

BAZI SENTETİK ANTİBİYOTİKLER VE BİTKİSEL YAĞLARIN BAL ARISI (*Apis mellifera* L.) YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIKLARINDAKİ (AMERİKAN VE AVRUPA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ) ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN SAPTANMASI

DETECTION OF ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SOME SYNTHETIC ANTIBIOTICS AND ESSENTIAL OILS ON THE HONEY BEES (*Apis mellifera* L.) FOULBROOD DISEASES (AMERICAN AND EUROPEAN FOULBROOD)

ASLI ÖZKIRIM

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI 'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
(Ünvanı, Adı ve Soyadı)

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Nevin KESKİN

Üye :.....
Prof. Dr. Ay ÖĞÜŞ

Üye :.....
Prof. Dr. Kadriye SORKUN

Üye :.....
(Ünvanı, Adı ve Soyadı)

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından tarihinde kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

***Canım eşim, prensesim ve sağlıkla gelmesini
sabırsızlıkla beklediğim minik yavruma,
sevgilerimle***

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu çalışmanın planlanması ve gerçekleşmesinde öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yüksek lisans ve doktora eğitimimi kapsayan yaklaşık 10 yıllık bir süreçte daima yanımda olan, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim değerli danışmanım Prof. Dr. Nevin Keskin'e saygıyla teşekkürlerimi sunarım. Arıcılık konusundaki çalışmalarımda desteğini her zaman hissettiğim, her konuda benim yanımda yer alan ve yön veren Prof. Dr. Kadriye Sorkun'a da teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca kendisiyle birlikte, doktora tez çalışmalarımı başlangıcından bugüne değin izleyen ve önerileriyle yoluma ışık tutan tez izleme komitemin diğer üyesi, sevgili hocam Prof. Dr. Ay Öğüş'e tüm kalbimle teşekkür ederim. Tez çalışmamın büyük bölümünü ekibi ve kendisi sayesinde gerçekleştirdiğim, ilgisi ve çalışkanlığına hayran kaldığım, bu zorlu süreçte yanımdaki varlığını asla unutamayacağım Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer ve ekibine sonsuz teşekkürlerimi bildirmekten kıvanç duyarım.

Tezimin tüm Türkiye çapında çalışılacak örneklerinin toplanmasında emeği geçen, başta Türkiye Arı Yetiştiricileri Birliği başkanı olmak üzere tüm il birlik başkanlarımıza yardımlarından ve özverili çalışmalarından dolayı çok teşekkür ederim. Şimdiye dek yapmış olduğum bilimsel çalışmaların tamamının istatistiki değerlendirmelerini yakın arkadaş sıcaklığı, güler yüzü ve titizliği ile yapan ve bana her zaman ayıracak zaman yaratan Öğretim Görevlisi Dr. Serpil Aktaş'a sevgiyle teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca laboratuvarını her şeyiyle kullanımına açan ve hiçbir yardımdan kaçınmayan, samimiyetini ve bilimsel çalışmalarını daima takdirle andığım Öğretim Görevlisi Doç. Dr. Hatice Mergen'e de teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deney ve yazım aşamaları süresince, çalıştığım laboratuvar katında gülen yüzleri ve aile yakınlıklarıyla bana devamlı enerji veren sayın hocalarım Prof. Dr. A. Nihat Bozcuk, Prof. Dr. Hacer Ünlü, Doç. Dr. Nurdan Özer, Uzm. Dr. Güzin Emecen Özsoy, Dr. Ergi Deniz Özsoy ve arkadaşlarım Arş. Gör. Tuğba Subaşıoğlu, Arş. Gör. Ş. Banu Önder, Arş. Gör. Burcu Koçak Memmi, Arş. Gör. Emel Akkan, Arş. Gör. Murat Yılmaz ve Arş. Gör. Canan Çobanoğlu ile Selma Onat ve Erdal Aytekin'e çok teşekkür ederim. Çalışmanın tüm aşamalarında deney malzemelerinin yıkama ve sterilliliğini özenle sağlayan Tekn. Vedat Mutlu'ya da teşekkür ederim.

Tez çalışmasının en başından sonuna kadar her adımını birlikte attığımız öncesinde özel çalışma, şimdi ise yüksek lisans öğrencilerimiz olan Başak Öz, Aygün Yalçinkaya ve Duygu Şimşek'e yardımları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca laboratuvara geldiğim her gün tüm ilgileriyle bana güven ve moral veren, akademik yaşamım süresince yerlerini asla dolduramayacağım, kariyerimdeki en önemli kararı birlikte aldığım, sevgi dolu ellerini her zaman sırtımda hissettiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet Ali Onur ve Uzm. Ş. Remma Gülsoy'a tüm kalbimle teşekkür ederim. Ayrıca, Doç. Dr. Mehmet Ali Onur'un tez deney sonuçlarımın fotoğraf çalışmalarını büyük bir titizlikle yapmış olmasından dolayı da teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince, laboratuvar dışındaki yaşantımda her şeyin düzenli ve her zamanki gibi devam etmesini sağlayan, yardım ve desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım Nurhan Atak ve Firdevs Yiğen'e sevgiyle teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere ulaşmamın temellerini atan ve benimle her zaman gurur duyan sevgili annem ve babama, ve her ihtiyaç duyduğumda uzak mesafeleri yok ederek yanımda olan, en büyük moral desteğim, onlarsız bir hayatı asla düşünemediğim canım kızkardeşlerim Oya ve İpek Özdemir'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın en yoğun günlerinde bile anlayış gösterip sabırlı davranan ve bu süreçte bana ayrı bir stres yaşatmayan gözbebeğim, sevgili prensesim Ece Defne Özkırım ile henüz çok daha küçük olmasına rağmen benimle birlikte yorulan, üzülen, sevinen ve benim duygusal tüm değişkenliklerime en az ablası kadar sabır gösteren, sağlıklı gelmesini beklediğimiz minik yavrumuza, hep yanımda olmaları dileklerle çok teşekkür ederim. Ve, sadece tez çalışmam değil tüm öğrencilik ve yüksek lisans-doktora öğrenimim boyunca yanımda olan , sevgi ve desteğiyle ilerlediğim, hayatta başıma gelen en güzel şey; sevgili eşim Özkan Hamdi Özkırım'a benimle birlikte bu yolu göze aldığı için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Bal Arısı Yavru Hastalıkları.....	6
2.1.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB).....	6
2.1.2. Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB).....	10
2.2. Yavru Çürüklüğü Hastalıklarının Tedavi Yöntemleri.....	13
2.2.1. Kültürel ve Mekanik Yöntemler.....	13
2.2.2. Sentetik Antibiyotiklerle Tedavi Yöntemleri.....	13
2.2.3. Bitkisel Yağlarla Tedavi Yöntemleri.....	16
3. MATERYAL-METOD.....	19
3.1. Örneklerin Toplanması.....	19
3.2. Yavru Hastalıklarının Teşhisi.....	19
3.2.1. Yavrulu Petek Örneklerinin İncelenmesi.....	19
3.2.2. Kullanılan Besi Yerleri.....	22
3.2.3. Biyokimyasal Testler.....	23
3.3. Antibiyotik Disklerinin Hazırlanması.....	24
3.3.1. Kullanılan Sentetik Antibiyotikler ve Özellikleri.....	25
3.3.2. Sentetik Antibiyotiklerle Antibiyogram Yöntemi.....	26
3.3.3. Kullanılan Bitkisel Yağlar ve Özellikleri.....	27
3.3.4. Bitkisel Yağlarla Antibiyogram Yöntemi.....	33
3.4. Kültürlerin İnkübasyonu ve Zon Çaplarının Ölçümü.....	34
3.5. Mikrodilüsyon Yöntemi ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Saptanması (MIC Testleri).....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Sentetik Antibiyotiklerin Antibiyogram Testlerinden Elde Edilen Bulgular.....	36
4.2. Sentetik Antibiyotiklerin Etki Performanslarına Ait İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	54
4.3. Bitkisel Yağların GC-MS Bulguları ve Saptanan İçerikleri.....	57
4.4. Bitkisel Yağların Antibiyogram Testlerinden Elde Edilen Bulgular.....	64
4.5. Bitkisel Yağların Etki Performanslarına Ait İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	70
4.6. Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Bulguları.....	75
4.7. Sentetik Antibiyotikler ve Bazı Bitkisel Yağların AFB ve EFB Hastalık Etkenleri Üzerindeki Antibakteriyel Etki Performanslarının İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.....	80

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam ediyor)

Sayfa

4.8. Türkiye'nin Farklı İllerinden Elde Edilen AFB ve EFB İzolatlarının Sentetik Antibiyotikler ve Bitkisel Yağlara Karşı Göstermiş Oldukları Direnç Farklılıklarının Karşılaştırılması.....	81
5. TARTIŞMA.....	86
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. AFB hastalık etkeni <i>P. larvae</i> 'nin genel görünümü.....	7
Şekil 2. 2. <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif ve spor şekilleri (A: spor formu B: vejetatif-spor geçiş formu C: Vejetatif formu).....	9
Şekil 2. 3. AFB tanısı amacıyla <i>P. larvae</i> ve <i>B. alvei</i> 'nin mikroskopik ayırımında kullanılan farklı spor şekilleri (A: <i>B. alvei</i> 'nin vejetatif-spor formu B: <i>P. larvae</i> 'nin vejetatif-spor formu).....	9
Şekil 2. 4 EFB hastalık etkeni <i>M. pluton</i> 'un genel görünümü.....	10
Şekil 2. 5. EFB enfeksiyonu sonrası ortama yerleşebilen saprofitik mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekilleri (A: <i>Enterococcus faecalis</i> B: <i>Bacillus laterosporus</i> C: <i>Bacillus alvei</i>	12
Şekil 3. 1. Yavrulu petek örneği toplanan illerin Türkiye'deki dağılımı ve bulundukları bölgeler.....	20
Şekil 3. 2. Amerikan Yavru Çürüklüğü ile enfekte bir peteğin genel görünümü.....	21
Şekil 3. 3. Amerikan Yavru Çürüklüğü teşhisinde kullanılan “Kibrit Çöpü” deneyi.....	22
Şekil 3. 4. <i>Seseli petraeum</i> (A) ve <i>Seseli tortuosum</i> (B) türlerinin genel görünümü.....	28
Şekil 3. 5. <i>Bifora radians</i> türünün genel görünümü.....	29
Şekil 3. 6. <i>Anethum graveolens</i> türünün genel görünümü.....	30
Şekil 3. 7. <i>Heracleum platytaenium</i> türünün genel görünümü (A: Doğadaki formu, B: Herbaryum örneği).....	31
Şekil 3. 8. <i>Pimpinella anisum</i> türünün genel görünümü.....	31
Şekil 3. 9. <i>Rosmarinus officinalis</i> türünün genel görünümü.....	32
Şekil 3.10. <i>Origanum onites</i> türünün genel görünümü.....	33
Şekil 4. 1. AMC, RA ve SAM antibiyotik disklerinin AFB'de oluşturduğu inhibisyon zonları.....	38
Şekil 4. 2. AZM, TOB ve ER antibiyotik disklerinin EFB'de oluşturduğu inhibisyon zonları.....	38
Şekil 4. 3. Sentetik antibiyotiklere ait AFB hastalığına ilişkin yüzdelik etki oranı dağılımı.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4. 4. Sentetik antibiyotiklere ait EFB hastalığına ilişkin yüzdelik etki oranı dağılımı.....	53
Şekil 4. 5. Bitkisel yağın (kekik yağı) AFB izolatı üzerindeki antibiyogram testi....	65
Şekil 4. 6. Herhangi bir izolat için düzenlenmiş 7 konsantrasyonlu MIC deneyi seti.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFB	Amerikan Yavru Çürüklüğü
AMC	Amoxycillin clavulanic asid
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AZM	Azitromycin
BHI	Brain-Heart Infusion Agar
DF	Serbestlik Derecesi
DMSO	Dimetilsülfoksit
EFB	Avrupa Yavru Çürüklüğü
ER	Erythromycin fosfat
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MS	Means of Squares (Kareler Ortalaması, KO)
NA	Nutrient Agar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Referans Laboratuvarı
OTC	Oxytetracycline
RA	Rifampin
RI	Retention Index
RRI	Relative Retention Index
SAM	Sulbactam ampicillin
SD	Standard Deviation (Standart Sapma)
SE	Standard Error (Standart Hata)
SS	Sum of Squares (Kareler Toplamı, KT)
TOB	Tobramycin

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3. 1. AFB etkeni <i>P. larvae</i> ve non-patojen <i>B. alvei</i> 'nin ayrımı amacıyla kullanılan biyokimyasal testler ve sonuçları.....	24
Çizelge 3. 2. Deneylerde kullanılan bitkisel yağların bitki ismi ve laboratuvar kod numaraları.....	27
Çizelge 4. 1. Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB-EFB izolatları ve biyokimyasal özellikleri.....	37
Çizelge 4. 2. Amoxycillin- clavulanic asidin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	39
Çizelge 4. 3. Amoxycillin- clavulanic asidin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	40
Çizelge 4. 4. Sulbactam- ampicillinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	41
Çizelge 4. 5. Sulbactam- ampicillinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	42
Çizelge 4. 6. Tobramycinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	43
Çizelge 4. 7. Tobramycinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	44
Çizelge 4. 8. Erythromycin fosfatın Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	45
Çizelge 4. 9. Erythromycin fosfatın Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	46
Çizelge 4. 10. Azitromycinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	47
Çizelge 4. 11. Azitromycinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	48
Çizelge 4. 12. Rifampinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	49
Çizelge 4. 13. Rifampinin Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları ve standartları.....	50
Çizelge 4. 14. Amoxycillin-clavulanic asidin yüzdelerik etki oranları.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

Sayfa

Çizelge 4. 15. Sulbactam-ampicillinin yüzdelik etki oranları.....	51
Çizelge 4. 16. Tobramycinin yüzdelik etki oranları.....	51
Çizelge 4. 17. Erythromycin fosfatın yüzdelik etki oranları.....	52
Çizelge 4. 18. Azitromycinin yüzdelik etki oranları.....	52
Çizelge 4. 19. Rifampinin yüzdelik etki oranları.....	52
Çizelge 4. 20. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistik bulgular.....	55
Çizelge 4. 21. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları.....	55
Çizelge 4. 22. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları.....	55
Çizelge 4. 23. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistik bulgular.....	56
Çizelge 4. 24. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları.....	57
Çizelge 4. 25. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları.....	57
Çizelge 4. 26. <i>Seseli petraeum</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	58
Çizelge 4. 27. <i>Seseli resinosum</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	59
Çizelge 4. 28. <i>Seseli andronakii</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	60
Çizelge 4. 29. <i>Seseli tortuosum</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	61
Çizelge 4. 30. <i>Bifora radians</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	62
Çizelge 4. 31. <i>Anethum graveolens</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	62
Çizelge 4. 32. <i>Heracleum platytaenium</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	62
Çizelge 4. 33. <i>Pimpinella anisum</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

Sayfa

Çizelge 4. 34. <i>Rosmarinus officinalis</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	63
Çizelge 4. 35. <i>Origanum onites</i> uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları.....	64
Çizelge 4. 36. Farklı bölgelerden elde edilen Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi.....	66
Çizelge 4. 37. Farklı bölgelerden elde edilen Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi.....	68
Çizelge 4. 38. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular.....	71
Çizelge 4. 39. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA).....	72
Çizelge 4. 40. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları.....	72
Çizelge 4. 41. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular.....	74
Çizelge 4. 42. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA).....	74
Çizelge 4. 43. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları.....	75
Çizelge 4. 44. AFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları.....	79
Çizelge 4. 45. EFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları.....	79
Çizelge 4. 46. AFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan sentetik antibiyotikler ve bazı bitkisel yağların antibakteriyel etki performanslarına ilişkin T-testi sonuçları.....	81
Çizelge 4. 47. EFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan sentetik antibiyotikler ve bazı bitkisel yağların antibakteriyel etki performanslarına ilişkin T-testi sonuçları.....	81
Çizelge 4. 48. AFB hastalık etkeninin farklı illerden elde edilen izolatlarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular.....	82
Çizelge 4. 49. AFB izolatlarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

