kovan içerisinde ana arı, erkek arı ve işçi arı olmak üzere üç farklı tipte arının bulunduğunu bildirmiştir. Yine aynı eserinde arıların çiçek tozu topladıklarını belirtmiş ve günümüzdeki bilgilerle de örtüşen petek gözleri ve petek yapımı hakkında bilgiler vermiştir. İşçi arılar arasında bir iş bölümünün mevcut olduğu Aristo'nun tespitleri arasında yer almaktadır. Yine Aristo arılardaki bazı hastalıkları da tanımlamıştır. Fatih Sultan Mehmet, Kanuni Sultan Süleyman ve Yavuz Sultan Selim devirlerinde çıkarılan kanunnamelerde arıcılığa ait hükümlerde mevcuttur. Türk köylüsünün asırlardan beri balı, bir ilaç ve şifa kaynağı olarak kabul ettiği bilinen bir gerçektir. Arı ve bala İncil ve Kur'an gibi mukaddes kitaplarda da yer verilmiştir. Kur'an-ı Kerim'in 16. sûresi olan Nahl

sûresi arıdan bahsetmektedir. Bu sûrenin özellikle 68. ve 69. ayetleri arının mahiyeti hakkında çok geniş açıklamaları içermektedir (1, 2).

Araştırmalar arıcılığın, bitki örtüsü bulunan hemen her memlekette (kutuplar hariç) yaygın olduğunu ortaya koymaktadır. İnsanoğlunun arıyı ilkel kovan ve ağaç kovuklarından alıp bugünkü modern çerçevelere yerleştirmesi uzun araştırmalarla mümkün olmuştur. Arıların hayatlarının incelenmesinin yanı sıra zamanla fenni kovanların kullanılması ve bu arada arıcılık alet ve malzemelerinin her gün gelişerek günümüzdeki şekle dönüşmesiyle arıcılık bugünkü konumuna gelmiştir. Verimi yüksek ırk ve çerçeveli fenni kovanlar sayesinde çeşitli ülkelerde bal üretimi giderek artmıştır (1, 2).

3.2 Tarımdaki önemi ve uygulanabilirliği

Çiftçilerin esas faaliyetlerinin yanında yaptıkları ikinci bir uygulama olması nedeniyle de arıcılık ekstra bir gelir kaynağıdır. Tarım ekonomisi içerisinde de temel iş kollarından biri haline dönüşmüştür. Yine arıcılığın tüm tarım uygulamaları ile uyum içerisinde yapılabileceği görülmektedir. Doğal olarak bu durumların gerçekleştirilebilmesi harici herhangi bir uygulama ile bozulmamalıdır. Bu nedenle arıcılık diğer zirai işlemlere uygun bir şekilde icra edilmelidir (1, 2).

Arıların meydana getirdiği faydalı hizmetlerin başında bitkilerin meyve vermesini sağlayan çiçeklerin tozlaşmasında rol oynamaları gelmektedir. Balarılarının yeryüzünde bulunan nebatatın % 80'inin tozlaşmasında rol oynadığı görülmektedir. Bulunmadıkları yerlerde iyi bir tozlaşma sağlanamayacağından bitkilerden elde edilen verim yaklaşık üçte bir oranında düşük gerçekleşmektedir (1, 2).

3.3 Arıcılığın Ülke Ekonomisindeki Yeri ve Önemi:

Arıcılık sayesinde en önemli ürün bal daha sonrasında ise erişkin işçi arı, ana arı, arı sütü, balmumu, polen, arı zehiri, propolis, apilarnil, apiair ve arı ekmeği (perga) üretilmektedir. İnsan ve arı sağlığı ve beslenmesi açısından önemli bir konuma sahip olan bal, polen ve arı ekmeği; bazı hastalıkların tedavisinde yeri olan arı sütü, apilarnil, apiair ve arı zehiri ile özellikle kozmetikte kullanılan balmumu ve propolis arılardan elde edilebilen ürünlerdir. Tüm bunların yanı sıra ürünlerin elde edilip pazarlanmasına kadar geçen süreçte sektöre bağlı birçok yeni iş imkanları da (kovan ekipman ve malzemeleri üretimi v.s.) ülke ekonomisine büyük katkılar sunmaktadır (2).

3.4 Balarısı sistematigi, ırkları ve kolonisi

Carolus Linnaeus tarafından 1758’de ilk defa isimlendirilmesi yapılan bal taşıyan arı manasına gelen *Apis mellifera* L.. (Batı Bal Arısı) Hymenoptera takımı Apoidea üst familyası, Apidae familyası Apinae alt familyasında yer alan *Apis* cinsinde sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırma aşağıdaki gibidir (1-3):

Alem: Animalia (Hayvanlar alemi)

Alt Alem: Metazoa (Çok hücreliler)

Kök: Artropoda (Eklem bacaklılar)

Kökaltı: Antennata (Antenliler)

Sınıf: Insecta (Böcekler)

Takım: Hymenoptera (Zar kanatlılar)

Üst Familya: Apidae (Arılar)

Familya: Apidae (Arı ailesi)

Alt Aile: Apinae (Bal arısı ailesi)

Cins: *Apis* (Bal arısı)

Tür: *Apis mellifera* (Batı bal arısı)

Tür: *Apis cerena* (Doğu bal arısı)

Tür: *Apis florea* (Cüce bal arısı)

Tür: *Apis dorsata* (Dev bal arısı)

A. mellifera yüksek adaptasyon yeteneği nedeniyle dünyanın birçok yöresine yayılmıştır. Bu yayılımda gezginci arıcıların da rolü oldukça fazladır (4). *Apis mellifera*'nın bu yayılımı bulunduğu ekolojiye uyum sağlayarak birçok alt ırkın ortaya çıkmasına yol açmıştır. Günümüzde ise *Apis* cinsinin dünyanın birçok yöresine yayılan ve isimlendirilmesi yapılan alt ırkları ise aşağıdaki gibidir (2):

Cins: *Apis*

Tür: *Apis mellifera* (Batı balarısı)

Alt tür: *Apis mellifera* (Siyah balarısı)

Alt tür: *Apis ligustica* (İtalyan arısı)

Alt tür: *Apis carnica* (Karniol arısı)

Alt tür: *Apis caucasica* (Kafkas arısı)

Alt tür: *Apis scutellata* (Afrika arısı)

Alt tür: *Apis anatoliaca* (Anadolu arısı)

Alt tür: *Apis germanica* (Alman arısı)

Tür: *Apis koschevnikovi*

Tür: *Apis nuluensis*

Tür: *Apis nigrocincta*

Tür: *Apis cerena* (Doğu balarısı)

Altcins: *Megapis*

Tür: *Apis laboriosa*

Tür: *Apis dorsata* (Dev arı)

Altıns: *Micrapis*

Tür: *Apis florea* (Cüce arı)

Tür: *Apis adeniformis*

Balarılar; farklı bireylerin birbirilerine belirli bir düzen ve kurallara bağlı olduğu, yardımlaşmanın en yüksek düzeyde yapıldığı, anlaşmış, kaynaşmış bir aile ve toplum hayatı yaşayan canlılardır. Kısaca "balarısı kolonisi" diye tanımlanmaktadır. Bir kolonide üç farklı tipte arı bulunmaktadır. Bunlar ana (ece, kraliçe, bey) arı, işçi arı ve erkek arılardır. Koloniyi oluşturan farklı bireylerin başında gerçek anlamda dişi ve döl verimine sahip olan kraliçe arı gelmektedir. Bir kolonide bir adet bulunan kraliçe arı, diğerlerine (erkek ve işçi arılar) nazaran daha büyüktür (1.7-1.9 cm). Kraliçe arı, erişkin arı olarak yavru gözünden (gömeç) çıktıktan üç gün sonra seksüel gelişimini tamamlayarak kolonideki veya diğer kolonilerdeki erkek arılarla çiftleşme uçuşuna çıkmakta ve bunlardan biri veya nadiren birden fazlasıyla çiftleşip kovana dönmektedir. Arılar yumurta ile (ovipar) çoğalmaktadırlar. Gelişmelerinde sırasıyla yumurta, larva, prepupa, pupa ve ergin safhaları oluşmaktadır. İşçi arılar kraliçe arının döllenmiş yumurtalarından gelişerek koloninin tüm yükünü üstlenirler. Bunlar kraliçenin kısır kızları olup herhangi bir dönemde çiftleşme kabiliyetine sahip olmazlar. İşçi arılar yavru gözlerinden ergin arı olarak çıktıktan sonra (1.2-1.4 cm) kovan dışına hemen gitmeyip sırasıyla kovan içi temizliği, larvaların ve kraliçe arının beslenmesi, petek yapımı, peteklerin onarımı, kovan içinde yeni generasyonların gelişeceği gömeçlerin ve kraliçe arının bulunduğu bölgede sıcaklığın belirli

düzeyde tutulması, koloninin korunması, tarlacı arıların getirdikleri polen, nektar ve suyu kullanarak bal yapılması görevlerini üstlenmektedirler. İlk üç haftalık bu sürenin sonunda kovan dışına çıkarak etrafı keşif uçuşunu (3 km yarıçapında bir alanda) yapmaya başlamaktadırlar. Polen, nektar ve su topladıkları bu dönemde tarlacı arı olarak nitelendirilmektedirler. Bu dönem iki hafta kadar sürmektedir. Vücut aktivitelerinin yüksek olduğu bal akımı döneminde ömürleri 4-5 hafta kadardır. Sonbahar ve kışın aktiviteleri minimuma inmekte ancak kış uykusunun olmadığı bu dönemde üç dört ay yaşayabilmektedirler. Erkek arılar kraliçe arının dölsüz yumurtalarından gelişmektedirler. Kolonideki tek işlevleri kraliçe arıyla (içlerinden sadece biri veya birkaçı) çiftleşerek tohumlamalarıdır. İlkbaharın başlamasıyla birlikte koloni içinde görülen erkek arılar ana arıdan küçük, işçi arılardan ise büyüktürler (1.4-1.7 cm). İşçi arıların aksine daha geniş bir alanda bulunan (10-12 km çapındaki) diğer kovanlara da rahatça girebilmektedirler. İğneleri olmadığından kendilerini koruyamamaktadırlar. Koloninin balının azaldığı veya nektar akışının azaldığı dönemlerde işçi arılar tarafından dışarı atılmakta ve kovana sokulmayarak ölüme terk edilmektedirler. Kışın kolonide erkek arı bulunmamakta ve üç ay kadar yaşamaktadırlar (1, 2).