Sayfa

Çizelge 4. 50. AFB izolatları arasındaki farkın karşılaştırılmasına ilişkin Duncan testi sonuçları.....	83
Çizelge 4. 51. EFB hastalık etkeninin farklı illerden elde edilen izolatlarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular.....	84
Çizelge 4. 52. EFB izolatlarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	84
Çizelge 4. 53. EFB izolatları arasındaki farkın karşılaştırılmasına ilişkin Duncan testi sonuçları.....	85

1. GİRİŞ

Şeker, vitamin ve mineraller yönünden çok değerli bir besin maddesi olan balın verimini arttırmak için, bal üretiminin yanısıra bitki döllemesinde de önemli derecede rol oynayan bal arılarının sağlığına büyük önem verilmelidir. Arı hastalıkları, dünya çapında üzerinde önemle durulan ve bu konuda oldukça geniş araştırmalar yapılan bir konudur. Ülkemizde ise bu konu ile ilgili sağlık taramaları ne yazık ki yeterince yapılamamaktadır. Halbuki bal arıları sadece bal üretimi açısından değil, diğer arı ürünleri olan bal mumu, arı sütü, polen, propolis ve arı zehiri gibi endüstriyel ve sağlık alanında da kullanılan maddelerin sentezlenmesi ve üretilmesi açısından önemli rol oynar. Amerika Birleşik Devletleri'nde arıların bal ve balmumu gibi ürünlerinden ve polinasyon aktivitelerine bağlı tarım ürünlerinden milyonlarca dolar yıllık gelir sağlandığı bildirilmiştir (Koenig, 2004). Ülkemizdeki mevcut bitki türlerinin çiçeklenme dönemlerinin farklı olması, topoğrafik durum nedeniyle birkaç iklimin birarada yaşanması, ayçiçeği ve pamuk gibi endüstriyel bitkilerin geniş alanlara yayılması, çayır ve mera bitkilerinin bolluğu, ayrıca çam ormanlarının ve aromatik ağaç türlerinin bol olması Türkiye'nin bal üretimi açısından çok daha ileri bir konumda olmasını gerektirmektedir. Türkiye koloni sayısı bakımından 1 milyon üçyüz bin koloni ile ülke sıralamalarında Rusya (10 milyon koloni), A.B.D (4 milyon 500 bin koloni), ve Çin'den (1 milyon 400 bin koloni) sonra dördüncü sırada yer almakta iken, bal üretimi bakımından Rusya 210 bin ton ile başı çekmekte, Çin 174 bin ton, A.B.D. 75 bin ton, Meksika 60 bin ton ve Türkiye 36 bin ton ile ancak sekizinci sırada yer almaktadır (D.I.E., 1999). Buna bağlı olarak da elde ettiği gelir, kapasitesinin çok altında kalmaktadır. Son iki yılda ihracat miktarındaki değişiklik bal kalitesindeki düşüşten kaynaklanmakta ve verim giderek azalmaktadır. Başlıca neden ise tüm dünyada üzerinde önemle durulan, çok sıkı tedbirler alınarak yayılımı önlenmeye çalışılan, sadece bu konuda özelleşmiş laboratuvarlarca araştırmaları yapılan arı hastalıklarıdır. Ülkemizde arı sağlığı ile ilgili taramalar çok az oranda yapılmakta, arının sağlıklı bir şekilde gelişimi ve en yüksek verimin alınması arıcının tercihi ve bilgisine bırakılmaktadır.

Arı hastalıkları içinde, önemini her dönemde koruyan iki bakteriyel yavru hastalığı, Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) ve Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) arıcılık sektörünü ciddi zarara uğratmaktadır (Özkırım and Keskin, 2005). Her iki hastalık da

büyük koloni kayıplarına ve bal veriminde önemli ölçüde düşüşe neden olmaktadır. Özellikle, etkeni sporlu bir basil olan Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı, bakterinin spor oluşturma özelliği nedeniyle tedavisinin mümkün olmaması yüzünden ancak koloninin tamamının yakılmasıyla ortadan kaldırılabilir (Shimanuki and Knox, 1991; Alippi, 1997, OIE, 2004). Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığında ise antibiyotik kullanımı mümkün olmasına rağmen, balda kalıntı problemi oluşturmaması nedeniyle tedavide kullanımı tüm Avrupa'da Avrupa Birliği tarafından yasaklanmıştır (OIE, 2004; T. C. Arıcılık Yönetmeliği, 2005).

Ülkemizde de Avrupa Birliği uyum süreci çerçevesinde, Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığının tedavisinde antibiyotik kullanımı alternatifsiz olarak yasaklanmış, Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı ise ihbarı zorunlu olan hastalıklar listesinde yer alarak, yakılarak yok edilmesi uygun görülmüştür (T. C. Arıcılık Yönetmeliği, 2005). Ancak, kovanların arı kolonileriyle birlikte yakılma sürecinde arıcının uğradığı zararı karşılayacak bir tazminat sistemi henüz yürürlükte olmadığından, arıcılar farklı antibiyotikler kullanarak, bilinçsizce hastalığı yenmeye çalışırken farkında olmadan direnç kazanmasına da neden olabilmektedir.

Tüm bu gelişmeler dünya bilim adamlarını Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı etkeninin vejetatif formuna karşı profilaktik ilaç, Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığında ise tedaviye yönelik, balda kalıntı bırakmayan ve hastalık üzerinde etkili olacak yeni ilaç arayışlarına sürüklemiştir. Araştırmaların bir kısmı parçalanma süresi kısa olan ve yan etki performansı düşük sentetik antibiyotikler üzerinde devam ederken (Miyagi et al., 2000; Waite et al., 2003), bir kısmı da bitkilerden elde edilen uçucu özellikte olup kalıntı bırakmayan bitkisel yağların antimikrobiyal etki performansları üzerindedir (Albo et al., 2003; Melathopoulos et al., 2000). Ancak çalışmaların ikinci kısmını oluşturan bitkisel yağlar, çalışılan bölgelerdeki bitkisel çeşitliliğin ve bitkinin yağ veriminin az olması nedeniyle küçük miktarlarda elde edilebilmiş, dolayısıyla da buharlaşma yoluyla etki gösterebileceği diğer arı hastalığı etkenlerinden olan *Varroa destructor* ya da *Acarapis woodi* gibi iç ve dış paraziter akarlar üzerinde denenmiştir (Rice et al., 2002; de Guzman et al., 2001; Hood and McCreadie, 2001). Oysa ki Türkiye, bitkisel çeşitliliği kapsamında üç farklı floristik bölgenin (Avrupa- Sibiry, İran-Turan, Akdeniz) kesiştiği bir alanda bulunmaktadır. Türkiye florası, 173 familya ve 1225 cinse ait 10000'e yakın bitki türünden oluşurken, 16 endemik cinse ait 3000

endemik tür içermektedir. Endemizm oranı %30'dur. Özellikle Akdeniz ve Ege bölgesi endemik ve bitkisel yağ eldesi mümkün olan aromatik bitkiler açısından dünya çapında çok büyük bir çeşitliliğe sahiptir (Başer, 1999; Demirci et al., 2006).

Yapılan bu çalışmayla, böyle büyük çeşitliliğe sahip bir florada antimikrobiyal özellik göstereceği düşünülen aromatik bitki türlerinden elde edilmiş olan bitkisel yağların bir bölümü ile etki mekanizmalarına göre farklılık gösteren bazı sentetik antibiyotiklerin, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilmiş olan 14 adet Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni *Paenibacillus larvae* izolatu ve 17 adet Avrupa Yavru Çürüklüğü etkeni *Melissococcus pluton* izolatu üzerindeki antibakteriyel etki performansları saptanmış ve bilim dünyasında iki farklı yönde ilerleyen çalışmaların, Türkiye'nin floral zenginliği içinde karşılaştırmalı olarak deneysel bulgularla incelenmesi sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Apis mellifera (L.), *Hymenoptera* (Zar Kanatlılar) ordosu, Apidae familyası, *Apis* genusuna dahildir (Koning, 1988).

Bal arısının Güney Afrika'dan köken aldığı ve buradan Kuzey Avrupa ile doğuda Hindistan ve Çin'e yayıldığı sanılmaktadır. Fosil şeklinde bulunan ilk bal arısına 40 milyon yıl önce jeolojik Eosen devrinde rastlanmıştır (Koning, 1994).

İnsanların bal arısı kolonilerinden ilk bal elde etmesi 7000 M.Ö zamanında olmuştur. Bal arılarının nasıl bir evrimle koloninin sosyal organizasyonunu ve yiyecek arama davranışını kazandıkları hala tam olarak aydınlatılamamıştır. *Apis mellifera* ikili isimlendirmesi, bal arısına 1758 yılında Carollus Linnaeus tarafından verilmiştir. Birbirine yakın birçok dilde bu isim "bal taşıyan böcek" anlamına gelmektedir (Erickson et al., 1999).

Bal arısının ikisi bileşik (facet), üçü nokta (ocel) göz olmak üzere beş adet gözü vardır. Arının renk ve koku duyusu çok fazla gelişmiştir. Kırmızıyı algılayamaz, insanların göremedikleri UV ışınlarına karşı çok hassastır. Koku alma reseptörleri antenlerinde, tat alma reseptörleri ise ağız çevresinde bulunur ve çok iyi gelişmiştir (Morse and Hooper, 1985).

Evrimleriyle birlikte hızla gelişen diğer özellikleri ise; arıların uçuş kasları, öğrenme yetenekleri, hafızaları, dansları, kimyasal iletişim sistemleri ve üreme sistemleridir. Arının, besinlerini biriktirmesi, yuva sıcaklığını hava akımı meydana getirip suyu buharlaştırarak soğutma, balı metabolize ederek sıcaklık elde etme ve elde ettiği bu sıcaklığı salkım şeklinde bir araya toplanarak uzun bir süre koruma gibi özellikleri, ortama uyum yeteneğinin de ne kadar gelişmiş olduğunun göstergesidir. Bal arısının subarktik kuşaktan tropik kuşağa kadar geniş bir yayılım gösterebilmesi de bu gelişmiş özellikleri nedeniyledir. Arıların, kovan dışında buldukları besinin yerini ve özelliğini ya da o anki ruhsal durumlarını bildiren ses çıkarma, dans etme ve feromon (böceklerdeki salgı bezleri tarafından salgılanan kimyasal maddelerin genel adı) salgılama özellikleri de vardır. Tek bir bal arısı, 14 değişik tonda ses ve çeşitli kimyasal kompozisyonlarda 31 adet feromon salgılayabilir. Normalde bir bal arısı,

kovanından en fazla 3-4 km uzağa uçabilir, fakat bazı durumlarda arıların saatte 24 km hızla, 16 km uzağa kadar uçabildikleri saptanmıştır. Farklı besin kaynaklarına gereksinim duymayan bal arılarının meydana getirdikleri balın, karbohidratlar, yağlar, proteinler, vitaminler ve su bakımından mükemmel derecede dengeli bir besin yapısı vardır (Erickson et al., 1999; Fries and Camazine, 2001; Mahaman et al., 2002).

Uzak mesafeler katedebilen ve küçük bir kovan içinde ortalama sayıları 20000'i bulan bal arıları, çeşitli mikrobiyal ve paraziter hastalıklarla tehdit edilebilmektedir (Shimanuki and Knox, 1991; Koning, 1994; Doğaroğlu, 2004).

Kolonideki birey sayısının çokluğu, özellikle enfeksiyon hastalıklarında hastalığın hızla yayılmasında çok önemli bir rol oynar. Arının kovan dışında nektar toplamak amacıyla kilometrelerce uçuşu, hastalığın başka bölgelere taşınmasında oldukça etkilidir. Diğer yandan, bal arılarının evrimi süresince enfeksiyonlara karşı güçlü doğal korunma mekanizmaları gelişmemiştir. Genellikle hastalıklı kolonilerden gereken verim alınamamaktadır. Ancak birtakım içgüdüsel davranışlarla hastalığın kovan içinde yayılımı önlenmeye çalışılmaktadır. Bunun dışında mevsimsel faktörler de hastalıkların oluşması ve yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Örneğin, en önemli bakteriyel hastalıklar olan Amerikan Yavru Çürüklüğü ve Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalıkları, yağışların, serin ve nemli hava koşullarının bittiği ve havaların ısınıp, kovan içi sıcaklığın 30-37 °C'ye yükseldiği dönemde ortaya çıkar. Çünkü bu sıcaklık, her iki hastalık etkeni için de en uygun üreme sıcaklığıdır. Aynı zamanda bu mevsimsel periyod, arıların hayat siklusunda bakterilerin üzerinde yaşama ortamı bulacakları yavruların olduğu üreme mevsimidir (Morse, 1997; Shimanuki and Hung, 1999; OIE, 2004).

Bakteriyel hastalıklarda, hastalık etkenlerinin çok sayıda ve hızlı üreyebilmesi, kolaylıkla taşınabilmesi ve bulaşabilmesi, spor oluşturmaları durumunda tedavinin imkansız hale gelmesi nedeniyle koloni sayısındaki ve bal verimindeki kayıp büyüktür. Bal arısı larvalarında görülen ve yavru çürüklüğü olarak adlandırılan bu enfeksiyonel hastalıkların sadece Ankara ili ve çevresinde görülme oranı %21 olarak kaydedilmiştir (Özkırım and Keskin, 2002). Bu oran tek il bazında bile hastalıkların ilerleyişi ve yayılımı bakımından büyük tehlike oluşturmaktadır.

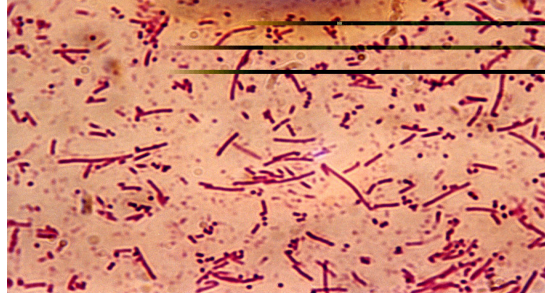
2. 1. Bal Arısı Yavru Hastalıkları

Sağlıklı bal arısı kolonilerinde yavru petekleri, aralarında boşluk olmayan, içi dolu ve birbiriyle sıkı bir şekilde bağlantılı yavru gözlerden oluşur. Peteğin orta kısmından yan kenarlara doğru hemen her petek gözde yumurta, larva ya da pupa mevcuttur. Petek yavru gözleri kapatıldığında, hepsi aynı renkte ve konveks bir görünümündedir. Hastalıklı kolonilerden alınan yavru peteklerinde de bunun aksine, delik gözler, rengi koyulaşmış, yarı açık ve içe çökük petek göz kapakları bulunur. Dahası, gözün dip kısmında kurumuş olarak kalmış larval ya da pupal kalıntılara da rastlamak mümkündür. Yavru hastalıkları, etken olan bakterinin özelliğine göre çeşitli belirtiler gösterir (Shimanuki and Knox, 1991; Hornitzky and White, 2001).

2. 1. 1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB)

Etkeni bir bakteri olan *Bacillus larvae*’ dir. *Bacillus* genusu birçok yeni isme ayrılabilir. Dolayısıyla, AFB etkeni olarak son yıllarda “*Paenibacillus*” ismi de kullanılmaya başlanmıştır. Buna göre; hastalık etkeni olan bakteri “*Paenibacillus larvae spp. larvae*” olarak isimlendirilmektedir (Shimanuki and Feldlaufer, 1998; Jelinski, 2003; Hansen et al., 2003). 1906 yılında G.F. White tarafından ilk olarak tanımlanan bu yavru hastalığına “Amerikan Yavru Çürüklüğü” denmesinin sebebi, hastalığın coğrafik yayılımından tamamen bağımsız olup, hastalık üzerindeki ilk çalışmaların Amerika’da gerçekleşmesi ve ilk olarak New York Tarım Enstitüsü’nde tanımlanmış olmasıdır. Hastalığın, dünyanın her yerinde çok tehlikeli ve bulaşıcı olduğu saptanmıştır (OIE, 2004).

Mikroaerofil, Gram (+), sporlu ve basil formunda olan *Paenibacillus larvae*’nin vejetatif formları 2.5-5µm boyunda ve yaklaşık 0.5µm genişliğindedir (Şekil 2. 1.). Sporları ise oval görünümündedir. Karbol fuksin ile boyandıklarında spor duvarları kırmızı mor, ortası daha açık renk boyanır. Sporlar biraraya toplanmış şekilde dururlar. Enfekte bir larvadan elde edilebilecek bakteri spor sayısı yaklaşık 2.5 milyardır. Larva enfekte olduktan sonraki ilk 10 gün içinde bakterinin vejetatif formlarına rastlanırken daha sonraki dönemlerde sadece spor formları bulunabilir (Shimanuki and Knox, 1991).



Şekil 2. 1. AFB hastalık etkeni *P. larvae*'nin genel görünümü

1906 yılından beri bilinmesine rağmen, kovanda kalan sporların hastalığı aktive edip başlattığı çok sonraları anlaşılabilmektedir. *P. larvae*'nin sporları bal, petek ve diğer arı ürünlerinde yıllarca varlığını sürdürebilmektedir. Hastalığın bulunabileceği en uygun dönem aktif yavruleme dönemidir. Hastalıklı larval kalıntılara ise yılın her döneminde rastlamak mümkündür (Morse and Hooper, 1985).

Son derece bulaşıcı ve tehlikeli olan bu yavru hastalığı, dünya çapında arıcılık endüstrisine büyük zararlar vermektedir. Tek bir kovanda başlayan hastalık, hızla diğer kovanlara ve diğer arıliklara yayılabilmekte ve büyük kayıplara neden olmaktadır. Bakterinin enfekte hale geçmesi için, bal arısı larvasının en fazla 3 günlük olması gerekir. Larval yaş büyüdükçe, larvanın AFB ile enfekte olma olasılığı azalır. Sporlar farklı yollarla larvaya ulaştığında, barsakta çimlenir ve vejetatif hale geçer. Vejetatif formlar orta barsak lümeninde çoğalır; daha sonra barsak epiteline penetre olarak hemosöle ulaşan bakteri hemolenf dolaşımına katılır. Vejetatif formlar endospor oluşturur. Hastalık sürecinde larva rengi değişir ve larva septisemi sonucu ölür. Kurumuş larval kalıntısındaki sporlar bala, peteğe ve arıcının kullandığı aletlere bulaşarak hızla diğer kolonilere de yayılabilir (Peng et al., 1998).

Hastalığın ilk belirtisi larvadaki renk değişikliğidir. Larvanın parlak inci beyazı rengi önce parlak açık kahverengiden, koyu kahverengine doğru bir değişim gösterir. Koyu kahverengi renkteki larval kalıntı, ipliğimsi bir hal alarak 20 mm kadar uzayabilir (Alippi, 1997; Sakogawa et al., 1999).

Kapalı yavru gözlerin tümsek yapısı bozularak, içe doğru çökük, üstü delikli bir yapı kazanır. İşçi arılar bu delikli kapakları açarak gözlerdeki hastalıklı larvaları dışarı

çıkarmaya çalışır. Hastalığın en son aşamasında siyah-kahve renkteki ölmüş larva, petek gözün aşağı kısmında ve kapak ağzından dip kısma doğru uzanmış şekilde durur. Eğer larva pupal konuma ulaştıktan sonra ölmüş ise, pupa bir dil gibi petek gözün ortasına doğru uzanır (Sakogawa et al., 1999).

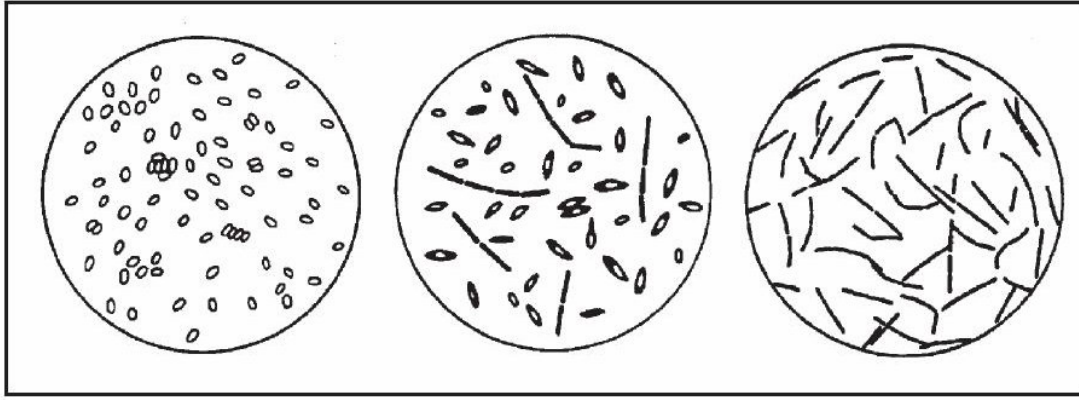
Hastalıklı larva bulunan peteklerdeki diğer bir özellik de tipik tutkal kokusudur (Alippi, 1997).

AFB etkenini taşıyan kovanlardaki *P. larvae*'nin tanısı 1920 yılında White tarafından tipik klinik belirtilerle, mikroskopik inceleme ve kültür teknikleriyle açıklanmıştır. Sonraki yıllarda patojenlerin belirlenmesinde, enfeksiyon kaynağını tespit etmeye yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Gochner (1981), AFB ile enfekte olan kovanlardan topladığı bal, balmumu ve polende mikroskopik metod ile *P.larvae* sporlarını teşhis etmiştir. Anderson ve Gibbs (1989), ise ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle birçok bal arısı patojeninin tespitini yapmıştır. Halen *P. larvae*'nin ergin arılardan izole edilerek teşhisi de mümkün olmaktadır. Hatta bu yöntemle hastalık etkenini taşıyan ergin arılardan en az 6 hafta sonra larvada hastalığın görülüyor olması, erken teşhiste önemli bir adımdır (Hornitzky and Karlovskis, 1989).

Son yıllarda hastalığın teşhisi daha kolay ve kesin tanı yöntemlerinden olan PCR kullanılarak yapılmakta, böylelikle teşhise direkt gen dizilimi üzerinden gidilerek, en hafif enfeksiyon düzeyleri bile saptanabilmektedir (Govan et al, 2002; Lauro et.al., 2003).

Tanı yöntemi olarak kullanılan mikroskopik ve biyokimyasal testler sonucunda, *P. larvae* sporları havada asılı duran su damlalarına (hanging-drop) benzetilmiştir (Şekil 2. 2.). Aynı yöntemlerle larva üzerinde başka *Bacillus* türlerinin varlığı da tespit edilebilmiştir. AFB'nin karakteristik belirtilerinin görüldüğü larva örneklerinin % 94'ünde *P. larvae* sporlarının yanında *Bacillus alvei* sporlarına da rastlanmıştır (Alippi, 1991; Shimanuki and Knox, 1991). *B. alvei*'nin larva üzerinde saprofitik bir yaşam sürdüğü farkedilmiştir (Hornitzky and Karlovskis, 1989). *B. alvei*, saprofitik bir etken olarak AFB nedeniyle ölmüş larvanın üzerinde çoğalmaktadır. Mikroskopik taramalarda ilk anda görülen bu sporlar *P. larvae* sporlarına benzese de elektron

mikroskobu çalışmalarında larval kalıntının yüzey konfigürasyonuna bakılarak ayırım yapılabilmektedir; çünkü tüm *Bacillus* türlerinin spor şekli ve larval yüzeydeki konumu değişik görünmektedir (Şekil 2. 3.). Örneğin; *P. larvae* sporları elipsoidal, ışığı yansıtan, düzgün bir yüzeye sahipken; *B. alvei* sporları uzunlamasına ve birbirine paralel iki kenardan oluşan, tamamen silindirik bir yapıdadır. Bu iki bakterinin ayırımı bazı biyokimyasal testlerle de yapılabilmektedir (Shimanuki and Knox, 1991; Alippi, 1991).

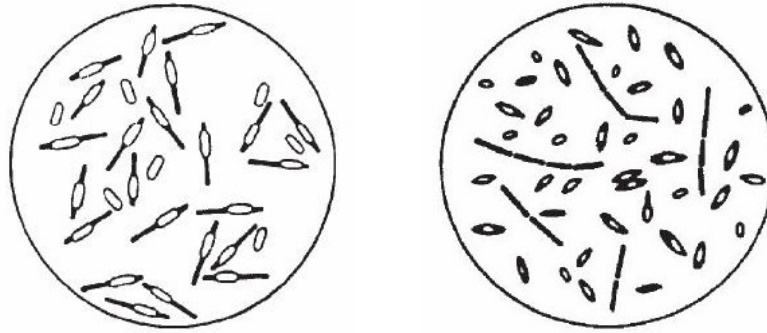


(A)

(B)

(C)

Şekil 2. 2. *P. larvae*'nin vejetatif ve spor şekilleri (A: spor formu B: vejetatif-spor geçiş formu C: Vejetatif formu) (Shimanuki and Knox, 1991)



(A)

(B)

Şekil 2. 3. AFB tanısı amacıyla *P. larvae* ve *B. alvei*'nin mikroskobik ayırımında kullanılan farklı spor şekilleri (A: *B. alvei*'nin vejetatif-spor formu B: *P. larvae*'nin vejetatif-spor formu) (Shimanuki and Knox, 1991)

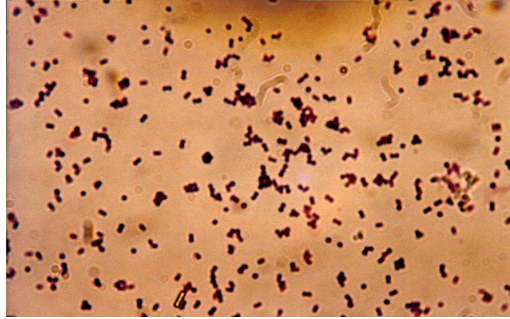
AFB, tanısı kadar tedavisi de zor olan bir yavru hastalığıdır. *P. larvae*'nin proteolitik aktiviteye sahip maddeler sentezleyerek bal arısının immün sistemini inhibe etmesi, diğer patojenlere karşı da tamamen korunmasız hale gelmesine neden olmaktadır (Jarosz and Glinski, 1991).

2. 1. 2. Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB)

Avrupa Yavru Çürüklüğü ya da kısaca EFB, belirtileri bakımından Amerikan Yavru Çürüklüğü ile yakından ilişkilidir. Fakat etken mikroorganizma olan *Streptococcus pluton* sporlanan bir bakteri değildir (Hornitzky and Wilson, 1989).

Bailey ve Collins tarafından 1982 yılında yeniden sınıflandırılan bu bakteri, daha sonra *Melissococcus pluton* olarak isimlendirilmiştir. *M. pluton*, Gram(+), kok şeklindedir. Boyutları, 0.5-0.7µm genişliğinde ve 1.0µm uzunluğundadır (Şekil 2. 4.). Tek, çiftli halde (diplokok) ya da zincir şeklinde görülebilir (Shimanuki and Knox, 1991).

Bakteri toksin salgılamaz, dokuya zarar vermez ve mekanik bir etkisi de yoktur. Sadece larvaların besinini kullanır. Bu tür yaşam şekliyle tam bir parazit gibi davranır (Morse, 1997).



Şekil 2. 4. EFB hastalık etkeni *M. pluton*'un genel görünümü

Genellikle genç larvalara saldıran *M. pluton*, larvayı tamamen sarar. EFB ile enfekte olmuş larvanın rengi koyulaşır. Bakteri, larvanın orta barsağında üremeye başlar (Erickson et al., 1999).

Eğer bir larva gençken çok sayıda bakteri ile enfekte olmuşsa, bu larvanın tüm barsağı bakteri ile doludur. Bu durumdaki larvaya herhangi bir ek besin verilmezse, larva açlıktan ölür. Bir bakıma EFB'nin larva üzerindeki harabiyeti açlık nedeniyle ölümdür (Morse, 1997).

EFB ile enfekte olmuş bir kovanda, larva renginde kirli beyazdan sarı-yeşile doğru bir değişme, bakıcı arıların hastalıklı ya da ölmüş larvaları dışarı atmak amacıyla petek gözleri açması sonucu oluşmuş çok sayıda delik petek göz, larvanın gözün tabanında “C” şeklindeki anormal yerleşimi gibi değişik belirtiler gözlenebilir (Frow and Delacan, 1999).

Hastalığın belirtileri arasında benzerlikler görülse de EFB’de Amerikan Yavru Çürüklüğü’ndeki gibi karakteristik bir tutkal kokusu veya larvada ipliksi uzama belirtileri görülmez (Morse, 1997).

Bulaşımı, öncelikle işçi arıların ağız parçalarına bulaşan bakterinin besleme görevi sırasında yavruya geçmesidir. Arıcının kullanmakta olduğu aletlerin de kontamine olması, bulaşımında rol oynar (Shimanuki and Knox, 1991).

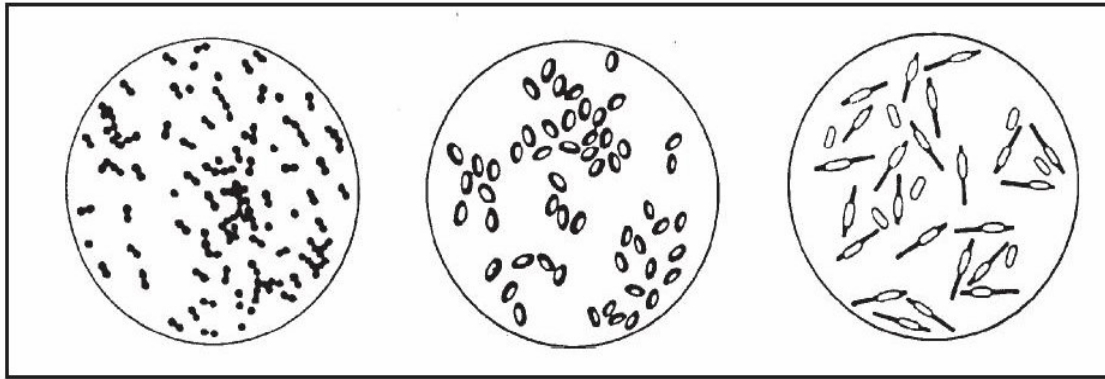
EFB’de koloni nadir olarak ölür. Hastalık nedeniyle koloni zayıflar, verimi azalır; ancak yaşamını mevsimden mevsime sürdürebilir. Yavrular, mevsim başlangıcında daha iyi beslendiği için canlılıklarını koruyarak pupalaşmaya gidebilir. Hastalığın pupalardaki devamı, daha sonraki nesillerde devamını sağlayabilmesi açısından kaynak oluşturur (Morse and Hooper, 1985).

Koloninin altında kaldığı stres, çoğunlukla EFB’nin gelişmesiyle büyük bir ilişki içindedir. Çok miktarda larva üretildiğinde ya da nektar kıtlığında hastalığın görülme olasılığı daha yüksektir. Koloninin üzerindeki stresi azaltan yöntemler, diğer hastalıklarda olduğu gibi EFB’de de koruyucu bir etken olacaktır (Erickson et al., 1999). EFB’de açlık nedeniyle oluşan direnç düşüklüğü ikincil enfeksiyonlar için de çok uygun bir ortam oluşturur. Özellikle EFB ile enfekte kolonilerde, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacterium eurydice*, *Bacillus apiarus* gibi bakteriler rahatlıkla ürer. Özellikle *B. alvei*’nin larva üzerindeki varlığı EFB’nin habercisi olarak bilinir (Hornitzky and Wilson, 1989; Shimanuki and Knox, 1991 ; Dijordjevic et al., 1999).

Sporlu bir bakteri olan *B. alvei*, saprofitik olarak larva üzerinde çoğalır ve ilerleyen safhalarda Amerikan Yavru Çürüklüğü’ne benzer şekilde larvada kahverengi bir görünümle iplik şeklinde uzamaya neden olur. Bu nedenle, ileri dönemdeki EFB ile

AFB'nin birbiriyle karıştırılması olasıdır. Bu durum, iki hastalığın tedavi yöntemlerinin ve kovandaki kalıcılık oranlarının farklı olması ve tanıdaki yanlışlık nedeniyle daha büyük sorunlar ortaya çıkarabilir (Hornitzky and Wilson, 1989 ; Williams, 2000). Diğer yandan *B. alvei*'nin, EFB tedavisinde de kullanılan Oxytetracycline'e karşı dirençlilik göstermesi, antibiyotiğin hastalığın tedavisindeki etkinliğini azaltmaktadır (Alippi, 1991).