3.5 Dünya ve Türkiye’deki arıcılıkla ilgili güncel veriler

Bal arıları, bitkilerin tozlaşması ve ele edilen ürünleriyle ülke ekonomilerine önemli katkıları olan canlılardandır (4). Günümüzde arıcılık başta gıda olmak üzere birçok sektörde geniş alanlara (kutuplar hariç) yayılarak önemli bir iş kolu haline gelmiştir (2). Gelişmekte olan ülkelerde arıcılık istihdam, gelir kaynağı ve ürünleriyle sağlıklı beslenmede, gelişmiş ülkelerde ise iş dalı ve bitkisel üretim kazancı sağlamaktadır (5).

Arıcılık denilince akla gelen ilk ürün baldır. Dünyada her yıl bir buçuk milyon tondan fazla bal üretilmektedir. Bu üretimde Çin birinci sırada, Türkiye ise ikinci sırada yer almaktadır. Kovan başına üretilen bal miktarında ise Türkiye 10. sırada görülmektedir (6). Türkiye'nin bitki florası zengin olmasına rağmen arıcılıktaki değerlerinin beklenen düzeyde görülmemesinin nedeni olarak koloni yönetiminin ve hastalıklarla mücadelenin doğru yapılmadığı anlaşılmaktadır (7).

TÜİK'in 2019 yılı verilerine göre Türkiye'de 80.675 arıcılık işletmesinde 7.929.318 adet kovanda 109.329,368 kg bal üretiminin yapıldığı görülmektedir. Elazığ'da ise 791 arıcılık işletmesinde 73.234 adet kovanda 516.710 kg bal üretiminin yapıldığı görülmektedir (8).

Bal arıları yaklaşık 4 km uzağa uçabilmekte ve kolonideki arı sayısının fazla olduğu dönemlerde hastalıkların birçoğunu da beraberinde getirebilmektedirler (3). Kovanlardaki arı ölümlerinin en büyük sebebi paraziter, bakteriyel, fungal ve viral hastalıkların neden olduğu arı hastalıklarıdır (9).

3.6 Nosemosis

Nosema, arıların mide ve bağırsaklarında spor yaparak gelişmesini sürdüren önemli bir patojendir. Hastalığın etkeni mikrosporidialardan *Nosema apis* ve *N. ceranae*'dir. Etkenler ergin arıların sindirim sistemine yerleşip burada bozukluklara yol açarak arıların faaliyetlerinin azalmasına, özellikle de kış kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık ilk defa 1909 senesinde Zander tarafından balarısı sindirim epitel hücrelerinde microsporidial ovoid cisimlerin görülmesiyle *Nosema apis* olarak tanımlanış ve nosemosise sebep olduğu kaydedilmiştir (10).

Nosemosisin sebebi microsporidiaların 2006 yılına kadar genellikle protozoa olarak kabul edildiği, ancak 2006 yılında yapılan bir çalışmada birkaç

genden elde edilen moleküler verilere dayandırılarak mantarlar içerisinde dahil edildiği kaydedilmiştir. Microsporidialar hücre içi zorunlu mantarlar olup, sporları kalın duvarlara sahiptir ve oldukça dirençlidir (11).

İlk tanımı yapılan mikrosporidia türlerinden biri olan *Nosema apis* (Zander, 1909)'in batı bal arılarında (*A. mellifera*) görüldüğü kaydedilmiştir., Ancak 1994 yılında yapılan bir çalışma ile sadece asya bal arısını (*Apis cerana*) invaze ettiği düşünülen *N. ceranae*'nin ise günümüzde *A. mellifera*'ya da uyum sağladığı, başlıca Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve Asya kıtaları olmak üzere dünyanın bir çok yerinde, batı bal arısı ırkları arasında geniş bir yayılıma sebep olarak *N. apis*'in yerini aldığı bildirilmektedir. *N. ceranae*, *N. apis*'e göre yüksek bir patojeniteye sahip olup, daha fazla ölümlere yol açmaktadır Ayrıca günümüzde CCD (Colony Collapse Disorder) adı verilen ve dünya çapında büyük oranlarda koloni kayıplarına yol açan hastalığın da etmenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (12-18).

3.6.1 *Nosema* sistematigi ve türler

Nosema'nın sistematigi aşağıdaki gibidir (12).

Alem: fungi

Şube: Microsporidia

Sınıf: Dikaplophasea

Dizi: Dissociodikaplophasida

Aile: Nosematidae

Cins: *Nosema*

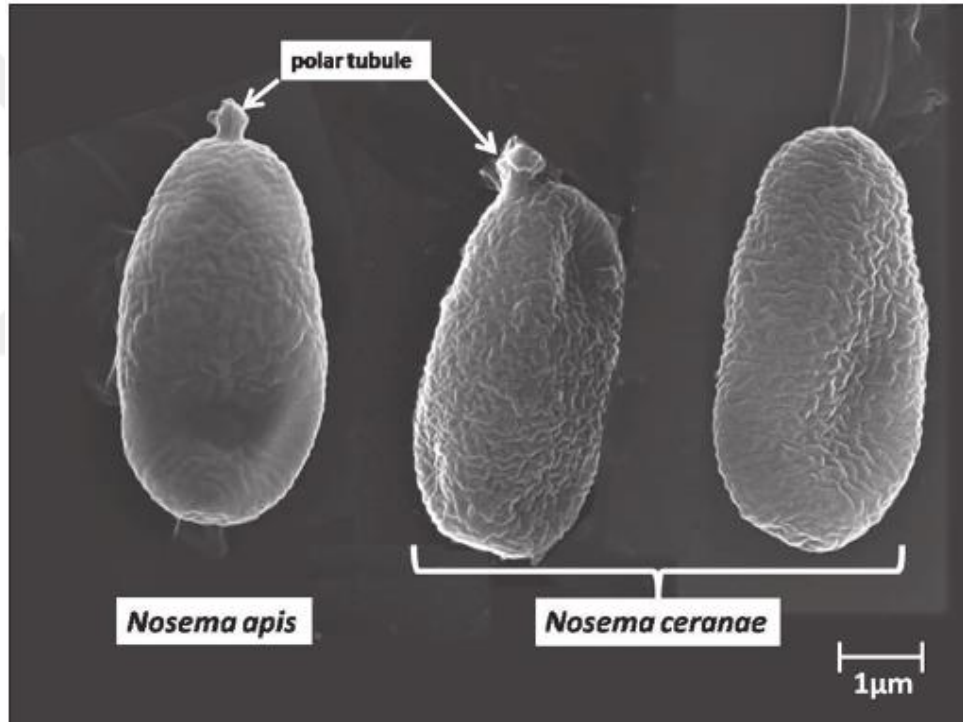
Tür: *Nosema ceranae*

Tür: *Nosema apis*

Her iki türle enfeksiyon ergin arıların bağırsaklarında görülmekle beraber *N. ceranae* enfestasyonlarına sindirim sistemi ventrikül hücrelerinin dışında ayrıca hypopharyngeal bezler, malphigian tüpler, tükürük bezleri ve yağ dokuda da rastlanmaktadır (10, 12).

3.6.2 Etiyoloji ve gelişme

N. ceranae sporları daha küçük olup 3.3-5.5 μm uzunluğunda olup 2.3-3 μm genişliğinde iken *Nosema apis*'e ait sporlar 4-6 μm uzunluğunda ve 2-4 μm genişliğinde ovalimsi veya elipsoidal şekillidir (19) (Şekil 1.).



Şekil 1. *Nosema apis* ve *Nosema ceranae* sporlarının elektron mikroskopik görüntüsü (20).

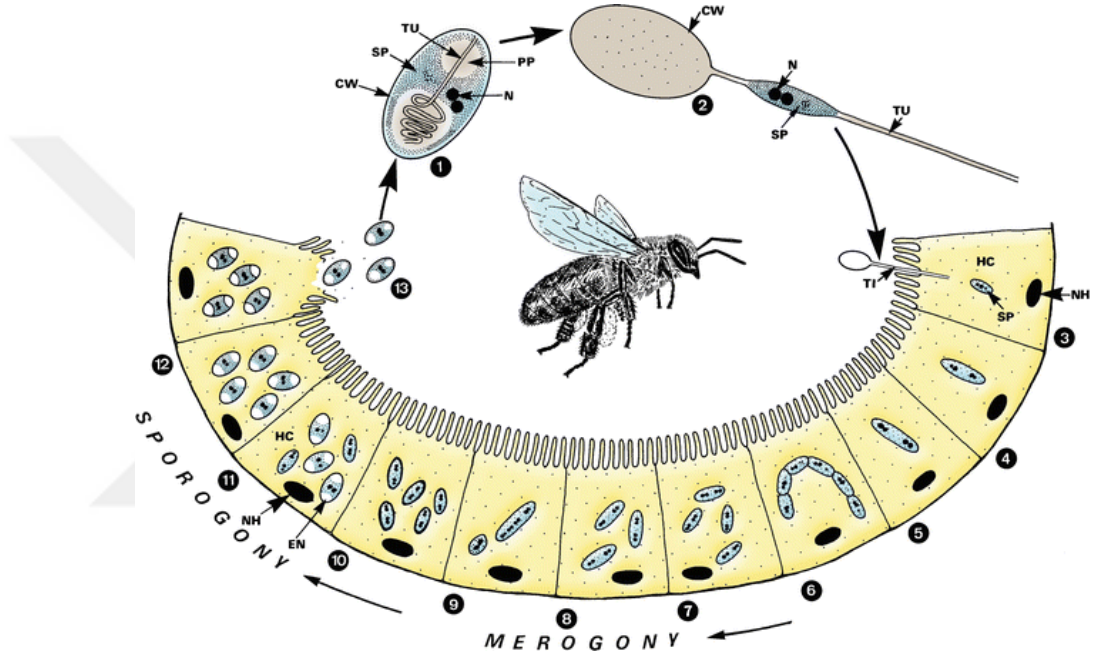
Işık mikroskopu çalışmalarında *N. ceranae* sporları *N. apis* sporlarına oranla daha küçük boyutlarda olup polar filament sayıları daha azdır (21). *N. ceranae*'nın 20 ila 23 adet polar filamenti bulunurken *N. apis*'te bu sayı 30 adet olarak elektron mikroskopik çalışmalarda saptanmıştır (17, 21, 22).