EFB ile birlikte görülen diğer bakterilerden *B. laterosporus* da sporlu bir bakteridir ve *B. alvei*'den sporlarının şekli ile ayrılır. *Streptococcus faecalis*, genellikle asıl etken olan *M. pluton* ile çok fazla benzerlik gösterse de mikroskop altında, zincir oluşturmayıp, çiftler halinde (diplokok) bir görünüm sergilemesiyle kolaylıkla ayrılır (Şekil 2. 5.). *Bacterium eurydice* hakkında ise halen fazla bilimsel çalışma yoktur. Son olarak *B. apiarius*, çok nadir görülen sporlu Gram(+) bir bakteridir. Diğer *Bacillus* türlerinden kalın kenarlı ve yuvarlak spor şekliyle kolayca ayrılabilir (Shimanuki and Knox, 1991 ; Govan et al., 2001).



(A)

(B)

(C)

Şekil 2. 5. EFB enfeksiyonu sonrası ortama yerleşebilen saprofitik mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekilleri (A: *Enterococcus faecalis* B: *Bacillus laterosporus* C: *Bacillus alvei*) (Shimanuki and Knox, 1991)

2. 2. Yavru Çürüklüğü Hastalıklarının Tedavi Yöntemleri

2. 2. 1. Kültürel ve Mekanik Yöntemler

Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığında hastalık etkeninin sporlu bir bakteri olması, tedavisini ve tedavi sonrası mücadelesini zorlaştırmaktadır. Hastalığın erken evrelerinde, Amerikan Yavru Çürüklüğünün antibiyotik kullanımına gerek kalmaksızın kontrolünün mümkün olabileceği üzerinde durulmuştur. Buna göre, hastalıklı kolonilerden alınan ergin arılar silkelenerek temiz çerçevelere aktarılmış, iki gün sonra ise temiz kovanda spor yoğunluğunun oldukça düştüğü saptanmıştır. Sallama metodu kullanılan kolonilerin % 20'sinde tekrar hastalığa ait bir klinik belirti görülmemiştir (Benson, 1998 ; Doğaroğlu, 2004 ; Hornitzky and White, 2001). Ancak bu %20'lik düşüş, hastalık etkeni olan bakterinin üreme hızıyla kıyaslandığında çok yetersiz kalmaktadır (Sakogawa et al., 1999).

Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığında ise enfeksiyon düzeyi düşükse, hastalığın kültürel tedavisi daha dirençli bir stokla kraliçe arının yenilenmesi ile olur. Bu durum koloniye yeni genetik materyal katar (Erickson et al., 1999). Hatta güçlü kolonilerde, arıların yoğun ve vitamin destekli şuruplanması ve larvaların aç kalmasının önlenmesi hastalıkla mücadelede etkin bir rol oynamaktadır (OIE, 2004).

Günümüzde kültürel ve mekanik tedavi yöntemleri, bakteri türlerinin kimyasallar ve dış etkenler nedeniyle direnç kazanmış olmasından dolayı yetersiz kalmaktadır (OIE, 2004).

2. 2. 2. Sentetik Antibiyotiklerle Tedavi Yöntemleri

AFB hastalığının ortaya çıkmasından günümüze kadar çeşitli antibiyotik tedavileri de denenmiş, en uygun ve en etkili antibiyotik bulunmaya çalışılmıştır. 1944'lü yıllarda sülfathiazole kullanılmış, 1951'li yıllardan sonra terramycine (oxytetracycline) kullanılmaya başlanmıştır(Miyagi et al., 2000 ; Piccini and Zunino, 2001). Antibiyotiğin kullanımı, şekerli şuruplarla veya toz halinde pudra şekerine karıştırılıp, kovana verilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Morse and Hooper, 1985).

Oxytetracycline (OTC)'nin bakteri üzerinde gösterdiği etki koloni verimini etkilemeye başlamış ve araştırmalar OTC'nin arı üzerindeki olumsuz etkilerine yönelmiştir. Buna göre arılar üzerinde en sık kullanılan OTC ve amitraz (akar etkenli başka bir arı hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır)'ın arı larvalarının orta barsak epitel hücrelerinde nekrozlara ve programlı hücre ölümlerine (apoptosis) neden olduğu bildirilmiştir. Normal koşullar altında AFB etkeni olan *P. larvae*'nin de etkisi, larvanın orta barsak epitel hücrelerinde nekroz ve hücre ölümüne neden olmasıdır. Ancak enfeksiyondaki hücre ölümü oranı % 5 iken, OTC ve/veya amitraz ile tedavi edilmiş koloni larvalarında bu oran %30'a yükselmekte ve aynı zamanda hücre yenileyici tabakanın da büyük ölçüde tahribatına neden olmaktadır (Gregorc and Bowen, 2000).

Zamanla oxytetracycline'ne karşı AFB etkeni *P. larvae*'nin de direnç oluşturmaları sonucu alternatif yeni antibiyotik araştırmaları hız kazanmıştır. Deneme yapılan antibiyotikler arasında mirosamicin ve ampicillin de bulunmaktadır. Ancak, bunlardan mirosamicin'in AFB'ye karşı etkili olmanın aksine üremesini indüklediği rapor edilmiştir. Aynı zamanda balda uzun süreli ve yüksek miktarda kalıntı bırakmaktadır (Nakajima et al., 1998). Ampicillin'in ise AFB üzerinde etkisinin olup olmadığı larva üzerindeki düşük dağılımı nedeniyle şüpheli bulunmuştur. Bal üzerindeki kalıntı miktarının ise çok yüksek dozda olduğu bildirilmiştir (Nakajima et al., 1997).

OTC ile aynı düzeyde etkili bulunan ve üzerinde birçok farklı çalışma yapılan, hatta kullanımı da yaygınlaştırılan diğer bir antibiyotik tylosin'dir. Tylosin+şeker+su karışımının AFB üzerinde yüksek oranda etkili olduğu rapor edilmiştir (Miyagi et al., 2000 ; Elzen et al., 2002 ; Elzen et al., 2003). Diğer bir çalışmada da tylosin'in etki performansı başka bir antibiyotik olan erythromycin'le birlikte değerlendirilerek OTC ile karşılaştırılmıştır. Buna göre her üç antibiyotik de ergin arılar üzerinde herhangi bir toksisite göstermemiştir. Ancak, erythromycin'in AFB etkenine karşı hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Tylosin ise AFB'ye karşı oldukça etkili bulunmuş, tedavi sonrası hastalık etkilerinin baskılanma süresi bir yıl olarak rapor edilmiştir. Halbuki varolan durumda OTC'ye karşı hem bir direnç oluşmuştur hem de OTC'nin etki süresi 5-10 ay arasında değişmektedir. Tylosin'in baldaki parçalanma süresi de 60 gün olarak rapor edilmiştir (Alippi et al., 2001). Kalıntı miktarı ile ilgili başka bir çalışmada

ise, uygulama sırasında 1.31 ppm tylosinin kalıntı miktarının 3 hafta gibi kısa bir süre sonra 0.16 ppm'e düştüğü belirtilmiştir (Feldlaufer et al., 2004).

Tylosin AFB'ye etkili bir antibiyotik olmasına rağmen, oluşabilecek bir direnç olasılığına karşı alternatif yeni antibiyotik araştırmaları devam etmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada farklı gruplara ait 27 adet antibiyotik, antibakteriyel etki performansları açısından incelenmiştir. Buna göre, Tetrasiklinler grubunda : chlortetracycline, demoklocycline, doxycycline, minocycline, oxytetracycline, tetracycline ; Aminoglikozidler grubunda : amikacin, gentamicin, kanamicin, nemicin, paromomicin, streptomycin, tobramycin ; Aminosiklitler grubunda : apramycin, spektinomycin ; Kloramfenikol grubunda : chloramphenicol ; peptidler grubunda : basitrasin, colistin, polymixin ; Glikopeptidler grubunda : vankomycin ; Makrolidler grubunda : erythromycin, oleandomycin, tylosin ; Linkosaminidler grubunda : clindamycin, linkomycin ; Poliether ionoforları grubunda : monensin ; ansamakrolidler grubunda : rifampin antibiyotikleri AFB üzerindeki etkilerinin saptanması amacıyla antibiyograma alınmışlardır. Araştırma sonunda AFB etkeni olan *P. larvae*'nin OTC ve diğer tetrasiklinlere karşı farklı derecelerde de olsa belirgin bir direnç gösterdiği saptanmıştır. Amerikan Yavru Çürüklüğü'ne karşı en etkin antibiyotikler linkomycin, monensin ve tylosin olarak bildirilmiştir. Rifampin de etkin antibiyotikler arasında yer almasına rağmen, yalnızca tüberküloz tedavisinde kullanılan ağır etkili bir antibiyotik olması ve tarımda kullanım yasağının bulunması nedeniyle kayda geçirilmemiştir (Kochansky et al., 2001).

Son yıllarda AFB üzerinde etkili bulunan antibiyotiklere, yenilerinin eklenmesi amacıyla yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Kochansky ve Pettis'in yapmış olduğu çalışmada pirlimycin, tiamulin ve poliether ionoforları grubundan narasin, lasalosid, salinomycin, laidlomycin, maduramycin antibiyotikleri antibiyogram testine tabi tutulmuştur. Sonuçta, pirlimycin ve tiamulinin in vitro koşullarda yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür ; ancak bu etki tylosin ve linkomycinin etkisinden daha öteye geçememiştir. O nedenle alternatif olarak önerilmesinin gereksiz olduğu rapor edilmiştir. Deneye alınan diğer ionoforlar ise in vitro koşullardaki güçlü aktivitelerine rağmen saha çalışmalarında yetersiz bulunmuştur (Kochansky and Pettis, 2005).

Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığının sentetik antibiyotiklerle tedavisi çalışmalarında, hastalık etkeninin sporlu bir bakteri olmaması, larvanın patojenik etkiden çok, bakterinin larva besinine ortak olması sonucu larvanın açlık nedeniyle ölmesi dolayısıyla çok fazla çeşitlilik gözlenmemektedir. OTC ve erythromycin'le yapılan çalışmalarda her iki antibiyotiğin de EFB üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Thompson and Brown, 2001 ; Waite et al., 2003). Ancak OTC ve grubunun aynı zamanda AFB'ye karşı kullanımları nedeniyle direnç oluşturmaları, EFB tedavisinde çoğunlukla eritromycinin tercih edilmesini sağlamıştır (Kochansky, 2000).

Tüm dünyada her iki hastalık üzerinde de etkili olabilecek farklı antibiyotik araştırmaları devam etse de, Avrupa Birliği ülkeleri ve üyeliğe aday tüm ülkelerde AFB hastalığının herhangi bir sentetik antibiyotik kullanılmaksızın yakılarak yok edilmesine, EFB hastalığında ise şimdiye dek resmi olarak kullanılmakta olan erythromycinin kullanımının yasaklanmasına ve tamamen kültürel ve mekanik tedavi yöntemleriyle tedavisine karar verilmiştir (OIE, 2004 ; T.C Yönetmelik, 2005). Bu strateji, bilim dünyasındaki çalışmaların, arı ve balda uzun süreli kalıntı bırakmayacak, AFB ve EFB üzerinde yüksek antibakteriyel etki gösterebilecek bitkisel yağların alternatif olarak tanımlanması ve araştırılmasına yönelmesine neden olmuştur.

2. 2. 3. Bitkisel Yağlarla Tedavi Yöntemleri

Aslında bitkisel yağların farklı amaçlarla kullanımı uzun yıllardan beri süren araştırmaların başlıca konusudur. Özellikle insan üzerinde patojenite gösteren birçok bakteri türüne karşı çeşitli bitkisel yağ ekstraktlarının antibakteriyel etkileri saptanmaya çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada 52 farklı bitkisel yağ çeşidi, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etkileri açısından test edilmiştir. Citrus (Turunçgiller), Eucalyptus, Origanum (Ticari kekik), Mentha (Nanegiller), Rosmarinus (Biberiye), Thymus (Tıbbi kekik) cinslerine ait birçok türe özgü bitkisel yağın 20 adedi düşük dozda yüksek etki

göstermiştir. Göstermiş oldukları antibakteriyel etki ile tıp alanında sentetik antibiyotiklere büyük alternatif oluşturdıkları bildirilmiştir (Hammer et al., 1999).

Bir yandan elde edilen sınırlı sayıdaki bitkisel yağın antimikrobiyal etki performansları ölçülürken, diğer yandan da yağların içerikleri, antioksidan özellikleri, içerdikleri flavonoidler ve özellikleri de yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Larson, 1998 ; Rice-Evans et al., 1999).

Bakteriyel arı hastalıklarıyla ilgili ilk bitkisel yağ çalışmaları tür adı *Azadirachta indica* olan bir ağaçtan elde edilip formüle edilen azadirachtin'in (Neem yağı), *P. larvae*, *B. substilis* [Gram (+)] ve *E. coli* [Gram (-)] üzerinde denenmesiyle başlamıştır.. Böylelikle terramycin'e alternatif olarak, bitkisel kökenli bu antibiyotiğin kullanımı çok daha etkin bulunmuştur (Alippi, 1991; Peng et al., 1992; Peng et al., 1996; Peng et al., 1998; Alippi et al., 1999 ; Winston, 2000).

Bitkisel yağlarla tedavi yöntemleri daha sonraki çalışmalarda bakteriyel hastalıklardan ziyade, az miktarda yağın bile genellikle buharlaşma yoluyla etki edebildiği arıların parazit akarlarına yönelmiştir. Neden olarak buharlaşmada ergin arı hastalıklarına yağın etkinliğinin ulaşma hızının, bakteriyel hastalıklarda larvaya ulaşma hızından daha fazla olması, yağ çeşitliliğinin istenilen düzeyde olmaması gibi etkenler ileri sürülmüştür(van Engelsdorp and Otis, 2001 ; Hood and McCreadie, 2001 ; De Guzman et al., 2001 ; Nasr et al., 2001 ; Harrison and Camazine, 2001 ; Rice et al., 2002 ; Bailey and Perry, 2002).

Son yıllarda yapılmış olan en kapsamlı çalışmada ise Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığına karşı savory, kekik yağı, limon yağı, oregano, limon yağı+kekik yağı karışımı, limon yağı+kekik yağı+oregano karışımı ayrı ayrı antibakteriyel etkileri açısından incelenmiştir. Öncelikle ergin arılar üzerinde yapılan LD₅₀ ve toksisite çalışmalarında her üç yağ ve karışımları non-toksik ya da hafif toksik olarak tespit edilmiştir. Ancak araştırmanın sonunda tek başına ya da karışım olarak hiçbir yağ AFB üzerinde etkili bulunamamıştır (Albo et al., 2003). Hatta bazı AFB suşlarında limon yağının üremeyi indüklediği rapor edilmiştir (Alippi et al., 1999 ; Padin et al., 2000 ;Albo et al., 2003). Bitkisel yağların AFB ve EFB tedavisindeki etkinlikleri ile ilgili halen geniş kapsamlı ve çeşitli literatür çalışması bulunmamaktadır.

Türkiye floral zenginliği ile bitkisel yağlar açısından dünyanın en büyük rezervlerindendir. Ülkemizde bitkisel yağlarla ilgili hemen hemen her alanda çalışma yapılmış, içerikleri saptanmış ve birçok farklı bakteri türü üzerinde etkinlikleri ispatlanmıştır (Bisset et al., 1977 ; Guinaudeau et al., 1984 ; Başer and Ertan, 1990 ; Aydın et al., 1994 ; Aydın et al., 1996 ; Rahman et al., 1998 ; Başer et al., 1999(a) ; Başer et al., 1999 (b) ; Demirci et al., 2000 ; Demirci et al., 2001 ; Demirci et al., 2002 ; Zeytinoğlu et al., 2003 ; Tunalier et al., 2004 ; Demirci et al., 2005 ; van Vuuren et al., 2006 ; Demirci et al., 2006 ; Tosun et al., 2006). Ancak, bakteriyel arı hastalıkları üzerindeki etkinlikleri konusunda yapılmış hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL-METOD

Çalışmamızda Türkiye'nin hemen her bölgesini temsil edecek ve arıcılıkla yoğun olarak uğraşılan istasyon iller ve bağlı ilçelerden çok sayıda petek örneği toplanmıştır. Arazi çalışmalarına 2002 Haziran ayı itibariyle başlanmış, Mayıs 2004 tarihinde tamamlanmıştır. Ön arazi çalışması hariç, diğer çalışmalar yavru çürüklüğü hastalıklarının en sık ve enfeksiyon düzeyi olarak en üst seviyede görüldüğü dönem olan ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde dönüşümlü olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, toplam 98 adet şüpheli yavrulu petek örneği laboratuvara getirilerek deneye alınmıştır.

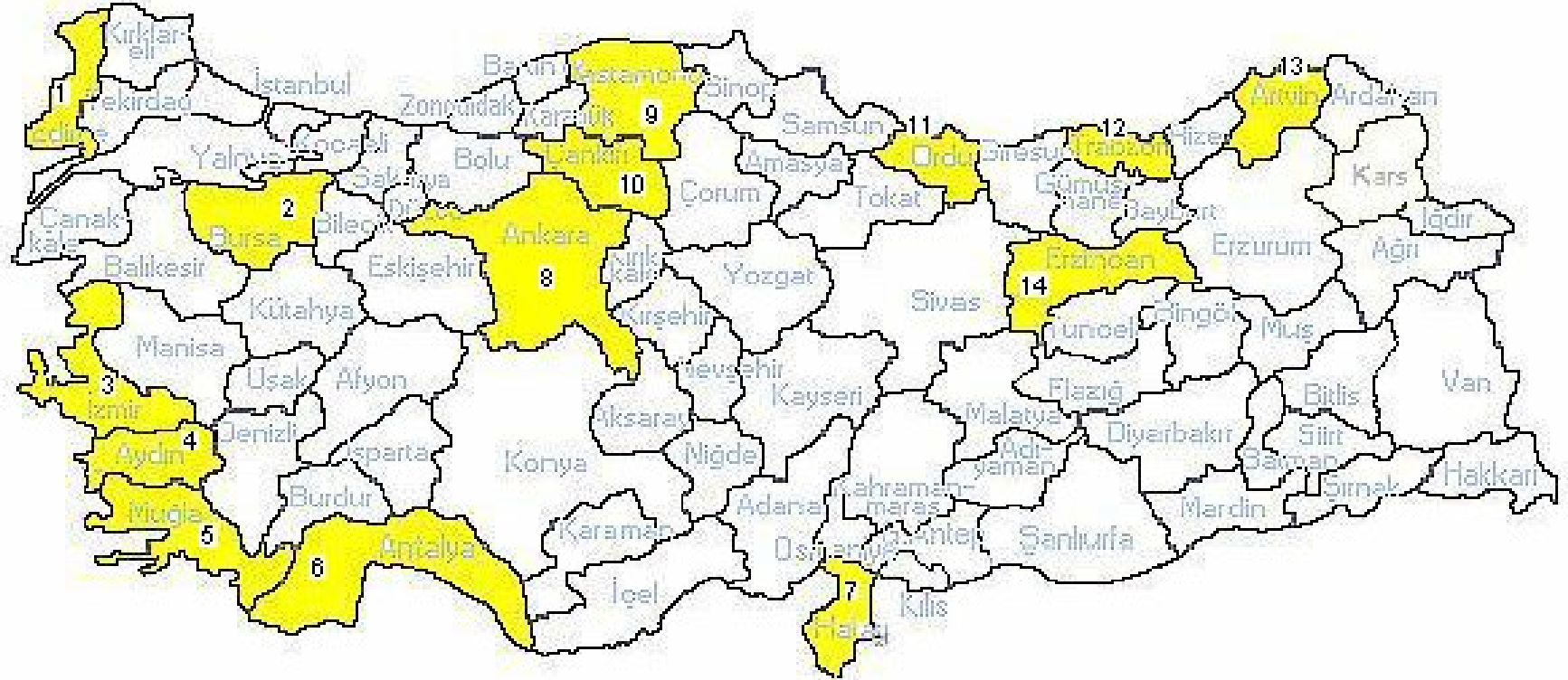
3.1. Örneklerin Toplanması

Ön çalışma olarak planlanan ilk arazi çalışması 10-14 Haziran 2002 tarihleri arasında Erzincan ili Kemaliye ilçesinde belirlenen aralıklara düzenlenmiştir. Aynı yöreye ikinci ve asıl enfeksiyon dönemi içinde yapılan arazi çalışması ise 10-13 Eylül 2002 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Bunu izleyen örnek toplama süreci 23 Nisan 2004 tarihi itibariyle Aydın, Bursa, Edirne, Çankırı, Ankara, Kastamonu, Muğla, İzmir, Antalya, Hatay, Ordu, Artvin ve Trabzon illerine düzenlenen arazi çalışmalarıyla devam etmiştir. İstasyon illerin belirlenmesinde Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği'nin yardımına başvurulmuş ve homojen bir çalışma sağlanmıştır (Şekil 3.1.). Toplanan yavrulu petek örnekleri laboratuvar ortamında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

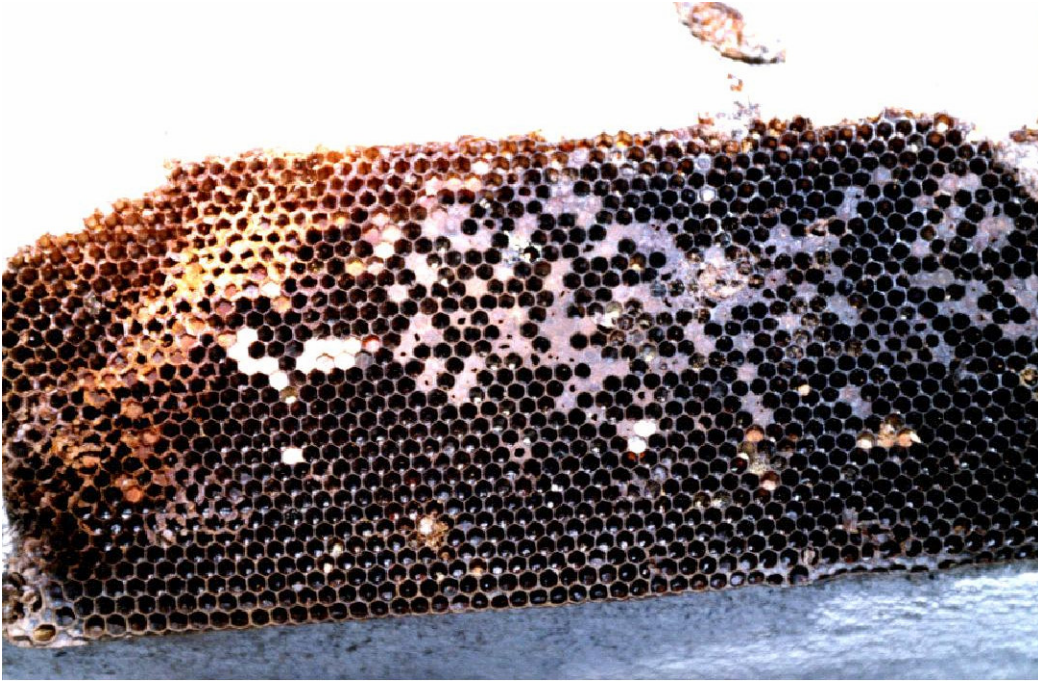
3. 2. Yavru Hastalıklarının Teşhisi

3. 2. 1. Yavrulu Petek Örneklerinin İncelenmesi

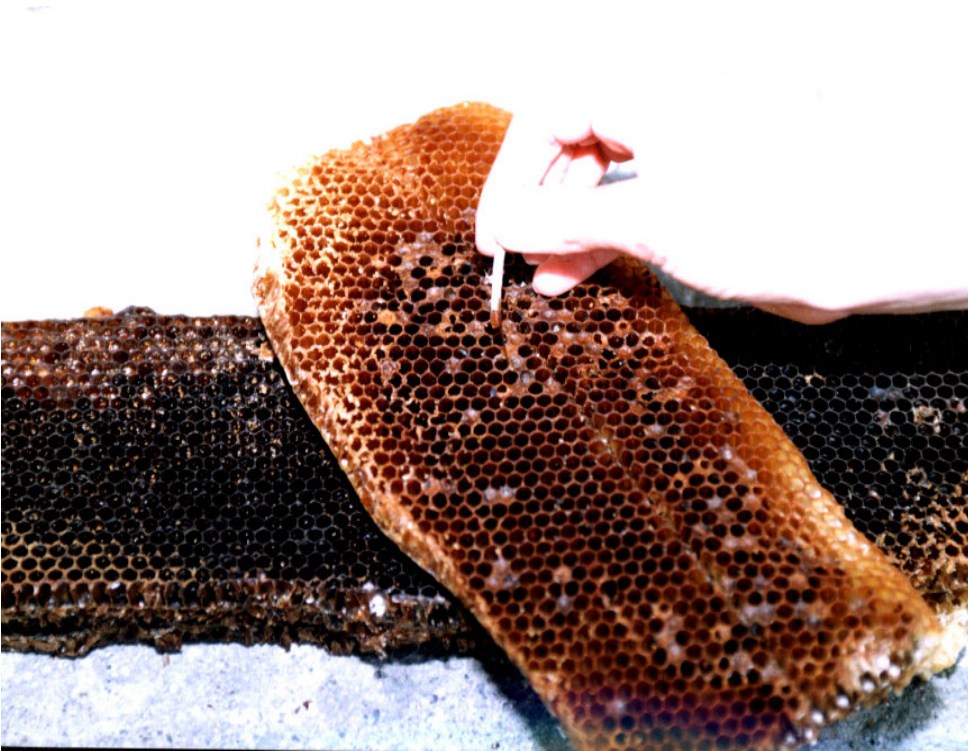
Laboratuvar çalışmalarının başlangıç aşamasında örnekler il trafik kodlarıyla numaralandırılarak laboratuvar kayıt defterine işlenmiş, il bazında gruplar oluşturularak deneyler başlatılmıştır. Şüpheli görünen delikli, içe çökük, pis kokulu yavrulu petek gözler incelenmiş, (Şekil 3.2.) ve "Kibrit Çöpü Deneyi" yapılmıştır. Bu deneyde petek göze bir kibrit çöpü batırılarak çürümüş larvanın dışı doğru uzayıp uzamadığı kontrol edilir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.1. Yavrulu petek örneği toplanan illerin Türkiye'deki dağılımı ve bulundukları bölgeler(1. Edirne, 2. Bursa, 3. İzmir, 4. Aydın, 5. Muğla, 6. Antalya, 7. Hatay, 8. Ankara, 9. Kastamonu, 10. Çankırı, 11. Ordu, 12. Trabzon, 13. Artvin, 14. Erzincan)



Şekil 3.2. Amerikan Yavru Çürüklüğü ile enfekte bir peteğin genel görünümü



Şekil 3.3. Amerikan Yavru Çürüklüğü teşhisinde kullanılan "Kibrit Çöpü Deneyi"

3. 2. 2. Kullanılan Besi Yerleri

Yavru hastalığı şüphesi gösteren 98 peteğe ait larva örneği incelemeye alınmıştır. İçeride çökük ve delikli görünümde olan petek gözden öze yardımıyla alınan yavru çürüklüğü örnekleri, öncelikle öze yardımıyla steril tüplere alınarak serum fizyolojik (%0.9 NaCl) eşliğinde homojenize edilmiş, ardından mikroorganizma yoğunluğunun artırılması ve daha hızlı üremelerinin sağlanması amacıyla genel üretim sıvı besiyeri olan Nutrient Broth'a (Merck) ekimleri yapılarak çalkalamalı etüvde 37°C'de 2 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda üreme görülen örneklerden sıvıdan katıya tek koloni ekim tekniği kullanılıp, seçici ve ayırtedici besiyerlerine ekim yapılarak farklı koloni tiplerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Tüm bu işlemler sırasında inkübasyon sıcaklığı 37°C ve inkübasyon süresi 2 gün tutulmuştur. Tanı koyma işlemi süresince kullanılan besiyerleri;

Nutrient Agar (Difco): Tüm bakterilerin üremesi için genel besiyeri ortamı olarak kullanılmıştır.

Endo Agar (Adsa Micro): Gram(-) bakterilerin üremesi için seçici besiyeri ortamı olarak kullanılmıştır.

Koyun Kanlı Agar: Streptococcus spp. üremesi ve hemoliz etkisinin incelenmesi için kullanılmıştır. Trypticase soy agar ile 40g/l olarak hazırlanan besiyeri yeri 120°C ve 1atm basınçta 15 dakika sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutulmuş ve % 5-10 oranında defibrine koyun kanı ilave edilmiştir (Benson, 1998).

Brain-Heart Infusion Agar (BHI) (Acumedia): Gram(+) Bacillus spp. üremesi için kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri ortamı (g/l); 8.0 Beyin-kalp infüzyonu(Sığır); 5.0 Hayvan dokularının peptik parçaları; 16.0 Kazeinin pankreatik parçaları; 5.0 Sodyum Klorid; 2.0 Dekstroz; 2.5 Disodyum fosfat; 13.5 Agar içermektedir (Hornitzky and Karlovskis, 1989).

Brain-Heart Infusion Agar'a 3µg/ml Nalidixic asit(Sigma; N-8878) ilave edilerek (BHI-N), *Paenibacillus larvae*'nin üremesi için besiyeri ortamı seçici hale getirilmiştir (Hornitzky and Wilson, 1989; Alippi, 1991).

Hazırlanan besiyeri ortamlarının tümü 120°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika steril edildikten sonra 10 cm çapındaki petri plaklarına dökülmüştür.

Besi yerlerinde üreyen mikroorganizmalar Gram boyama metodu kullanılarak incelenmiştir. Böylelikle hastalığa etken olan bakterinin ışık mikroskobu altında (x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak) morfolojik özellikleri, koloni oluşturma ve Gram boyanma özellikleri belirlenmiştir (Hornitzky and Wilson, 1989; Shimanuki and Knox, 1991).

3. 2. 3. Biyokimyasal Testler

Holst Süt Testi: Biyokimyasal test sistemleri kadar duyarlılığı olmamasına rağmen, Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığının etkeni olan *Paenibacillus larvae*'nin tanısında kullanılmıştır. Yağsız süt tozuyla %1'lik oranda hazırlanan 3-4 ml'lik çözelti içine, bakteri ekimi yapılmış, 37°C'de 15-20 dakika inkübe edilmiştir (Shimanuki and Knox, 1991; Tutkun ve İnci, 1992).

Katalaz Testi: 37°C'deki 48 saatlik kültürlerden alınan bakteri örnekleri, temiz bir lam üzerine konmuş bir damla % 25-30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) içinde süspansiyon edilmiştir. Gaz çıkışının gözlenmesi pozitif sonuç vermektedir (Shimanuki and Knox, 1991; Benson, 1998).

Voges-Proskauer Testi: 37°C'de 48 saatlik kültürden alınan bakteri örneği üzerine 0.6ml %5'lik α-naftol ve 0.2ml % 40'lık KOH damlatılıp tüp çalkalanarak oksijenle teması sağlanmış ve 10-15 dakika sonunda kırmızı rengin(+) oluşup oluşmadığı incelenmiştir (Benson, 1998).

Jelatin Testi: Tüpteki jelatin besi yerine (Merck) ekilen bakteri 37°C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından buzdolabına konmuş ve jelatinin tekrar katılaşma özelliğine bakılmıştır. "Jelatinaz" enziminin varlığı durumunda bakteri jelatini erittiğinden besi yeri katılaşmaz, sıvı olarak kalır (Benson, 1998).

Nişastanın Hidrolizi: Nişastalı besiyerinde 37°C'de 2 günlük inkübasyon sonucu nişasta hidrolizinin oluşumu besiyeri üzerine iyodür damlatılarak anlaşılmaktadır. Nişastanın amilaz enzimine sahip bakterilerce parçalanması sonucu iyodür besi yerinde mavi renk oluşturmamaktadır (Shimanuki and Knox, 1991; Benson, 1998).