Çift çekirdekli olan sporların protoplazmaları helezonik bir şekilde çekirdekleri sararak halkalanmış polar filamentleri oluşturmuştur. Sporların içinde, sargılı bir kutup ekstrüzyon tüpü bulunmaktadır. Spor bir hücreye temas ettiğinde, ekstrüzyon tüpü salınmakta ve hedef hücrenin zarını delerek spor içeriğini hücreye enjekte etmektedir. Böylece üreme döngüsünü başlatılarak diğer sporların salınımını sağlanmaktadır. Sporlar mitokondriden yoksun olup aerobik solunum için mutlak konağa ihtiyaç duymaktadırlar. Bununla birlikte, çekirdekler içerisinde mitokondrial genlere rastlanmıştır. Bazı durumlarda da enzimler içeren ancak solunum fonksiyonlarından yoksun minik çift membranlı veziküllerden oluşan mitokondriyal kalıntıları bulunabilmektedir (12, 17).

150-200 adet spor bir epitel hücresi içerisinde bulunabilmektedir. *N.apis* tabiatla sporlanmış olarak çok sayıda bulunmaktadır. Sporlar soğuk ortama dirençli, sıcak ve nemsiz ortama karşı dirençsizdirler. Sporları oldukça dayanıklı olup balda, toprakta 2-3 ay kadar; ölü arıda ve arı dışkısında yaklaşık bir yıl canlılığını muhafaza edebilmektedirler (10, 12).

Nosema spp. zorunlu intercellular patojenler olup dışarıda inaktif sporlar halinde bulunmaktadır. Arılar tarafından fekal-oral yolla alınan sporlar ön mideden çabucak geçerek orta mideye ulaşmaktadırlar. Mide içeriği nedeniyle iç basınç yükselerek tubullerin dışarıya çıkması sonucu çimlenip epitel hücrelerine yapışmaktadırlar. Hücre içerisine giren polar filamentler vasıtasıyla *Nosema*'ya ait enfektif protoplazma içeriğini epitel hücresinin sitoplazmasına aktarmaktadır. Sporogoni olarak adlandırılan aseksüel çoğalmalarına konağın hücresindeki sitoplazmada başlamaktadırlar. Epitel hücresine girdikten sonra sporların hacmi artmakta ve merontu (mertont1) oluşturmaktadırlar. Merogoni yoluyla oluşan

merozitlerin 24 saat geçtikten sonra çekirdek sayısının ikiye katlanıp tekrar bölündüğü görülmektedir. Sonuçta tek çekirdeğe sahip merontlar (meront 2) meydana gelmektedir. Devamında merozoitler sporantlara sporantlar da çoğalarak sporoblastlara dönüşmektedir (Şekil 2). Siklusun sonunda diplokaryonlar meydana gelerek kalın hücre duvarına sahip olgun *Nosema* sporları oluşmaktadır (23).



Şekil 2. *Nosema apis*'in hayat döngüsü (24)

N. apis merontları pleomorfik, *N. ceranae* merontları ise iğ şeklindedir (25, 26).

3.6.3 Bulaşma, semptomlar ve patogenezi

Nosema spp. ile enfekte arıların kovan uçuş tahtası ve uçuş deliğinin önünde dışkılması veya hastalıklı arıların kovan çevresinde ölmesi hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı işçi arıların bu dışkıları temizleme davranışı sergilemesi *Nosema* sporlarının yayılmasına yol açmaktadır. Tarlacı

arıların bu sporlarla temas etmesi sonucunda kovan içindeki sağlıklı bireylerinde enfekte olduğu görülmektedir (10).

Hastalığa ait klinik semptomlar çok net değildir. Hastalığın akut ya da kronik seyir izlediği görülmektedir. Arının lehine kondisyonunu etkileyecek şartlar oluştuğunda semptomlar belirsiz seyretmekte ve çok zararı görülmemektedir. Kronik formda arılar enfekte olmalarına rağmen ölümler % 10-30'u geçmemektedir. Arının aleyhine gelişen durumlarda olaylar çabucak şekillenmekte ve arılara çok fazla zarar vererek % 100'lere varan ölümler görülmektedir. Arıların mide epitelyumu hasar gördüğünden aldıkları gıdayı sindiremediği için açlık hissetmekte, iyi beslenemediklerinden dolayı da protein dengeleri bozulmaktadır. Sonuçta sindirim sistemi işlenmemiş besin artıkları ile dolarak hareket kabiliyetini de azaltmakta ve arıların uçamadıkları veya kısa uçuşlar yaptıkları görülmektedir (10).

Spesifik olmamakla beraber arılarda karnının şişkin olması, iğneleme refleksinin hemen hemen kaybolması, kanatların açılması, sürünme ve kovan uçuş deliğinin önünde toprak kırıntılarının görülmesi nosemosise yorumlanabilmektedir. *N. apis* ile enfeste olgularda ishal tipik olarak görülürken *N. ceranae* olgularında görülmemektedir. Bu gibi vakalar genellikle belirtiler meydana gelmeden yaklaşık 8-10 gün içerisinde ölümle sonuçlanmaktadır. Ayrıca, arılar sekonder enfeksiyonlara karşı duyarlı hale gelmiştir (12).

N. ceranae, *N. apis*' e göre *A. mellifera*'da daha fazla bir patojenite göstererek arıların yaşam süresini ve görevlerini etkilemektedir. Sağlıklı kolonilerde toplu ölümlere neden olduğu da bilinmektedir (27, 28).

Hasta arıların dolaşımındaki protein, lipid, glukoz, ve fruktoz seviyelerinde düşüklük görülmüştür. Enfekte arıların sağlıklı arılara göre daha az yaşama sahip olduğu belirlenmiştir. *N. ceranae* enfestasyonlarına sindirim sistemi ventrikül hücrelerinin dışında ayrıca hypopharyngeal bezler, malphigian tüpler, tükürük bezleri ve yağ dokuda da rastlanmaktadır. Erişkin arıların hypopharyngeal bezlerinde yapısal bozukluklar ve atrofi görülmüştür. Dolayısıyla da arı sütü üretimi azalarak kuluçka beslenmesini zora soktuğu tespit edilmiştir. Hastalıktan etkilenmiş kolonilerde ölüm sebeplerinden biri de normal bağırsak florasında bulunan mayaların aşırı derecede çoğalmasıdır (10, 12).

N. ceranae ile Deforma Kanat Virusu arasında işbirlikçi bir etkileşimin olduğu, ayrıca bazı vakalarda *Nosema* pozitif kolonilerde *Malpighamoeba mellifica* (sarcodina) ve *Ascospaera sp.* (chalkbrood) gibi hastalıkların da beraber bulunduğu bildirilmiştir (12).

N. ceranae'nin *A. mellifera* üzerinde enerjetik stres oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir. Bu stresin *N. ceranae*'nin oluşturduğu enfeksiyonlarda *N. apis*'ten daha fazla olduğu, neden olarak ta bu parazitin *A. mellifera* ile birlikte geçirdiği evrim sürecinin *N. apis*'ten daha kısa meydana geldiği ve dolayısıyla da konak parazit ilişkisindeki fizyolojik uyum mekanizmasını daha az etkilediği belirtilmektedir. Bu yetersizliğin sonucunda da *N. ceranae*'nin *A. mellifera*'nın daha fazla gıda tüketmesine neden olduğu bildirilmektedir. Bu da *N. ceranae*'nin neden *N. apis*'ten daha patojen olduğunu açıklamaktadır (29, 30).

N. ceranae'nin oluşturduğu bu enerjetik stresin arılarda iştahın artmasına ve açlığa neden olduğu, enfekte arıların güçsüzleştiği, tarlacı arıların kovana

dönemediği, sonuçta kolonideki birey sayısının azaldığı ve bunun da koloni çöküş sendromuna neden olabileceği belirtilmektedir (29, 31-33).

3.6.4 Teşhis ve tedavi

Tanı amacıyla her bir kovandan rastgele 40-50 adet arı alınmakta ve uygun şekilde öldürülen arıların abdomenleri ayrılarak bir havan içerisinde çeşme suyu, distile su ya da serum fizyolojik ile karıştırılarak ezilmektedir. Ezilen bu materyalden bir damla lam üzerine alınarak üzeri lamelle kapatılıp ışık mikroskopunda 40'lık objektifte sporların varlığı yönünden muayene edilmektedir. Ayrıca sporların yüksek ışık kırıcı özelliklerinden faydalanmak amacıyla tanıda faz kontrast mikroskoplardan da faydalanılabilmektedir. *N. ceranae* sporlarının küçük olmasına rağmen her iki türün normal mikroskopi ile ayırımı mümkün değildir. Bu amaçla moleküler yöntemler kullanılmaktadır (10, 12)

Bu materyaldeki sporların sayımı ile enfeksiyonun insidansı da belirlenebilmektedir. Bunun için Neubauer lamı üzerindeki çizgili bölümü kaplayacak biçimde şüpheli sıvıdan konulmakta ve üzerine lamel yerleştirilerek ışık mikroskopunda 40'lık objektifle alanda bulunan beş büyük karedeki sporlar sayılmakta ve toplam spor sayısı (S): Arı başına spor sayısı (N) = $S \times 10^6 / 80$ formülü ile tespit edilmektedir (12).

Tanıda etken diğer mantar, mayalar ve *Malpighamoeaba mellificae* kistleri karıştırılabileceğinden çeşitli boyama metotları da kullanılmaktadır. Diseke edilerek çıkarılan sindirim sistemleri uygun solüsyonlar içerisinde ezilip giemsa boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda etkenlerin görülmesi ile teşhis koyulmaktadır. Bundan başka nigrosin (% 0.1) boyamasında preparat zemini koyu

renkte boyanırken etkene ait sporlar beyaz görülmektedir. Bir diğer boyama materyali % 1'lik safranindir. *Nosema*'lar safranin ile kırmızıya boyanmaktadır (10, 12).

Hastalığın etiyolojik tanısı için moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu amaçla mütipleks PCR yönteminden yararlanılarak her iki *Nosema* türünden hangisinin olduğu spesifik primerleri ile çoğaltılarak belirlenmektedir (12, 14, 34)

Otopside mide ve barsaklar beyaz renkte cam gibi parlak olup oldukça şişmiştir ve normalde üzerinde bulunan kıvrımlar kaybolmuştur (10, 12).

Tedavide uzun yıllar kullanılan *Aspergillus fumigatus*'tan elde edilen ve mantarların çoğalmasını inhibe edici özelliği bulunan fumagillinin (22) balda kalıntı bırakması nedeniyle günümüzde Avrupa Birliği normlarına uygun olarak kullanımına kısıtlama getirilmiştir. Yapılan çalışmalarda fumagillinin memeliler üzerinde genotoksik etkiye sahip olduğu, ayrıca insanlarda lenfositlerde sitotoksositeye yol açtığı bildirilmektedir (35).

Yapılan yeni çalışmalarla alternatif olarak çeşitli bitkilerde bulunan esansiyel yağların (nane, kekik, limon ve ökaliptus v.b.) etkisinin olduğu bildirilmiştir (36-38).

3.6.5 Nosemosis'in Dünyada ve Türkiye'deki Varlığı

İlk defa Zander tarafından 1909 yılında keşfedilen *N. apis*, nosemosis hastalığının tek etkeni olarak görülmekteyken (16) *A. cerana* üzerinde yapılan bir araştırmada *Nosema ceranae* Fries ve ark. (17)'nin 1994'te tespitiyle ikinci bir tür olarak kayda girmiş ve daha patojen olduğu vurgulanmıştır. Sadece *A. cerana*'yı enfeste ettiği düşünülen *N. ceranae*'nin *A. mellifera*'ya da uyum sağladığı,

dünyanın bir çok yerinde, batı bal arısı ırkları arasında geniş bir yayılıma sebep olarak *N. apis*'in yerini aldığı bildirilmektedir (12, 15, 16, 22, 28).

C tipi *N. ceranae*'nin arılarda en yaygın olarak görülen tip olduğu ve Colony Collapse Disorder (CCD) olarak isimlendirilen küresel koloni kayıplarında önemli bir rolünün olduğu belirlenmiştir (22, 28, 39). *N. ceranae*'nin bal arısı immün yanıtını baskıladığı ve diğer patojenlere karşı duyarlılığını artırdığı tespit edilmiştir (40). *N. ceranae*'nin değişken iklim şartlarına *Nosema apis*'e göre daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (9, 41). Spor yoğunluğu ile nem arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (25, 41, 42).

Ülkemizde *N. apis*'e ait ilk bilgiler 1952 yılında kaydedilmiş olup, ilk teşhis ise 1986 yılında yapılmıştır (43). Aydın ve ark. (44) Güney Marmara bölgesinde yaptıkları çalışmada Balıkesir'den toplanan örneklerin % 30'unun, Bursa'dan toplanan örneklerin % 25.8'inin ve Çanakkale'den alınan materyallerde ise % 25'inin nosemosis yönünden pozitif olduğunu belirlemişler, ancak belirlenen bu rakamların çok üstünde verilerin olabileceğini kaydetmişlerdir. Şimşek ve ark. (45) tarafından Elazığ ve bazı ilçelerinde yapılan ve *Nosema*'nın yaygınlığının tespitini amaçladıkları çalışmalarında hastalığın Merkez ilçede % 4, Baskil ilçesinde % 4 ve Sivrice ilçesinde % 10 oranında yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Güney Marmara'da ise hastalığın yaygınlığı %24 olarak tespit edilmiştir (46). 2004 yılında Topçu ve Arslan (47)'in Kars ve çevresinde yaptıkları çalışmalarında 50 farklı arılıkta bulunan 1892 koloniden topladıkları numunelerin karışık olarak seçtikleri 343 kovan örneğinin % 15.74'ünü *Nosema* (*N. apis*) pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Elazığ'da yapılan başka bir

çalışmada ise hastalığın % 8.77 oranında yaygın olduğu belirlenmiştir (48). Kutlu ve Gazioğlu (49), Bingöl ilinde 2001 ve 2007 yıllarında nosemosisin varlığına yönelik yapmış oldukları tarama çalışmalarında 2001 yılında ortalama bulaşıklığın % 38.5, 2007 yılında ise ortalama bulaşıklığın % 42.45 olduğunu bildirmişlerdir. Ütük ve ark. (50)'nın 36 ilden laboratuvarlarına getirilen 140 örneğin 6'sında (% 4.28) tek başına *Nosema* sporlarının ve 4'ünde (% 2.85) ise *Varroa* ile beraber miks enfestasyonların görüldüğünü bildirilmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise Adana ve Hatay'dan toplanan örneklerin % 12.7'sinde *Nosema* sporlarının varlığı tespit edilmiştir (51). Hatay bölgesinde kış salkımı erken bozulan kolonilerde sebeplerin araştırıldığı çalışmada 900 koloni incelenmiş ve 90 (% 10)'unda *Nosema* sporları tespit edilmiştir (7). Tosun (42), Doğu Karadeniz Bölgesinin bazı illerinde yaptığı araştırmasında nosemosisin oranını 2009-2011 yılları arasında inceledikleri 5330 ölü erişkin işçi arı örneğinin % 21.2'sinde nosemosisi yaygın olarak tespit etmiş, yaptığı moleküler analizler sonucunda etkenin *N.ceranae* olduğunu, ultrastruktürel incelemede sporların ovoid şekilli ve polar flamentin 20-27 adet olduğunu, artan sıcaklık-nem ile hastalığın doğru bir orantı gösterdiğini, nemin sıcaklığa oranla daha etkili olduğunu ve hastalığın Haziran-Temmuz aylarında en üst seviyeye ulaştığını belirlemiştir. Özet olarak Türkiye'de bugüne kadar yapılmış birçok çalışma ile hastalığın insidansının yaklaşık olarak % 4 ile % 58 oranları arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (12).

Türkiye'de bal arılarında *Nosema* türlerinin belirlenmesine yönelik PCR çalışmalarında *N. ceranae* ve *N. apis*'in varlığı 2010 yılı içerisinde yapılmış üç ayrı çalışma ile bildirilmiştir (7, 14, 52). Bu çalışmalardan Ütük ve ark. (14)'nın

moleküler olarak yaptığı çalışma *N. ceranae* ve *N. apis*'in Türkiye'de tespiti üzerine yapılmış ilk bildirim olma özelliğini taşımaktadır. Aynı yıl içerisinde yapılmış olan tür içi farklılıkların tespiti de amaçlanmış diğer bir araştırmada Türkiye'nin farklı 20 yerleşim yerinden toplanan örneklerde bulunan *Nosema* türleri arasında hiçbir farkın bulunmadığı ve genotipik analizlerinin incelenmesinde dünyanın birçok bölgesinde tespiti yapılan *N. ceranae* genotipleriyle aynı olduğunu ve filogenetiğinin aynı olduğunu ortaya koymuşlardır (52).

Bu tez çalışması ile Elazığ ili Sivrice ilçesinde arılarda önemli ekonomik kayıplara neden olan nosemosis hastalığı önceden belirlenen muhtemel pozitif odaklardan toplanan örneklerde rutin mikroskopi yöntemlerinden kaynaklı hataları ortadan kaldırarak, *N. apis* ve *N. ceranae* türlerinin birlikte karıştırılmadan teşhisini sağlayacak moleküler metotlardan multipleks PZR tekniğinin normal laboratuvar uygulamalarına sokulması amaçlanmış ve araştırma sonucunda Elazığ'da ilk defa *Nosema* türlerinin moleküler analizi amaçlanmıştır. Ayrıca görülme döneminin daha çok bahar aylarında olması, etkenin bu zamanların haricinde kovan içerisindeki pozisyonunun ortaya konması açısından subklinik vakaların aynı yöntemlerle belirlenmesi hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Saha ve Örneklerin Toplanması

Çalışma 2019 Ocak-Aralık ayları arasında 12 ay düzenli olarak gidilen Elazığ ili Sivrice ilçesinde önceden nosemosis pozitif olarak belirlenen üç arılıkta planlanmıştır. Sivrice ilçesi, konum olarak Maden ilçesinin batısında, Baskil ilçesinin doğusunda yer alıp güneybatısından Malatya iline, güneydoğusundan ise Diyarbakır iline komşudur (Şekil 3).



Şekil 3. Elazığ il haritası

Bu tez çalışmasında Elazığ İli Sivrice İlçesinde gezginci olmayan arılıklardan hastalık açısından önceden pozitif olarak değerlendirilen üç odak belirlenmiş ve 2019 yılı içerisinde 12 ay boyunca düzenli olarak örnekler toplanmıştır. Saha çalışmalarında kovan içinden, uçuş tahtası üzerinden ya da kovan etrafından her bir örneklemede en az 20 adet olmak kaydıyla toplanan ölü

ya da canlı işçi arılar, içinde %70 metil alkol bulunan falkon tüplere alınarak incelenmek üzere Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir. Örnekler, laboratuvarda +4 °C'deki soğutucularda *Nosema spp.* açısından incelemenin yapılacağı güne kadar saklanmıştır.