Sitrat Testi: Simmons Sitrat Besi yerine(Adsa Micro) ekilen bakteri, 37°C'de 2-3 gün inkübe edilmiştir. Bakteri sitratı kullanırsa indikatör mavi renk almaktadır (Benson, 1998).

Tüm biyokimyasal testlerde 37°C'de 48 saatlik kültürler kullanılmıştır. Biyokimyasal testler patojen etkili *P. larvae* ile saprofitik bir bakteri olan *B. alvei*'nin ayırımında kullanılmıştır (Alippi, 1991; Shimanuki and Knox, 1991; Alippi, 1997;

Benson, 1998). Bu ayrımın yapılmasında rehberlik eden, etken bakterilere ait biyokimyasal test sonuçları (Alippi, 1991) Çizelge 3. 1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. 1. AFB etkeni *P. larvae* ve non-patojen *B. alvei*'nin ayrımı amacıyla kullanılan biyokimyasal tesler ve sonuçları (Alippi, 1991)

	Katalaz	Vog-Pros.	Jelatin	Nişasta Hidrolizi	Sitrat	Gram Özelliği
<i>Paenibacillus larvae</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Bacillus alvei</i>	+	+	+	+	-	+

3. 3. Antibiyotik Disklerinin Hazırlanması

İzole edilerek saf kültür haline getirilen ve identifikasyonu yapılan bakteri kültürlerinin belirli periyodlarla pasajları yapılmış, taze besi yerilerine alınan izolatlara çeşitli antibiyotik diskleri kullanılarak antibiyogram uygulanmıştır. Deneylerde kullanılan sentetik antibiyotikler, hazır disk kullanılarak, bitkisel yağlar ise belli miktardaki yağın steril diske emdirilmesiyle elde edilmiştir (Doughty et al., 2004).

3. 3. 1. Kullanılan Sentetik Antibiyotikler ve Özellikleri

Amoxycillin-clavulanic acid (AMC): Penisilin grubunda yer alır. Antibakteriyel etkisi Gram (+,-) bakterilerde β -laktamaz aktivitesini inhibe edip, hücre duvarı sentezini engelleyerek ortaya çıkmaktadır. Bakterisid etkisi hızlı ve etkilidir (NCCLS, 1997).

Sulbactam-ampicillin (SAM): Penisilin grubundadır. Hücre duvarı sentezini β -laktamaz aktivitesini inhibe ederek engeller. Ancak, Sulbactam aynı

zamanda bazı penisilin bağlayıcı proteinlere de bağlandığından, tek başına beta-laktam bir antibiyotiğe göre daha geniş etki alanına sahiptir (NCCLS, 1997).

Tobramycin (TOB): Aminoglikozidler grubundadır. Etkisini protein sentezini inhibe etmek suretiyle gösterir. Üç aşamada da etkisini gösterebilir: Protein sentezinin başlangıç aşamasında, translasyonu bloke ederek prematür proteinin sonlanmasıyla, uygun olmayan aminoasidin inkorporasyonu ile inhibisyon gerçekleşir. Gram (-) bakteriler üzerinde etkili olmasına rağmen nadir de olsa Gram(+) bakteriler de duyarlılık gösterebilir. Hücre membranından aktif transport ile taşınır (NCCLS, 1997).

Erythromycin (ER): Macrolidler arasında yer alır. Antibakteriyel etkisi Gram (+) kok ve basillerde 50 S'lik ribozomal alt birimlere bağlanarak, büyüyen peptid zincirinin sonunda peptid bağının şekillenmesini bloke etmek ve dolayısıyla protein sentezini önlemek sureti ile gerçekleşir. Düşük yoğunlukta bakteristatik, yüksek yoğunluklarda bakterisid etkilidir. Zayıf toksisiteli bir antibiyotiktir (NCCLS, 1997).

Azitromycin (AZM): Kimyasal olarak azalidler olarak adlandırılan bir antibiyotik sınıfında yer almaktadır. Azitromycinin etki mekanizması 50 S ribozomal alt birimlere bağlanarak ve peptidlerin translokasyonunu önleyerek bakterilerdeki protein sentezinin inhibisyonudur. Gram (+) aerob bakteriler, hemolitik streptokoklar ve diğer streptokoklar, enterokoklar ve eritromisine dirençli Gram (+) suşlar ile çapraz direnç gösterir (NCCLS, 1997).

Rifampin (RA): Duyarlı hücrelerdeki DNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesini engeller. Özellikle de bakteriyel RNA polimeraza etki eder. Ancak memelilerdeki enzimleri etkilemez. Gram (+) birçok bakteri üzerinde etkilidir. Penisilin grubu antibiyotiklere direnç gösteren bakteriler Rifampine duyarlıdır. Ancak insanlardaki tüberküloz tedavisi hariç, tüm tarımsal üretim alanlarında kullanımı yasaktır (NCCLS, 1997; Kochansky et al., 2001; OIE, 2004).

3. 3. 2. Sentetik Antibiyotiklerle Antibiyogram Yöntemi

Antibiyotikler ve etki mekanizmalarına ait bilgiler ışığında, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen izolatlar öncelikle sıvı besiyeri olan nutrient broth'a

ekilmiş ve 37⁰C'de 2 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Ardından dilüsyon yöntemi kullanılarak her bir izolat kültürdeki bakteri sayısı 2×10^7 bakteri/ml olacak şekilde eşitlenmiştir. Eşitleme işleminde canlı sayım tekniği kullanılarak hemositometre ile bakteri sayımları yapılmıştır. Buna göre;

1ml'deki bakteri sayısı= $A/4 \times [(1 \times 1 \times 1/10) \times \text{sulandırma faktörü } (200) \times 10^3]$ olarak hesaplanmıştır.

1 ml'sinde eşit sayıda bakteri içeren kültürlerden 0.1'er ml sıvıdan katıya yayma ekim tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır. Katı besiyeri olarak Amerikan Yavru Çürüklüğü izolatları için Brain-Heart Infusion Agar; Avrupa Yavru Çürüklüğü izolatları için Nutrient Agar kullanılmıştır. Besiyeri içeren her petri 3 eşit bölüme ayrılarak, her bölüme bir antibiyotik diski yerleştirilmiştir. Antibiyotik diski yerleştirilen petrilere 37⁰C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3. 3. 3. Kullanılan Bitkisel Yağlar ve Özellikleri

Çalışmada Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D'dan sağlanan, saf olarak elde edilmiş ve saflığı GC-MS yoluyla test edilmiş olan 11 adet yağ örneği kullanılmıştır (Çizelge 3.2.). Deneylerde kullanılan bitkisel yağların GC/MS analizleri Agilent GC-MS sisteminde, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D'da Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer ve ekibi tarafından yapılmıştır.

Çizelge 3. 2. Deneylerde kullanılan bitkisel yağların bitki ismi ve laboratuvar kod numaraları

Kod Numarası	Bitki Adı
H925C	<i>Seseli petraeum</i> Bieb.
H925D	<i>Seseli resinosum</i> Freyn&Sint.
H925E	<i>Seseli andronakii</i> Woron.
H926A	<i>Seseli tortuosum</i> L.
H610B	<i>Bifora radians</i> Bieb.- <i>Kışniş otu</i>
H442B	<i>Anethum graveolens</i> L.- <i>Dereotu</i>
H354B	<i>Heracleum platytaenium</i> Boiss.- <i>Tavşancıl otu</i>
H582A	<i>Pimpinella anisum</i> L.- <i>Anason</i>
E772F	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.- <i>Biberiye</i>
Kekik Yağı	<i>Origanum onites</i> L.- <i>Ticari kekik</i>
*Karvakrol (Sigma)	<i>Karvakrol (saf halde)</i>

*Karvakrol, kekik yağının en büyük bileşenidir, kimyasal olarak formüle edilmiş şekli kullanılmıştır.

Bitkisel yağların saflığının ve içeriklerinin tayini amacıyla yapılan GC-MS analizlerinde, Agilent 5975 GC-MS sistemi kullanılmıştır. Sistem içinde yer alan kolon tipi HP-Innowax Silika kapiler (60 mx0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)'dir. Sıcaklık programı 60 °C'de 10 dak // 4 °C/ dak artışla 220 °C'ye // 220 °C'de 10 dak. // 1°C/ dak artışla 240 °C'ye olacak şekilde ayarlanmıştır. Enjektör 250 °C, taşıyıcı gaz helyum (0.8 ml/dak), split oranı 40:1, ekeltron enerjisi 70 eV, kütle aralığı m/z 35-450 olarak çalışılmıştır. GC analiz koşulları; eş zamanlı olarak GC-MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekildedir (FID 300 °C) (Başer , 1999).

Yukarıda açıklanan yöntemle saflaştırılarak içerikleri ve yağdaki oranları saptanan bitkisel yağlar;

***Seseli petraeum* M. Bieb. (H925 C)**

Familiya: Apiaceaea (Umbelliferae) Maydonozgiller

Çok yıllık, yoğun tüylü, 30 cm'ye kadar yükselebilen gövdeli bir bitkidir (Şekil 3. 4.). Gövdenin taban kısmı odunsudur. Çiçekleri beyaz renkli ve yaklaşık 20 adettir. Türkiye'de Trabzon ve Gümüşhane çevresinde yetişmektedir. Çiçeklenme dönemi 7-8. aylardır (Tosun et al., 2006).



(A)



(B)

Şekil 3. 4. *Seseli petraeum* (A) ve *Seseli tortuosum* (B) türlerinin genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

***Seseli resinosum* Freyn & Sint. (H925 D)**

Çok yıllık, yuvarlak kesitli gövdeli, 30-60 cm boyundadır. Çiçekleri beyaz ve 60-80 adettir. Çiçeklenme dönemi 7-8 aylardır. Endemik bir türdür. Türkiye'de Kastamonu, Zonguldak ve Bartın'da yetişir (Tosun et al., 2006).

***Seseli andronakii* Woron. (H925 E)**

Tüysüz gövdeli, 40-140 cm boyundadır. Çiçekleri beyaz renkli ve 10-20 adettir. Artvin- Çoruh bölgesinde endemiktir (Tosun et al., 2006).

***Seseli tortuosum* L. (H926 A)**

Çok yıllık, yuvarlak gövdeli, 30-100 cm boyundadır (Şekil 3. 4.). Çiçek durumu çok dallıdır. Beyaz renkli çiçekleri 14-20 adettir. Türkiye’de Kuzey ve Güney Anadolu’da yayılmıştır. İstanbul, Kastamonu, Amasya, Gümüşhane, Ankara, Sivas, Antalya ve Konya illerinde yayılış gösterir (Tosun et al., 2006).

***Bifora radians* Bieb. (H610 B)**

Kışniş otu

Familya: Apiaceae (Umbelliferae) Maydonozgiller

10-80 cm boyunda, içi boş yuvarlak gövdelidir (Şekil 3. 5.). Çiçeklenme dönemi 4-8. aylardır. Kuzey Batı Anadolu ve Kuzey Doğu Anadolu’da yaygın olarak yetişmektedir (Başer et al., 1998; Baytop, 1997).



Şekil 3. 5. *Bifora radians* türünün genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

***Anethum graveolens* L. (H442 B)**

Dere otu

Familiya: Apiaceae (Umbelliferae) Maydonozgiller

Tek yıllık, doğu kökenli (İran- Hindistan) kültür bitkisi (Şekil 3. 6.). Ülkemizde de yetiştirilir (Baytop, 1997). Uçucu yağ oranı çiçeğin tomurcuk döneminde en yüksektir. Çiçeklerin solma döneminde de miktarı artmaktadır. Bitkinin otsu ve meyve kısımları kullanılmaktadır. Dereotu meyvesi % 2.5-4 oranında uçucu yağ içerir. Esas uçucu yağ maddesi carvon'dur (%40-55). Ayrıca meyve % 15 yağ ve % 20 oranında protein içerir. Droglarında uçucu yağ oranı düşüktür. Ticari numune olarak dövülmüş tohum kullanılmıştır. Verim: %3.6 (Kürkçüoğlu et al., 2003)



Şekil 3. 6. *Anethum graveolens* türünün genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

***Heracleum platytaenium* Boiss. (H354 B)**

Tavşancıl otu, Çağan, Öğrek otu

Familiya: Apiaceae (Umabelliferae) Maydonozgiller

Endemiktir. İç Anadolu, Ege ve Karadeniz bölgelerinde yayılış gösterir (Baytop, 1997). 1-2 m yükseklikte, çok yıllık otsu, beyaz çiçekli ve kuvvetli kokulu bir bitkidir (Şekil 3. 7.). Yaprak sapları ve gövdesi kullanılır. Manisa, Spil Dağı, Atalanı Yaylası'ndan toplanmıştır. Dövülmüş tohum örnekleri kullanılmıştır. Verim: %6.5 (Kürkçüoğlu et al., 1995).



(A)



(B)

Şekil 3. 7. *Heracleum platytaenium* türünün genel görünümü (A: Doğadaki formu, B: Herbaryum örneği)
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

***Pimpinella anisum* L. (H582 A)- Anason**

Familiya: Apiaceaea (Umbelliferae) Maydonozgiller

Çok eski bir kültür bitkisidir (Şekil 3. 8.). Dünyanın farklı iklim bölgelerinde yaygın olmakla birlikte sıcak bölgelerde fazladır. Türkiye de en çok anason üreten ülkeler arasındadır. Ülkemizde Ege, marmara ve Güney Anadolu bölgelerinin iklimi yetişmesine uygundur. Meyveleri kullanılmaktadır. Meyvede uçucu yağ oranı % 1.5-3 arasındadır. Anason mideyi, karminatif, iştah açıcı ve koku verici etkilere sahiptir. Ticari numune olarak meyveleri kullanılmıştır. Verim: % 2.6 (Başer et al., 1999 (b); Kürkçüoğlu et al., 2003).



Şekil 3. 8. *Pimpinella anisum* türünün genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

***Rosmarinus officinalis* L. (E772 F)**

Rosmarin, Kuşdili, Biberiye

Familiya: Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller

Akdeniz kökenli ve çok eski bir kültür bitkisidir (Şekil 3. 9.). Daima yeşil kalan çalimsı çok yıllık bir bitkidir. Yaprak ve çiçekleri kullanılmaktadır. Etken maddesi uçucu yağlardır. Sindirim sistemini uyarıcı ve safra artırıcı olarak kullanılır. Ayrıca romatizma preparatlarında da kullanılmaktadır (Zeytinoğlu et al., 2003). Tarsus, Aladağ yöresinden toplanan örnekler çalışılmıştır. Verim: % 1.9.



Şekil 3. 9. *Rosmarinus officinalis* türünün genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

Karvakrol (Sigma)

Kekik yağının (*Origanum onites*) içeriğinde $\approx$ % 70 oranında bulunan (Zeytinoğlu et al., 2003) ve ana bileşen olarak kabul edilen karvakrolün kimyasal olarak formüle edilmiş halidir.

***Origanum onites* L.**

Ticari Kekik, Taş Kekiği

Familiya: Lamiaceaea (Labiatae)

Orta Akdeniz gen merkezli bir bitkidir. Daima yeşil kalan , yarıçalımsı, odunumsu, çok dallanan ve dalları yukarı kalkık bir bitkidir (Şekil 3. 10.). Çok fazla genusu ve çeşidi bulunmaktadır. Otsu kısımları kullanılır. İçerdiği uçucu yağ oranı; cinsine, kökenine, iklim koşullarına, hasat zamanına, kurutmaya ve depolamaya göre çok varyasyon gösterir (%0.75-6.3). Kekik; baharat, antiseptik, öksürük şuruplarında, bronşit ve boğmaca da kullanılmaktadır (Kokkini, 1996; Duman, 2000; Goleniowski et al., 2003). Mide, karın ve baş ağrılarında da kullanılır ve antiparaziter etkisi vardır. Pilot tesislerden toplanan kekikte buhar distilasyonu kullanılmıştır. Verim: % 2.0.