4.2 Laboratuvar incelemeleri

Arazi çalışması sonucu laboratuvarda uygun şartlarda saklanan materyalde *Nosema* sporlarını tanımlamak ve pozitif çıkan örneklerde spor sayımı mikroskopi ile *Nosema spp.* yönünden tür tayini yapmak için ise multipleks-PZR metodu kullanılmıştır.

4.2.1 Örneklerin Hazırlanması

Laboratuvar incelenmesi için önceden +4 °C'de falkon tüplerde saklanan materyalden *Nosema spp.* sporlarının tespiti ve sayımı için aynı odaklardan toplanan en az 20 işçi arı ay bazında değerlendirmeye alınarak incelenmiştir. Arının dorsal kısmı pens ile sabitlenerek abdomeni başka bir pens yardımıyla ayrılarak toplanmıştır. Toplanan arıların abdomenleri 3 ml serum fizyolojik su eklenen havanda ezildikten sonra hazırlanan homojenatlar gazlı bezden süzülerek ayrılmıştır. Süzülerek elde edilen karışımdan 3 damla lam üzerine damlatılıp üzerine lamel ile kapatılarak ışık mikroskobunda sporlar yönünden incelenmeye alınmıştır (27).

4.2.2 Mikroskobik İncelemeler

Nosema apis ve *N. ceranae*'nın sporlarının ergin arılarda belirlenmesi için, karın bölgeler incelenmiş, enfestasyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla ışık mikroskobu altından *Nosema* sporlarının sayımı yapılarak varlığı tanımlanmıştır.

Nosema spp. sporlarının tespiti yapıldıktan sonra enfeksiyon düzeyinin belirlenmesi için spor sayımına geçilmiştir. Süzülerek elde edilen karışımdan otomatik pipetlerle 0,1 ml miktarında alınarak hücre sayım lamı (Neubauer) üzerine damlatılıp üzerine lamel kapatıldıktan sonra mikroskop altında 40'lık objektifte spor sayımı yapılmıştır.

Sayım lamı üzerinde değişik büyüklüklerde ufak karelerin çizildiği bölümler yer almaktadır. Lamın orta kısmında bulunan alan içerisindeki 16 adet karenin bulunduğu 0.004 mm³ hacimli alanlarda ışık mikroskopunun 40'lık objektifi ile 5 büyük karedeki, (a, b, c, d, e alanlarında 16 küçük kare x 5 = 80 kare) sporların sayımı yapılmıştır (Şekil 4). Aşağıdaki formül ile arı başına tekabül eden spor sayısı belirlenmiştir (12).

$$\text{Her bir arıdaki spor sayısı (N)} = \text{Toplam spor sayısı (S)} \times 4 \times 10^6 / 80$$



Şekil 4. A. Neubauer lamı B. Spor sayımı yapılacak alanlar (53)

Spor sayımı yapılan her bir homojenat genomik DNA izolasyonu yapılmıyaya kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.3 Moleküler İncelenmeler

Nosema sporlarının mikroskop altında karakterizasyonu yapıldıktan sonra kesin tür tayini için multipleks-PZR teşhis yöntemi kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarda Multipleks (çoklu) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodu

kullanılıp, Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (OIE)'nün verileri referans alınmıştır (27).

Bu amaçla hedef genomik DNA (gDNA) elde edilmesi, Hernández ve ark. (54)'larının kullandığı metoda Ütük ve ark. (14)'nın yaptığı modifikasyon uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

PZR çalışmasında noseimosisi oluşturabilecek *N. apis*'in ve *N. ceranae*'nin hedef gen bölgesini çoğaltacak olan primer dizilimleri Tablo 1'de verilmiştir (14).

Tablo 1. Primer dizilimleri ve özellikleri

Primer	DNA dizilimi (5' -3')	Hedef bölge	Spesifite	Ürün büyüklüğü (bp)
218MITOC -FOR	CGGCGACGATGTGATATGAAA ATATTAA	16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	218-219
218MITOC -REV	CCCGGTCATTCTCAAACAAAA AACCG			
321APIS- FOR	GGGGGCATGTCTTTGACGTAC TATGTA	16S rRNA	<i>N. apis</i>	321
321APIS- REV	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAA ACAACATATG			

4.2.3.1 PZR aşamasına örneklerin hazırlanması

Mikroskopik tanı ve sayım işlemleri için hazırlanan *Nosema* sporları tespit edilen örneklerden 500 µl alınıp 1 dakika boyunca 8000 rpm devirde santrifüj edilerek üsteki süpernatant atılmış ve geriye kalan çökeltinin üzerine 500 µl fizyolojik su eklenip vortekslenmiştir. Bu işlem 5 kez tekrarlanmış olup son işlemde süpernatant atılarak çökeltinin üzerine 500 µl fizyolojik su eklenerek vortekslenmiş ve sonrasında ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir.

Ekstraksiyon için ticari DNA izolasyon kiti (QIAGEN) kullanma prosedürüne uygun şekilde kullanılarak gDNA izole edilmiştir ve kullanılıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır (14).

4.2.3.2 Multipleks PZR aşaması

Bu işlem için Ütük ve ark. (14)'nın bildirdiği modifikasyon kullanılarak test aşamasına geçilmiştir. PZR toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde; 5 µl gDNA, 0.25 µl TaqDNA Polimeraz (ThermoFisher), 5 µl 10X PCR Buffer, 5 µl MgCl₂, 6µl dNTP, 2 µl 218MITOC FOR, 2 µl 218MITOC REV, 2 µl 321APIS FOR, 2 µl 321APIS REV primerleri ve 20,75 µl saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan PZR karışımlarının çoğaltımı 95 °C'de 2 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu, 95 °C'de 1 dk denatürasyon, 50 °C'de 1 dk bağlanma, 72 °C'de 1 dk uzama olarak gerçekleştirilmiştir. Son siklusu takiben 72 °C'de 5 dk son uzama işlemi uygulanmıştır. PZR işlemi sonrasında oluşan ürünler 100 bp DNA ladder (Fermantas) kullanılarak %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüş, ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir (14).

4.2.4 İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS 21 paket programı uygulanarak düzenlenmiştir. Analizlerde sıcaklık, nem (nisbi) ve sporlar için ortalama standart hata ($\bar{X} \pm SX$) hesaplanarak bulunmuştur. Spor sayılarından elde edilen verilerin istatistiksel analizlerine başlamadan önce hangi testlerin yapılacağına karar vermek için normal dağılım testi (Shapiro-Wilk) uygulanmıştır. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde verilerin normal dağılım göstermediği belirlenmiştir. Verilerin dağılımı normal olmadığı için non-parametrik test olan Kruskal Wallis-

H Testi yapılmıştır. Odaktaki spor verilerinin ikili karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Sıcaklık, nem ve spor sayıları arasındaki korelasyonu göstermek için Pearson Korelasyon katsayıları (r) hesaplanmıştır. $P<0.05$ olduğunda ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değerlendirilmiştir.



5. BULGULAR

Çalışmalar sonucunda aylara göre örnek toplanılan işçi arı sayısı Tablo 2.'de verilmiştir.

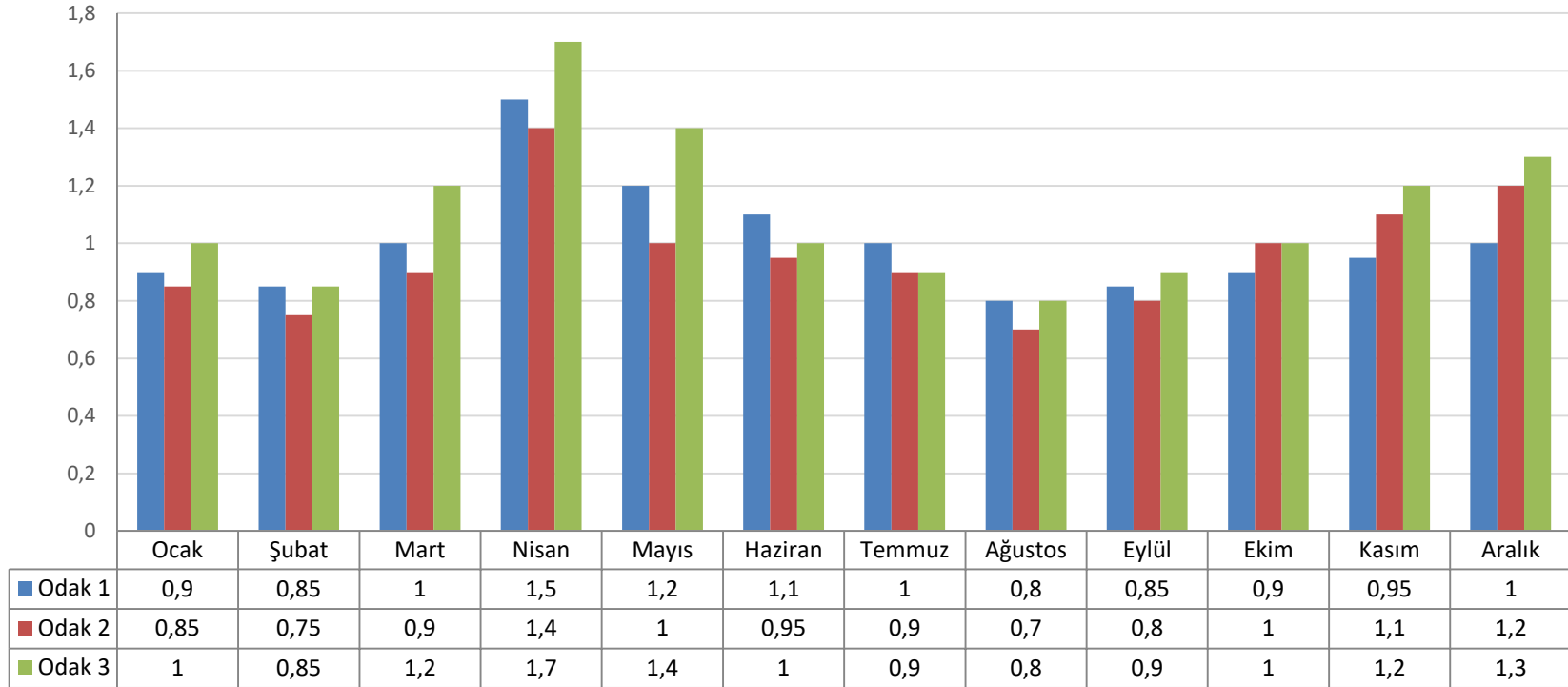
Tablo 2. Odaklardan Toplanan İşçi Arı sayısı

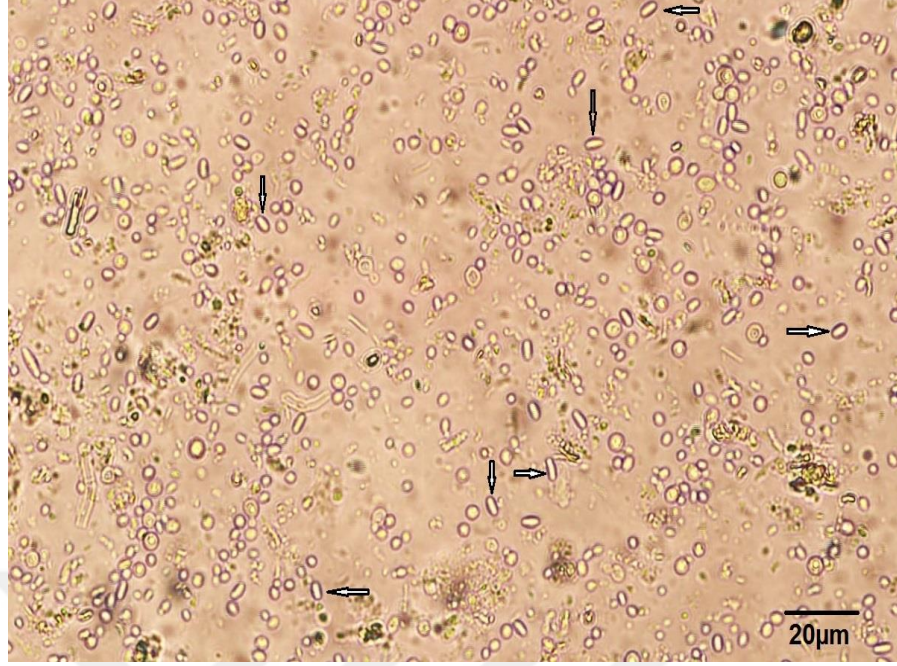
Ay	1.Odak	2.Odak	3.Odak
Ocak	65	77	58
Şubat	72	68	82
Mart	77	63	54
Nisan	58	51	65
Mayıs	60	70	79
Haziran	69	56	67
Temmuz	61	48	54
Ağustos	55	66	73
Eylül	66	73	49
Ekim	80	76	57
Kasım	60	69	83
Aralık	54	70	61

5.1 Mikroskopik Analiz Sonuçları

Araştırmada Sivrice ilçesinde belirlen üç arılıktan 12 ay süre ile toplanan materyalden hazırlanan solüsyonun native olarak 40'lık objektifte mikroskopik incelemesi sonucunda tüm örneklerde (%100) *Nosema* sporlarına rastlanılmıştır (Şekil 5). Mikroskopik teşhis sonrası spor sayılarının aylara göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Tespit edilen spor sayılarının odaklardaki arı başına düşen aylık ortalamaları ($\times 10^6$ spor/ml).



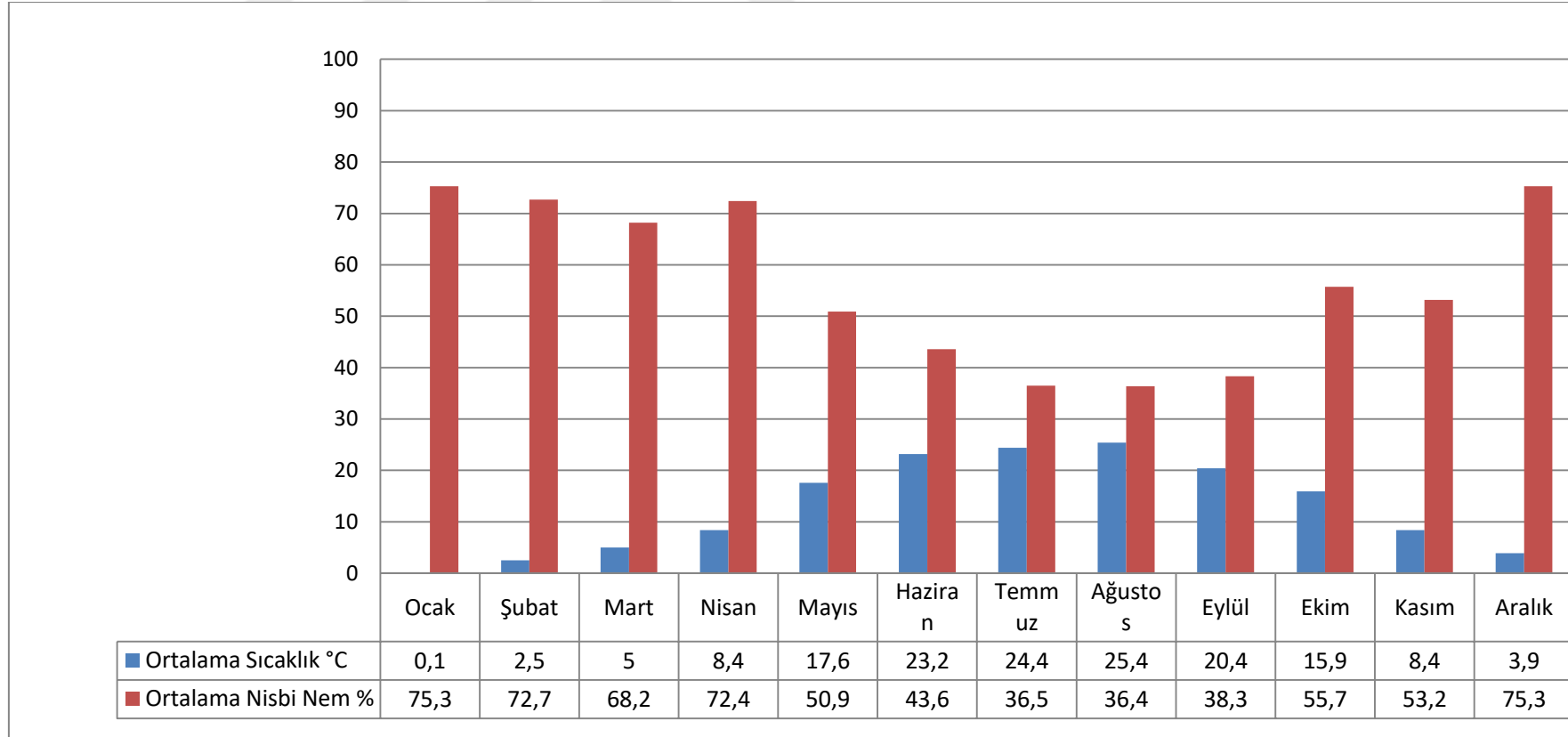


Şekil 5. Mikroskopta *Nosema* sporlarının görünüşü (orijinal) (X 40).

Çalışma süresince yapılan spor sayımlarına göre en yüksek değer arı başına düşen $1.7 (\times 10^6 \text{ spor/ml})$ ile nisan ayında Odak 3'te, en düşük değerler ise $0.8 (\times 10^6 \text{ spor/ml})$ ile Odak 1 ve 3'te ağustos ayında Odak 2'de eylül ayında tespit edilmiştir.

Çalışma süresince örnek toplanan Elazığ ili Sivrice ilçesindeki lokasyonlara ait Meteoroloji Müdürlüğünden alınan verilere göre 2019 yılı 12 aylık sıcaklık ve nisbi nem ortalamaları Tablo 4'te verilmiştir.

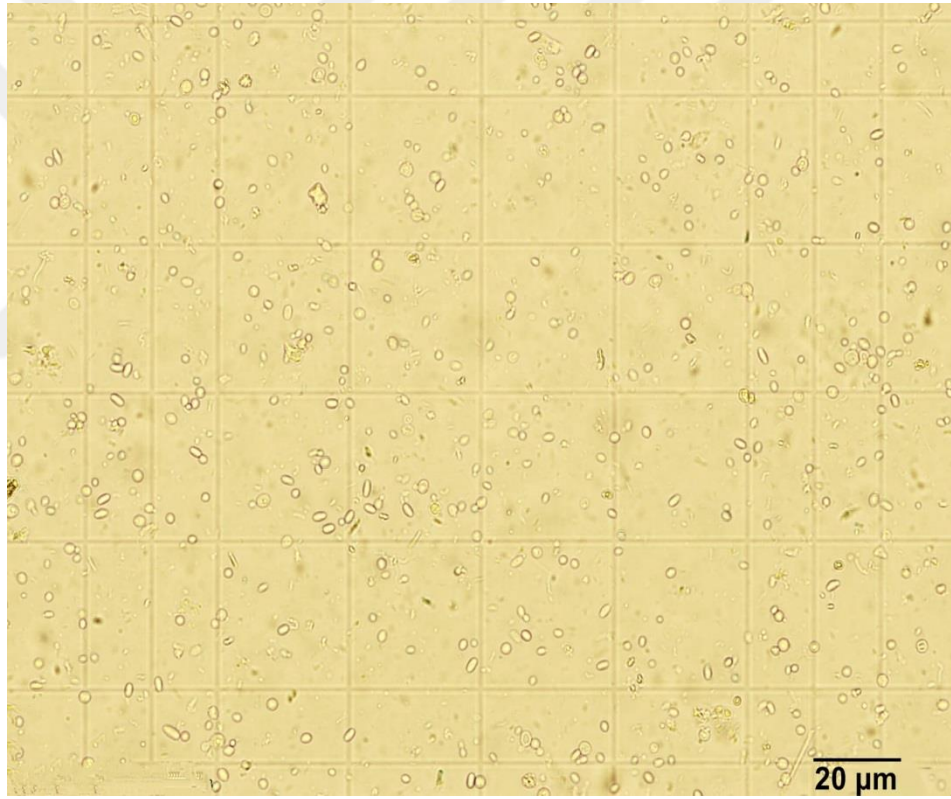
Tablo 4. 2019 yılı süresince çalışmada örnek toplanan aralıklarda aylara göre ortalama sıcaklık ve nem (nisbi) oranları



Meteoroloji Müdürlüğünden alınan verilere göre Elazığ İli Sivrice İlçesi 2019 yılına ait nisbi nem oranı en yüksek ocak ve aralık ayı (% 75,3) en düşük nem ise ağıstos ayında (% 36,4) tespit edilmiştir. Diğr yandan en düşük sıcaklık ocak ayında en düşük (0,1 °C) ağıstos ayında ise en yüksek (25,4 °C) olarak gözlemlenmiştir.