Şekil 3. 10. *Origanum onites* türünün genel görünümü
(www.botit.botany.wisc.edu/images)

3. 3. 4. Bitkisel Yağlarla Antibiyogram Yöntemi

Yapılan ön denemelerde, hazır antibiyotik diskleriyle aynı özellikte, %100 selülozdan oluşan özel resim kağıdı temin edilmiş, ardından disk haline getirilen kağıtların maksimum emebildikleri (doymuş haldeki) sıvı miktarı tespit edilmiştir. 10 µl olarak saptanan bu miktar sonraki deneylerde diske emdirilen yağ miktarı olarak standartize edilmiştir. Hazırlanan disklerle saf olarak emdirilen yağlar için farklı konsantrasyonlar kullanılmamıştır; çünkü öncelikle saf olarak maksimum etki performanslarının saptanması, ardından etki göstermiş olan yağların seçilmesiyle, farklı konsantrasyonlarındaki etkileri değerlendirilerek minimum inhibisyon konsantrasyonu oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. 4. Kùltürlerin İnkübasyonu ve Zon Çaplarının Ölçümü

Antibiyograma tabi tutulan kùltürler, 37⁰C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zonların çapı ölçülerek değeriendirilmiştir (NCCLS, 1997). Deneyler 3 tekrarlı olmak üzere her sentetik antibiyotik ve bitkisel yağ için 3 petri kabı kullanılarak kurulmuştur. Buna göre, her antibiyogram sonucuna dair 3 ayrı bulgu elde edilmiştir. Zon çaplarının ölçümünde milimetrik cetvel kullanılmış, antibiyotik diskin çapı da zona dahil edilmiştir. Ancak, hiç zon oluşmamış örneklerde, istatistiksel hesaplamaları yanlış yönlendirmemesi açısından bulgular "0" (sıfır) olarak alınmış, diskin çapı gözardı edilmiştir (Kochansky et al., 2001). Her antibiyotik ve bitkisel yağ için ölçülen zon çapları, antibiyotiğin etkisiyle doğru orantılı olarak etkili, yarı etkili ya da etkisiz yüzdeleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Sokal and Rholf, 1995).

3. 5. Mikrodilüsyon Yöntemi ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Saptanması (MIC Testleri)

Deneylerde kullanılan sentetik antibiyotiklerin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIC) daha önceki çalışmalarla saptanması, hatta standart hale getirilmesi nedeniyle MIC değeri, bitkisel yağların mikrodilüsyonlarının yapılması ve inhibisyon konsantrasyonlarının saptanmasında negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Özellikle uygulamada da kullanılan Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığına karşı oxytetracycline (terramycin), Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığına karşı erythromycin negatif kontrol olarak tercih edilmiştir.

Antibiyogram testine tabi tutulan ve etkili-yarı etkili bulunan bitkisel yağların MIC değeri,lerinin tespit edilmesinde ise mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla

etkili-yarı etkili her bir bitkisel yağ çeşidinin 5 mg mL⁻¹ stok solüsyonları %25'lik dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülerek hazırlanmıştır. Stok solüsyondan hazırlanacak olan mikrodilüsyon setinde 1 ml'lik eppendorf tüpleri kullanılmış ve sulandırma her tüpte %50 oranında yapılmıştır. Buna göre her yağ çeşidi için 5-7 farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Konsantrasyonlar sırasıyla, 5, 2.5, 1.250, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 mg mL⁻¹ olarak hazırlanmıştır. Deney setine, 1 tüp DMSO ve ilgili sentetik antibiyotiği içeren negatif kontrol; 1 tüp ise yalnızca DMSO ve steril sıvı besi yeri içeren pozitif kontrol olarak ilave edilmiştir. Diğer yandan Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen izolatların ayrı ayrı sıvı besiyerlerine (nutrient broth) ekimleri yapılmış ve deney öncesi 37 °C'de 48 saatlik inkübasyona alınmışlardır. Inkübasyon sonrası canlı sayım tekniği ile Neubauer lamında sayımları yapılarak kültürlerdeki bakteri sayısı hem Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı, hem de Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığı etkenleri için yaklaşık 2x10⁷ ye eşitlenmiştir.

AFB ve EFB hastalık etkenlerinin ayrı ortamlarda ve farklı zamanlarda çalışılmasına kontaminasyonun engellenmesi amacıyla özellikle dikkat edilmiştir. Her iki hastalık etkeni için de kurulan deney setinde, izolatlar üzerinde tüm konsantrasyonlar tek tek denenmiştir. Buna göre, her bir izolat için eppendorf tüpünde etiketleme yapılmış ve tüpe sayısı 2x10⁷ bakteri/ml olan kültürden 100 µl etken bakteri (AFB ya da EFB etkeni), 100 µl ilgili konsantrasyondaki bitkisel yağ solüsyonu ve 100µl steril sıvı besiyeri konulmuştur. Sonuçta eppendorf tüpünde 300 µl'lik toplam hacme ulaşılmıştır. Tüpler çalkalamalı etüvde 37°C'de 48 saatlik inkübasyona alınmıştır. Bulanıklık derecesine göre üremenin gerçekleştiği ilk konsantrasyon, etkili-yarı etkili olan her yağ çeşidi için MIC değeri olarak saptanmıştır (NCCLS 1997; Kochansky et al., 2001; Işcan et al., 2002; Kochansky and Pettis, 2005).

4. BULGULAR

Yapılan arazi çalışmaları sonunda toplanan 98 adet şüpheli yavrulu petek örneği üzerinde çalışılmış, identifikasyon ve izolasyon çalışmalarıyla birlikte 14 adet AFB etkeni, 17 adet EFB etkeni saf kültür halinde izolat olarak tanımlanmıştır. Teşhisi konulan hastalıkların illere göre dağılımı çizelge halinde sunulmuştur (Çizelge 4. 1.).

4.1. Sentetik Antibiyotiklerin Antibiyogram Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Çalışmada Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı etkeni *Paenibacillus larvae* ve Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığı etkeni *Melissococcus pluton* gibi Gram (+) kok ve basiller üzerinde etkili ve etki mekanizmaları farklı 6 sentetik antibiyotik, antibakteriyel etki performansları açısından incelenmiş ve katı besiyerlerinde hazır antibiyotik disk yöntemiyle uygulanan antibiyogram testlerinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Antibiyotik diskinin etrafında oluşan zon çaplarının ölçülmesiyle ulaşılan bulgular, her antibiyotik için ayrı ayrı olmak üzere çizelge haline getirilerek özetlenmiştir.

Deneye alınan amoxycillin-clavulanic asit (Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.), sulbactam-ampicillin (Çizelge 4. 4., Çizelge 4. 5.), tobramycin (Çizelge 4. 6., Çizelge 4. 7.), erythromycin fosfat (Çizelge 4. 8., Çizelge 4. 9.), azitromycin (Çizelge 4. 10., Çizelge 4. 11) ve rifampin'e (Çizelge 4. 12., Çizelge 4. 13.) ait inhibisyon zon çapları, AFB ve EFB üzerindeki etki performanslarına göre ayrı olarak yorumlanmıştır. Çizelgelerde sonuçların daha sağlıklı karşılaştırılması açısından

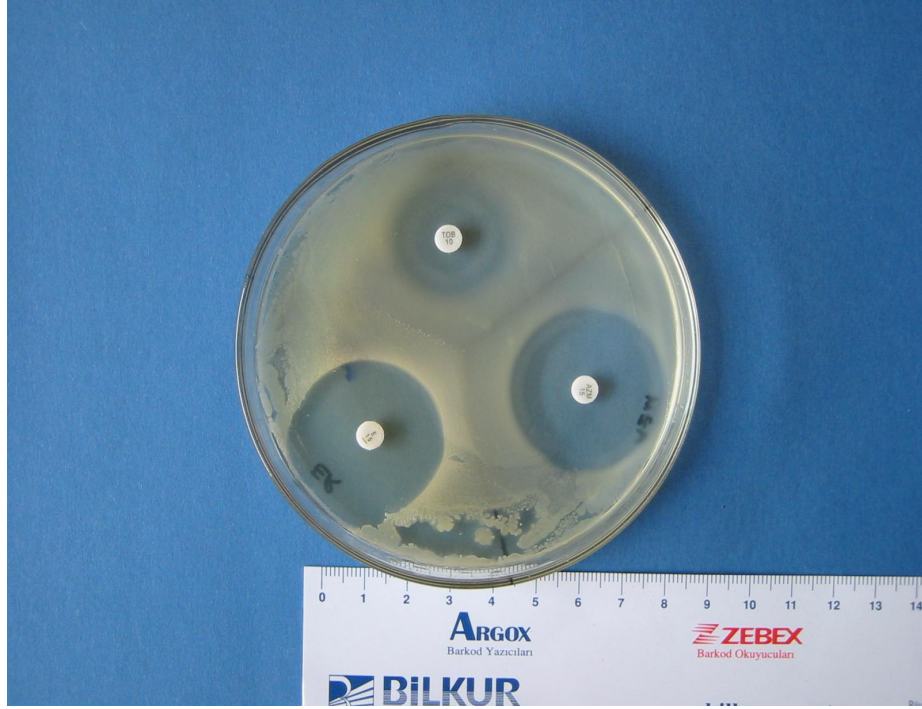
antibiyotiklere ait standart MIC değ erleri ile R (Resistant-Dirençli), I (Intermediate-Orta Duyarlı), S (Susceptible-Duyarlı) inhibisyon zon aralıkları da birlikte verilmiştir (NCCLS, 1997).

Her sentetik antibiyotiğe ait antibiyogram testi deneyi 3 tekrarlı olarak planlandığından (şekil 4. 1., şekil 4. 2.), antibiyotiğin oluşturduğu zon çapına göre R, I ya da S olarak tanımlanabilmesi için 3 deneye ait inhibisyon zon çaplarının ortalaması alınarak, değer aralıklarına uygunluğu araştırılmıştır.

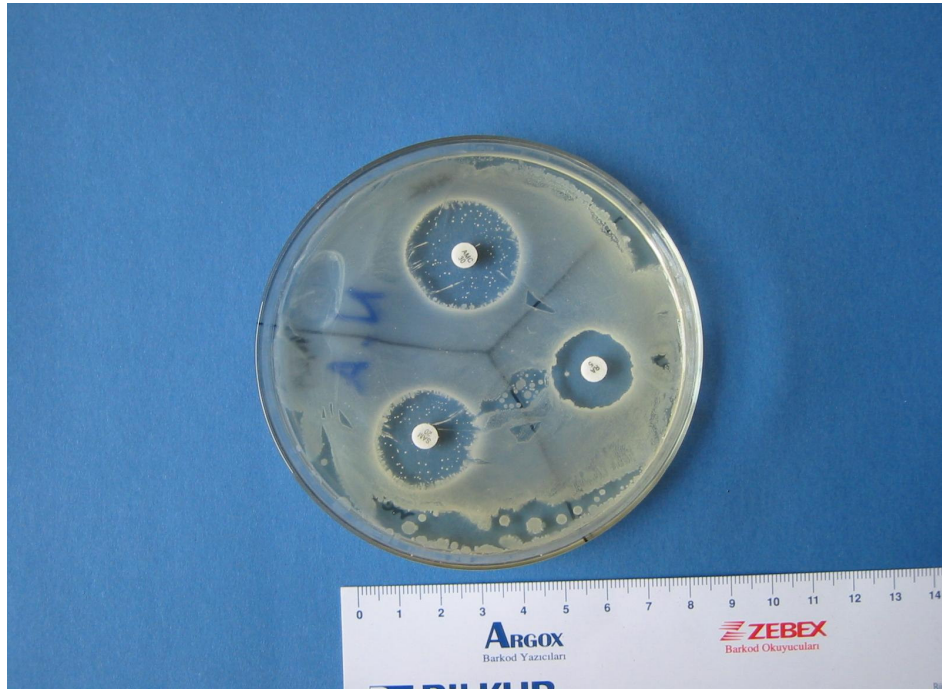
Çizelge 4. 1. Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB- EFB izolatları ve biyokimyasal  zellikleri

48/62 İzolat No*	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
Hastalık	AFB	Gram	Katalaz	Nişasta	Mannitol	Vog-	T�r Adı
		�zelliği	-	Hidrolizi	+	Pros	<i>P. larvae</i>
48/64	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
06/01	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
48/65	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
07/03	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
52/01	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
07/09	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
52/04	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
07/10	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
61/01	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
07/15	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
24/01	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
07/18	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
24/02	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
07/19	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
24/03	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
07/20	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
22/11	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
37/01	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/08	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/19	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
48/20	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/28	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/42	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/44	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/48	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/49	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/52	AFB	+	-	-	+	-	<i>P. larvae</i>
48/55	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>
48/56	EFB	+	+	+	-	+	<i>M.pluton, B. alvei</i>

*: İzolat no'ları illerin trafik kodlarına göre verilmiştir.



Şekil 4.1. AMC, RA ve SAM antibiyotik disklerinin AFB'de oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil 4. 2. AZM, TOB ve ER antibiyotik disklerinin EFB'de oluşturduğu inhibisyon zonları

Çizelge 4. 2. Amoxycillin- clavulanic asid'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	12ø	13ø	12ø	<16	<14	15-16	>17	R
07/09	AFB	0	0	0	<16	<14	15-16	>17	R
07/19	AFB	18	17	18	<16	<14	15-16	>17	S
07/20	AFB	60	55	62	<16	<14	15-16	>17	S
48/19	AFB	22ø	21ø	24ø	<16	<14	15-16	>17	S
48/52	AFB	18	18	16	<16	<14	15-16	>17	S
48/62	AFB	24	22	26	<16	<14	15-16	>17	S
48/63	AFB	0	0	0	<16	<14	15-16	>17	R
48/64	AFB	20	21	22	<16	<14	15-16	>17	S
52/01	AFB	50	48	53	<16	<14	15-16	>17	S
52/04	AFB	56	55	53	<16	<14	15-16	>17	S
61/01	AFB	18	22	19	<16	<14	15-16	>17	S
24/02	AFB	22	18	22	<16	<14	15-16	>17	S
24/03	AFB	16	18	18	<16	<14	15-16	>17	I-S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♣ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Elde edilen bulgular, amoxycillin clavulanic asitin, aynı ile ait herhangi bir izolat üzerinde her üç deneyde de yaklaşık sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ancak iller bazında bazı farklılıklar söz konusudur. AFB'nin 06/01 no'lu izolatının AMC'ye karşı direnç gösterdiği görülürken, Antalya iline ait 07/09 ve 07/19, 07/20 no'lu örnekler arasında dirençlilik ve duyarlılık yönünden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Muğla ilinden izole edilen AFB örneklerinden 48/63 no'lu izolat hariç, tamamının AMC antibiyotiğine karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. Trabzon ve Erzincan izolatları ise AMC'ye tam duyarlılık göstermişlerdir (Çizelge 4. 2.).

Çizelge 4. 3. Amoxycillin-clavulanic asid'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	26ø	24ø	23ø	<16	<14	15-16	>17	S
07/10	EFB	17ø	17ø	18ø	<16	<14	15-16	>17	S
07/15	EFB	26	25	25	<16	<14	15-16	>17	S
07/18	EFB	23ø	22ø	23ø	<16	<14	15-16	>17	S
22/11	EFB	27	27	26	<16	<14	15-16	>17	S
37/01	EFB	0	0	0	<16	<14	15-16	>17	R
48/08	EFB	18ø	17ø	15ø	<16	<14	15-16	>17	S
48/20	EFB	19	18	17	<16	<14	15-16	>17	S
48/28	EFB	24ø	25ø	22ø	<16	<14	15-16	>17	S
48/42	EFB	24ø	22ø	27ø	<16	<14	15-16	>17	S
48/44	EFB	13	12	12	<16	<14	15-16	>17	R
48/48	EFB	14	13	15	<16	<14	15-16	>17	R
48/49	EFB	25ø	26ø	28ø	<16	<14	15-16	>17	S
48/55	EFB	21	22	21	<16	<14	15-16	>17	S
48/56	EFB	33	34	36	<16	<14	15-16	>17	S
48/65	EFB	13ø	13ø	15ø	<16	<14	15-16	>17	R
24/01	EFB	18	12	24	<16	<14	15-16	>17	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
 ♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Sonuçlar doğrultusunda Antalya ve Edirne iline ait EFB izolatlarında AMC'ye karşı duyarlılık saptanırken, tek izolata sahip 37/01 no'lu Kastamonu örneğinde yüksek dirençlilik göze çarpmaktadır. Muğla ili izolatlarında ise dirençlilik oranı 3:11'dir. 48/44, 48/48 ve 48/65 no'lu örneklerde bu sonuçla karşılaşmıştır.