5.2. Spor sayımı

Hazırlanan materyal Neubauer lamında hazırlanarak spor sayımları yapılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Neubauer lamda sayım alanındaki sporların görünümü (orijinal)

Odakların aylara göre *Nosema* spor sayısı karşılaştırılması Tablo 5' te verilmiştir.

Tablo 5. Odakların aylara göre spor sayısı karşılaştırılması

Aylar	İstatiksel Veriler
Ocak	0.91±0.04 ^{bcd}
Şubat	0.81±0.03 ^d
Mart	1.03±0.08 ^{bcd}
Nisan	1.53±0.08 ^a
Mayıs	1.2±0.11 ^b
Haziran	1.01±0.04 ^{bcd}
Temmuz	0.93±0.03 ^{bcd}
Ağustos	0.76±0.03 ^d
Eylül	0.85±0.02 ^{cd}
Ekim	0.96±0.03 ^{bcd}
Kasım	1.08±0.07 ^{bcd}
Aralık	1.02±0.08 ^{bc}

Veriler ortalama standart hata ($\bar{X} \pm SX$) olarak verilmiştir.

a, b, c, d: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 5'e göre en fazla spor sayısı nisan ayında daha sonra mayıs ayında görülmüştür ($P<0.05$). Ocak, haziran, temmuz aylarında benzer sonuçlar elde edilmiş olup en az *Nosema* spor sayısı ağustos ve eylül ayında tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Spor sayılarının nem ve sıcaklık ile karşılaştırılması Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Sporlar ile sıcaklık ve nem arasındaki ilişki değerleri

		Spor Sayısı	Nem	Sıcaklık
Spor Sayısı	Pearson Korelasyon	1	,370*	-,230
	Sig. (2-tailed)		,027	,176
	N	36	36	36
Nem	Pearson Korelasyon	,370*	1	-,946**
	Sig. (2-tailed)	,027		,000
	N	36	36	36
Sıcaklık	Pearson Korelasyon	-,230	-,946**	1
	Sig. (2-tailed)	,176	,000	
	N	36	36	36

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Sıcaklık ile spor sayısı arasındaki ilişki önemli tespit edilememiştir (P=0.176 P>0.05).

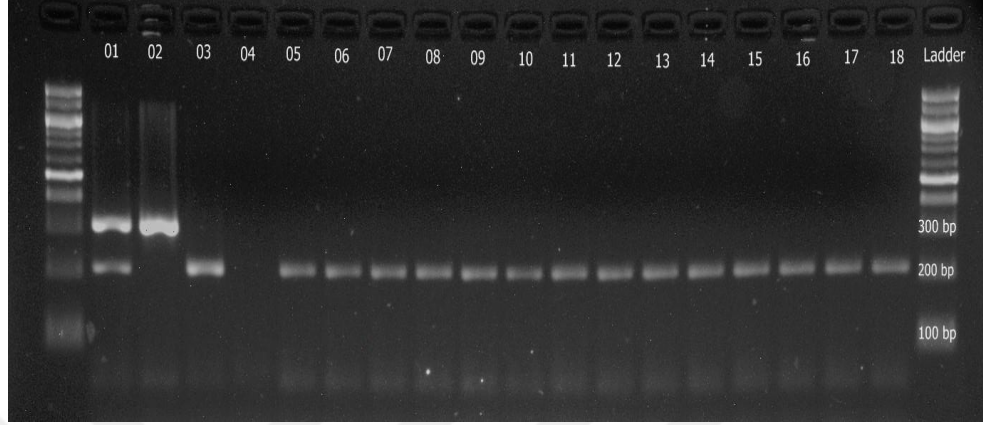
Nem ile spor sayısı arasındaki ilişki pozitif yönde önemli korelasyon elde edilmiştir (P<0.05).

Ayrıca örneklerin toplandığı arılıklarda yapılan incelemelerde kovanlarda arılarda görülebilen önemli akarlardan *Varroa*'nın gelişme formlarının bulunduğu tespit edilmiştir.

5.3 Moleküler Analiz Sonuçları

Mikroskopik analiz sonucu *Nosema* sporları bakımından pozitif olan örneklerdeki DNA'nın izolasyonunu müteakip multiplex (Çoklu) PZR ile değerlendirme yapılmıştır. PZR çalışmasının doğrulanması için gerekli olan *N. apis* ve *N. ceranae* pozitif kontroller Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Ana Bilim Dalında Öğretim Üyesi Prof. Dr. Armağan

Erdem ÜTÜK'ten temin edilmiştir. PZR analiz işlemi sonucunda üç aralıkta 12 ay süresince toplanan arılara ait tüm numunelerde (%100) *N. ceranae* pozitif çıkmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Nosemosis enfeksiyonun hastalık etkenlerinin agaroz jel elektroforezi. Ladder: (100bp DNA ladder, MBI Fermentas), 1. *N. apis* ve *N. ceranae* pozitif kontrolleri (2.5'ar µl *N. apis* DNA + *N. ceranae* DNA), 2. *N. apis* pozitif kontrol, 3. *N. ceranae* pozitif kontrol, 4. Negatif kontrol, 5.-18.(Numuneler)

6. TARTIŞMA

Günümüzde arıcılık gelişerek hem ekonomiye hem de sağlığa birçok katkı sağlayan popüler bir iş alanı haline gelmiştir. Bal arıları bir bölgede bitkisel ürün üretimini artıran tozlaşmaya katkı sunarken aynı zamanda bal ve diğer arıcılık ürünlerinin üretimini artırmaktadır. Ancak son zamanlarda yaşanan arı ölümlerine yol açan hastalıklar birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de yaygınlaşmıştır. Bunların içerisinde noseiosis önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye de noseiosis ait ilk bulgular 1952 yılında bildirilmiş, ilk tanısı ise 1986 yılında yapılmıştır (43, 55, 56).

Çalışmada Elazığ ili Sivrice ilçesinde gezginci olmayan önceden tespiti yapılmış noseiosisli üç arılıktaki kovanlardan 12 ay süresince en az 20 adet ölü ya da canlı işçi arı toplanarak *Nosema* türlerinin varlığı araştırılmıştır. Mikroskopik çalışmalarda alınan tüm örneklerde *Nosema* sporlarına rastlanmıştır. Örnek toplanan odaklar arasında istatistiksel olarak *Nosema* sporlarının yaygınlığı açısından farklılıklar önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Nosematosisin Elazığ’da tespiti üzerine yapılan mikroskopik bir çalışmada (40) Merkez ilçede % 4, Baskil ilçesinde % 4 ve Sivrice ilçesinde % 10 yaygınlık tespit edilmiştir. Araştırmanın planlandığı odak olarak seçilen Elazığ Sivrice ilçesinde toplanan numunelerin tamamında *Nosema* sporlarına rastlanması bu çalışmaya paralellik arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında sporların yaz aylarında düşük, ilkbahar aylarında ise yoğun yağış ve nemden dolayı yüksek seyretmesi nemin sıcaklığa göre daha önemli bir faktör olduğu görülmüş ve yapılan istatistiksel analizlerle de nem oranındaki artışın spor sayısındaki artış ile önemli düzeyde ilişkili olduğu ortaya

konulmuştur ($P<0.05$). Nem ve spor sayısı arasındaki doğrusal ilişki önemini daha önceki çalışmalarla da desteklenmiştir (9, 25, 41, 42).

Araştırmanın sonucunda odaklardan toplanan örneklerin tamamında PCR analizleri sonucunda tek tür olarak *N.ceranae*'nin tespit edilmesi Dünya'da ve Türkiye'de yapılmış önceki çalışmalarda (12, 15, 16, 22, 54) belirlendiği gibi *A. mellifera* kolonilerinde *N. ceranae*'nin *N.apis*'in yerini aldığı ve daha baskın tür olduğu görüşünü teyit etmektedir. Yine ilgili literatürlere (29-33) uyumlu olarak bizim çalışmamızda da bütün odaklardan toplanan tüm örneklerde *N.ceranae*'nin tespit edilmesi bu türün *N.apis*'e göre daha patojen olabileceğini göstermektedir.

Odak olarak belirlenen arılıklarda yapılan incelemelerde nosemosisin haricinde başka hastalık etkenlerine (varroasis vs.) rastlanılması daha önce yapılan bazı çalışmalara (12, 50) uyum sağlamıştır.

Nosemosisin Türkiye'de tür içi tayini ilk olarak Ütük ve ark., (15) tarafından Samsun ve Giresun illerindeki yaptığı çalışmayla başlamış ardında aynı yıl Muz ve ark. (7) Hatay ili ve Güney Marmara Bölgesinde; Whitaker ve ark., (52) ülkemizde 20 ilde yaptıkları çalışmayla *N. ceranae* ile *N. apis* varlığını bildiren çalışmalarla sürdürülmüştür. Bu tez çalışması, Elazığ ilinde ilk kez multipleks PZR kullanılarak *A.mellifera*'da *Nosema*'nın tür tayininin yapıldığı araştırma niteliğini göstermektedir. Araştırma süresince toplanmış olan örnekler içerisinde mikroskopide *Nosema* pozitif olanların DNA izolasyonunun ardından multiplex (Çoklu) PCR ile analizi yapılmış ve sonucunda görülen sporların tamamının *N. ceranae* olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Elazığ ili Sivrice ilçesinde mikroskobik olarak pozitif tespit edilen kolonilerde moleküler olarak ta *N.ceranae*'nin varlığının belirlenmiş olması

bu türün bölgede baskın tür olduğunu göstermektedir. Bu bulgular ışığında yöredeki Arı hastalıkları ve zararlarıyla mücadelede arıcılara toplu mücadele programları kapsamında bu tür ve özelliklerinin anlatıldığı eğitimlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu ve benzeri çalışmalar nosemosis gibi hastalıklarla mücadele, arı ve arı ürünlerinden beklenen yararın sağlanabilmesi açısından seyyar arıcılık ve ilaç kullanımının kontrol altına alınması, bölge laboratuvarların güçlendirilmesi ve hastalık veri tabanının oluşturularak erken uyarı sisteminin aktif hale getirilmesinin önemli olduğunu göstermektedir.



7. KAYNAKLAR

1. ŞAKİ C.E. Arı Hastalıkları Ders Notları. Ders Teksir No: 42 (1999)
2. Doğanay, A.. Genel Arıcılık. In: Doğanay A, Aydın L. (Editörler). Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Hastalıkları. 1. Baskı. Bursa: Dora Basım Yayın Dağıtım Ltd. Şti; 2017. p. 21-55.
3. Erickson EH, Stanley Jr. D, Martin C and Garment B, Bee Book.Jawa University Pres, USA, 1999.
4. vanEngelsdorp D, Meixner MD, A historical review of managed honeybee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J of Invertebr Pathol 2010; 103: 80-95.
5. Fıratlı Ç ve Gençler, HV. Dünyada arıcılık ve Türkiye'nin yeri. Türkiye II. Teknik Arıcılık Kongresi. 8-9 Şubat 1994. Ankara.
6. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/aricilik/Link/2/Aricilik-Istatistikleri> 20.05.2020.
7. Muz MN, Solmaz H, Yaman M, Karakavuk M. Kış Salkımı Erken Bozulan Arı Kolonilerinde Paraziter ve Bakteriyel Patojenler. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 2012; 23 (3):147–150.
8. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr> 20.05.2020
9. Conte YL, Najavas M. Climate change: Impact on honeybee populations and diseases, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2008; 27 (2): 499-510.
10. Furgala B, Mussan EC. Protozoa. In: Morse R, Nowogrodzki R. (Editors). Honey Bee Pests, Predators and Diseases. Second Edition. Ithaca and London: Comstock Publishing Associates, Cornell Univ. Press; 1990. p. 48-63.
11. James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 2006; 443: 818-22.
12. Girişgin AO. Mantar Hastalıkları. Nosemosis. In: Doğanay A, Aydın L, (Editörler). Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Hastalıkları. 1. Baskı. Bursa: Dora Basım Yayın Dağıtım Ltd. Şti; 2017. p. 381-389.
13. Cummins J. Parasitic fungus and honeybee decline. 2007; ISIS Report 18.06.07
14. Ütük AE, Pişkin C, Kurt M. Türkiye'de *Nosema ceranae*'nin ilk moleküler tanısı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 57: 275-278.
15. Higes M, Hernández RM, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol, 2006; 92: 93–95.

16. Paxton RJ. Does infection by *Nosema ceranae* cause “colony collapse disorder” in honeybees (*Apis mellifera*)? J of Apicult Res 2010; 49: 80-84.
17. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology 1996; 32: 356–365.
18. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS. *Nosema ceranae* is a long present and wide-spread microsporidian infection of the European honeybee (*Apis mellifera*) in the United States. J Invertebr Pathol, 2008; 97: 186–188.
19. Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Vet Parasitol 2010; 170 (3-4): 212-217.
20. <http://www.kanawhavalleybeekeepers.co/kvbawp/wp-content/uploads/2017/06/NosemaapisNosemaceranaespores.png> 20.05.2020
21. Fries I, Martin R, Meana A, García-Palencia P, Higes M. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honeybees. J Apicult Res 2006; 45: 230-233.
22. Fries, I., *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*), J Invertebr Pathol 2010; 103: 573-579.
23. Fries I, Granados, RR, Morse RA. Intracellular germination of spores of: *Nosema apis* Z, Apidologie 1992; 23, 61-70.
24. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-27769-6_2149-2. 20.05.2020
25. Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., , A cellculture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honeybee-pathogenic microsporidia. Environ Microbiol 2010; 13(2): 404-413.
26. De Graaf DC, Raes H; Sabbe G; De Rycke PH and Jacobs FJ, Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*), J Invert Pathol 1994; 63: 74-81.
27. OIE, Nosemosis of Honey Bees, Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines: Bee Diseases, OIE, Paris, France 2008.
28. Higes M, Martín-Hernández R, Meana, A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C Nosemosis. Apidologie 2010; 41: 375-392.
29. Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. J Invertebr Pathol, 2009; 100, 185-188.

30. Paxton RJ, Julia K, Seppo K, Ingemar F. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 2007; 38, 558–565.
31. Higes M, García-Palencia P, Hernández RM, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol*, 2007; 94, 211–217.
32. Higes M, Hernández RM, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal M J, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Env Microbiol*, 2008; 10, 2659–2669.
33. Oldroyd BP. What’s killing American honey bees? *PLoS Biol*, 2007; 5, 1195–1199.
34. Ütük AE, Pişkin FÇ, Girişgin AO, Selçuk O, Aydın L. Microscopic and molecular detection of *Nosema spp.* in honeybees of Turkey. *Apidologie* 2016; 47: 267–271.
35. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N. Dominance of *Nosema ceranae* in honeybees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 2010; 42: 49-58.
36. Boland W, Fro C and Lorenz M. Esterolytic and lipolytic enzymes inorganic synthesis. *Synthesis* 1991; 12: 1049-1072.
37. Zambonelli A, Zechini D’Aulerio A, Bianchi A and Albasini A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi invitro. *J Phytopathol* 1996; 144 (9-10): 491–494.
38. Yücel B, Doğaroğlu M. Quality Assurance in Bee Products; “Good Manufacturing Practises (GMP)”. 1st Marmaris International Apitherapy and Bee Products Symposium. 20-22 November, Marmaris-Muğla/Turkey. P:25. 2015.
39. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in Professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 2009; 1 (2): 110–113.
40. Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M, Immunesuppression in the honeybee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* 2009; 11 (9): 2284-2290.
41. Hernandez RM, Meana A, Garcia-Palencia P, Marin P, Botias C, Garrido-Bailon E, Barrios L, Higes M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *App Environ Microbiol* 2009; 75 (8): 2554–2557.
42. Tosun, O. Bal Arılarında (*Apis mellifera* L., 1758) Nosemosis (Nosematosis) Hastalığının Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Bulunan Arı Kolonilerinde ki Varlığı, Dağılımı ve Hastalık Etkenlerinin karakterizasyonu. Doktora tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2012.

43. Tutkun, E., İnci, A. Bal Arısı Zararlıları, Hastalıkları ve Tedavi Yöntemleri. Demircioğlu Matbaacılık. Ankara 1992.
44. Aydın, L., Güleğen, E., Çetinbaş, H., Prevalence of *Nosema apis* in Southern Marmara Region in Turkey. Apimondia 2001. ISBN: 0-620-27768-8.
45. Şimşek H, Dilgin N, Gültekin İ Elazığ yöresinde bulunan arı işletmelerinde nosematosisin yaygınlığı. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2001; 12: 49-51.
46. Çakmak İ, Aydın L, Güleğen AE. Güney Marmara bölgesinde balarısı zararlıları ve hastalıkları. Uludağ Arıcılık Dergisi 2003; 1: 33-35.
47. Topçu B ve Arslan MÖ. Kars Yöresindeki Balarılarında Nosemosis'in Yaygınlığı. Uludağ Arıcılık Dergisi, 2004; (4): 164-170.
48. Şimşek H Elazığ yöresi bal arılarında bazı parazit ve mantar hastalıklarının araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2005; 52: 123-126.
49. Kutlu MA, Gazioğlu A. Bingöl ili bal arılarında (*Apis mellifera* L.) *Nosema* (nosematosis) hastalığının yaygınlığı. II. Bingöl sempozyumu. 115-119, 2008.
50. Ütük AE, Pişkin FÇ, Deniz A, Balkaya İ. Varroosis ve nosemosis üzerine retrospektif bir çalışma. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2011; 22: 11-15.
51. Yalçınkaya A ve Keskin N. The Investigation of Honey Bee Diseases after Colony Losses in Hatay and Adana Provinces of Turkey. Mellifera 2010; 10-20: 24-31.
52. Whitaker J, Szalanski, AL, Kence M. Molecular detection of *N. ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. Apidologie, 2011; 42 (2): 174-180.
53. Shimanuki H, Knox DA. Diagnosis of honeybee diseases, USDA Handbook No, 690, 2000.
54. Hernández RM, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Bailon EG, Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl Env Microbiol 2007; 73: 6331-6338.
55. Uygur ŞÖ, Girişgin AO. Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. Uludağ Arıcılık Dergisi 2008; 8, 4 :130-142.
56. Büyük M, Tunca Rİ, Taşkın A. Türkiye'de *Nosema spp.* Varlığına Yönelik Yapılmış Çalışmalar. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 2014; 1(2): 234-238.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri;

Adı Soyadı : Mehmet ILGIN
Doğum Yeri ve Yılı : Kırşehir - 1987
Medeni Hali : Evli
E posta : mehmetilgin@yandex.com

Eğitim Bilgileri;

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2006 – 2011
(Lisans)
Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2017 – Devam Ediyor
Parazitoloji Anabilim Dalı
(Yüksek Lisans)

Mesleki Görevleri;

Diyarbakır İli Çermik Tarım İlçe Müdürlüğü 2012 - 2013
(Veteriner Hekim)
Elazığ İli Sivrice Tarım İlçe Müdürlüğü 2013 - 2015
(Veteriner Hekim)
Elazığ İli Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü 2015 – Devam ediyor
(Veteriner Hekim)