Deney bulgularına göre EFB örneklerinde, AFB'ye oranla daha fazla sekonder üremenin saptandığı da gözlemlenmektedir (Çizelge 4. 3.).

Çizelge 4. 4. Sulbactam-ampicillin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	13ø	15ø	11ø	<8	<11	12-13	>14	I
07/09	AFB	9	8	9	<8	<11	12-13	>14	R
07/19	AFB	16	15	18	<8	<11	12-13	>14	S
07/20	AFB	47	44	43	<8	<11	12-13	>14	S
48/19	AFB	18ø	16ø	19ø	<8	<11	12-13	>14	S
48/52	AFB	19	18	18	<8	<11	12-13	>14	S
48/62	AFB	25	24	22	<8	<11	12-13	>14	S
48/63	AFB	13	12	12	<8	<11	12-13	>14	I
48/64	AFB	22	25	22	<8	<11	12-13	>14	S
52/01	AFB	46	40	48	<8	<11	12-13	>14	S
52/04	AFB	50	47	52	<8	<11	12-13	>14	S
61/01	AFB	17	17	16	<8	<11	12-13	>14	S
24/02	AFB	6	9	10	<8	<11	12-13	>14	R-I
24/03	AFB	14	10	12	<8	<11	12-13	>14	I

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Sulbactam-ampicillin genel anlamda farklı illere ait hemen hemen tüm AFB izolatları üzerinde etkili sonuçlar verse de 07/09 no'lu Antalya örneği, aynı ile ait diğer örneklerin aksine dirençlilik göstermiştir. Benzer durum Erzincan'ın 24/02 no'lu örneğinde de gözlemlenmiştir. Ancak buradaki dirençlilik orta hale daha yakın durumdadır. Orta duyarlılık/ direnç üç farklı izolatta daha gözlemlenmiştir. Bunlar Ankara (06/01), Muğla (48/63) ve Erzincan (24/03) illerine ait izolatlardır (Çizelge 4. 4.).

Çizelge 4. 5. Sulbactam-ampicillin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	20ø	22ø	20ø	<8	<11	12-13	>14	S
07/10	EFB	16ø	16ø	14ø	<8	<11	12-13	>14	S
07/15	EFB	21	20	22	<8	<11	12-13	>14	S
07/18	EFB	20ø	22ø	22ø	<8	<11	12-13	>14	S
22/11	EFB	25	20	18	<8	<11	12-13	>14	S
37/01	EFB	0	0	0	<8	<11	12-13	>14	R
48/08	EFB	20ø	17ø	19ø	<8	<11	12-13	>14	S
48/20	EFB	17	14	16	<8	<11	12-13	>14	S
48/28	EFB	22ø	24ø	25ø	<8	<11	12-13	>14	S
48/42	EFB	25ø	23ø	20ø	<8	<11	12-13	>14	S
48/44	EFB	17	18	16	<8	<11	12-13	>14	S
48/48	EFB	21	20	24	<8	<11	12-13	>14	S
48/49	EFB	21ø	22ø	21ø	<8	<11	12-13	>14	S
48/55	EFB	21	23	20	<8	<11	12-13	>14	S
48/56	EFB	31	30	30	<8	<11	12-13	>14	S
48/65	EFB	20ø	20ø	18ø	<8	<11	12-13	>14	S
24/01	EFB	6	8	4	<8	<11	12-13	>14	R

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
 ♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Sulbactam-ampicillin'in EFB üzerindeki antibakteriyel etki performansı sonuçları, iller arasında büyük bir paralellik göstermiştir. Antibiyotiğe direnç gösteren sadece iki izolat bulunmaktadır. 37/01 ve 24/01 no'lu bu örneklerde dirençlilik gözlenmiş, hatta etki yüzdesi de oldukça yüksek bulunmuştur. Yine de duyarlılığın fazla olması, SAM'ın EFB üzerinde geniş etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4. 5.).

Çizelge 4. 6. Tobramycin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	23	22	25	<4	<12	13-14	>15	S
07/09	AFB	22	22	23	<4	<12	13-14	>15	S
07/19	AFB	12	10	10	<4	<12	13-14	>15	R
07/20	AFB	0	0	0	<4	<12	13-14	>15	R
48/19	AFB	18ø	22ø	21ø	<4	<12	13-14	>15	S
48/52	AFB	11	12	7	<4	<12	13-14	>15	R
48/62	AFB	25	23	25	<4	<12	13-14	>15	S
48/63	AFB	13	12	12	<4	<12	13-14	>15	R
48/64	AFB	0	0	0	<4	<12	13-14	>15	S
52/01	AFB	0	0	0	<4	<12	13-14	>15	R
52/04	AFB	0	0	0	<4	<12	13-14	>15	R
61/01	AFB	24	26	22	<4	<12	13-14	>15	S
24/02	AFB	12	16	18	<4	<12	13-14	>15	I-S
24/03	AFB	26	28	24	<4	<12	13-14	>15	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Tobramycin'e karşı AFB izolatlarının göstermiş olduğu tepki dirençlilik oranının daha fazla olmasıyla göze çarpmaktadır. Antalya'dan 07/19 ve 07/20; Muğla örneklerinden 48/52 ve 48/63; Ordu'dan 52/01 ve 52/04 direnç oluştururken, Erzincan 24/02 no'lu izolat orta derecede duyarlı olarak tespit edilmiştir. Diğer AFB izolatları ise tobramycine karşı duyarlı bulunmuşlardır (Çizelge 4. 6.).

Çizelge 4. 7. Tobramycin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	11	12	9	<4	<12	13-14	>15	R
07/10	EFB	13ø	13ø	14ø	<4	<12	13-14	>15	I
07/15	EFB	11	9	10	<4	<12	13-14	>15	R
07/18	EFB	13	14	12	<4	<12	13-14	>15	I
22/11	EFB	0	0	0	<4	<12	13-14	>15	R
37/01	EFB	16	15	17	<4	<12	13-14	>15	S
48/08	EFB	16	16	16	<4	<12	13-14	>15	S
48/20	EFB	13	13	14	<4	<12	13-14	>15	I
48/28	EFB	21	26	22	<4	<12	13-14	>15	S
48/42	EFB	16	17	17	<4	<12	13-14	>15	S
48/44	EFB	14	12	14	<4	<12	13-14	>15	I
48/48	EFB	18	18	21	<4	<12	13-14	>15	S
48/49	EFB	19	16	21	<4	<12	13-14	>15	S
48/55	EFB	10	8	10	<4	<12	13-14	>15	R
48/56	EFB	19	19	22	<4	<12	13-14	>15	S
48/65	EFB	16	18	16	<4	<12	13-14	>15	S
24/01	EFB	18	12	10	<4	<12	13-14	>15	I

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Tobramycin'in EFB izolatları üzerindeki etkisi de AFB'ye benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlara göre dirençlilik oranı diğer antibiyotiklere kıyasla daha fazladır. Ancak buradaki ikinci farklılık, antibiyotiğin etki performansının iller arasında değişkenlik göstermesidir. Tobramycin'e karşı oluşan direnç Antalya ve Edirne örneklerinde mevcut iken, 48/55 no'lu örnek hariç Muğla örneklerinin hiçbirinde saptanmamıştır. Erzincan'a ait tek EFB izolatında ise orta derecede direnç/duyarlılık söz konusudur (Çizelge 4. 7.).

Çizelge 4. 8. Erythromycin fosfat'ın Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	28	32	26	<2	<13	14-17	>18	S
07/09	AFB	24	22	25	<2	<13	14-17	>18	S
07/19	AFB	14	16	15	<2	<13	14-17	>18	I
07/20	AFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
48/19	AFB	26ø	31ø	27ø	<2	<13	14-17	>18	S
48/52	AFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
48/62	AFB	25	28	33	<2	<13	14-17	>18	S
48/63	AFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
48/64	AFB	23	25	23	<2	<13	14-17	>18	S
52/01	AFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
52/04	AFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
61/01	AFB	28	24	24	<2	<13	14-17	>18	S
24/02	AFB	24	26	22	<2	<13	14-17	>18	S
24/03	AFB	22	32	26	<2	<13	14-17	>18	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Deneylerden elde edilen bulgular, erythromycin fosfat'a karşı AFB izolatlarının göstermiş olduğu üreme potansiyelinin heterojen bir dağılım gösterdiğini açığa vurmaktadır. Şöyle ki; Muğla iline ait 48/19 no'lu örnek antibiyotiğe aşırı duyarlılık gösterirken, 48/52 no'lu örnek direnç oluşturmaktadır. Aynı zamanda benzer sonuçlara farklı iller arasında da rastlanmaktadır. Sonuçlara göre S/R/I oranları da iller bazında hemen hemen eşit dağılım göstererek, erythromycin fosfat'ın antibakteriyel etki performansının ortalama bir değer verdiğini göstermektedir (Çizelge 4. 8.).

Çizelge 4. 9. Erythromycin fosfat'ın Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	22	25	23	<2	<13	14-17	>18	S
07/10	EFB	27ø	25ø	24ø	<2	<13	14-17	>18	S
07/15	EFB	7	6.5	9	<2	<13	14-17	>18	R
07/18	EFB	21	19	21	<2	<13	14-17	>18	S
22/11	EFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
37/01	EFB	24	21	23	<2	<13	14-17	>18	S
48/08	EFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
48/20	EFB	21ø	25ø	20ø	<2	<13	14-17	>18	S
48/28	EFB	22	24	23	<2	<13	14-17	>18	S
48/42	EFB	26	26	25	<2	<13	14-17	>18	S
48/44	EFB	25	21	23	<2	<13	14-17	>18	S
48/48	EFB	22	24	23	<2	<13	14-17	>18	S
48/49	EFB	33	28	30	<2	<13	14-17	>18	S
48/55	EFB	0	0	0	<2	<13	14-17	>18	R
48/56	EFB	34	30	32	<2	<13	14-17	>18	S
48/65	EFB	24	22	26	<2	<13	14-17	>18	S
24/01	EFB	22	24	26	<2	<13	14-17	>18	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
 ♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Antalya (07/15), Edirne (22/11) ve Muğla iline ait iki izolat (48/08- 48/55) hariç tüm EFB izolatlarında erythromycin fosfat'a karşı duyarlılık saptanmıştır. İnhibisyon çapı değerleri incelendiğinde de bu duyarlılığın sınırdan olmayıp, oldukça yüksek oranlarda seyrettiği de göze çarpmaktadır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda erythromycin fosfat'ın geniş oranda EFB üzerindeki etkisi ortaya çıkmaktadır (Çizelge 4. 9.).

Çizelge 4. 10. Azitromycin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	27	25	26	<4	<12	13-19	>20	S
07/09	AFB	22	24	22	<4	<12	13-19	>20	S
07/19	AFB	12	12	12	<4	<12	13-19	>20	R
07/20	AFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
48/19	AFB	25ø	25ø	26ø	<4	<12	13-19	>20	S
48/52	AFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
48/62	AFB	30	29	30	<4	<12	13-19	>20	S
48/63	AFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
48/64	AFB	25	24	25	<4	<12	13-19	>20	S
52/01	AFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
52/04	AFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
61/01	AFB	26	26	24	<4	<12	13-19	>20	S
24/02	AFB	18	17	18	<4	<12	13-19	>20	I
24/03	AFB	13	13	14	<4	<12	13-19	>20	I

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Azitromycin'in antibiyogram testi sonuçları hemen her ilde dirençliliğin, duyarlılıkla aynı oranda fazla görülmesi ile kendini göstermiştir. Duyarlılık oranının az olması azitromycinin AFB izolatları üzerinde efektif bir etki göstermediği sonucunu da ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4. 10.).

Çizelge 4. 11. Azitromycin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	23ø	23ø	22ø	<4	<12	13-19	>20	S
07/10	EFB	37ø	38ø	31ø	<4	<12	13-19	>20	S
07/15	EFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
07/18	EFB	19	18	19	<4	<12	13-19	>20	I
22/11	EFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
37/01	EFB	20	20	21	<4	<12	13-19	>20	S
48/08	EFB	0	0	0	<4	<12	13-19	>20	R
48/20	EFB	21	22	19	<4	<12	13-19	>20	S
48/28	EFB	20	23	18	<4	<12	13-19	>20	S
48/42	EFB	23	21	22	<4	<12	13-19	>20	S
48/44	EFB	20	21	20	<4	<12	13-19	>20	S
48/48	EFB	20	19	21	<4	<12	13-19	>20	S
48/49	EFB	27	26	27	<4	<12	13-19	>20	S
48/55	EFB	9	9	8	<4	<12	13-19	>20	R
48/56	EFB	35	32	34	<4	<12	13-19	>20	S
48/65	EFB	26	26	25	<4	<12	13-19	>20	S
24/01	EFB	20	19	20	<4	<12	13-19	>20	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
 ♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

EFB izolatları üzerinde azitromycin'in antibakteriyel etki performans sonuçları Antalya, Edirne ve Kastamonu örneklerinde dirençlilik gösterirken, Muğla iline ait örneklerin çoğunda duyarlılık saptanmıştır. Erzincan'ın 24/01 no'lu örneğinde ise yine bakterinin antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu saptanmıştır (Çizelge 4. 11.).

Çizelge 4. 12. Rifampin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen AFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
06/01	AFB	19	18	19	<0.5	<7	8-11	>12	S
07/09	AFB	19ø	20ø	19ø	<0.5	<7	8-11	>12	S
07/19	AFB	11	10	11	<0.5	<7	8-11	>12	I
07/20	AFB	28	26	27	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/19	AFB	24	23	24	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/52	AFB	20	21	22	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/62	AFB	25	23	26	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/63	AFB	24	22	25	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/64	AFB	22	21	22	<0.5	<7	8-11	>12	S
52/01	AFB	23	21	23	<0.5	<7	8-11	>12	S
52/04	AFB	28	26	29	<0.5	<7	8-11	>12	S
61/01	AFB	23	21	23	<0.5	<7	8-11	>12	S
24/02	AFB	16	17	17	<0.5	<7	8-11	>12	S
24/03	AFB	17	17	18	<0.5	<7	8-11	>12	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ø Sekonder üreme

Rifampin'in AFB izolatları üzerindeki etkisi yüksek duyarlılık göstermektedir. 07/19 no'lu örnek dışındaki tüm illere ait izolatlar rifampine karşı duyarlıdır sonucuna ulaşılmaktadır. Antalya örneği ise (07/19) orta derecede dirençli/duyarlı kategorisine alınacak bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ancak bu sonuç, diğer test sonuçlarının genel görünümünü etkilememektedir (Çizelge 4. 12.).

Çizelge 4. 13. Rifampin'in Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen EFB izolatlarındaki inhibisyon zonları* ve standartları

İzolat	Teşhis	Çap(mm)			MIC* (µg/ml)	R* (mm)	I* (mm)	S* (mm)	Sonuç
		1.Deney	2.Deney	3.Deney					
07/03	EFB	12	12	13	<0.5	<7	8-11	>12	S
07/10	EFB	9	9	9	<0.5	<7	8-11	>12	I
07/15	EFB	11	12	13	<0.5	<7	8-11	>12	S
07/18	EFB	24	21	23	<0.5	<7	8-11	>12	S
22/11	EFB	13	15	17	<0.5	<7	8-11	>12	S
37/01	EFB	21	26	28	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/08	EFB	16	16	17	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/20	EFB	21	22	22	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/28	EFB	15	15	16	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/42	EFB	27	28	27	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/44	EFB	20	20	21	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/48	EFB	18	18	19	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/49	EFB	18	17	18	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/55	EFB	16	16	18	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/56	EFB	24	24	22	<0.5	<7	8-11	>12	S
48/65	EFB	26	26	27	<0.5	<7	8-11	>12	S
24/01	EFB	19	21	19	<0.5	<7	8-11	>12	S

* İnhibisyon zon çapları antibiyotik diskini de içermektedir. ♣ Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
 ♦ Resistant: Dirençli (R) ♥ Intermediate: Orta (I) ♠ Susceptible: Duyarlı (S) ⚡ Sekonder üreme

Rifampin'e ait EFB izolatları üzerindeki antibakteriyel etki performans sonuçları incelendiğinde, AFB ile benzer sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna göre yüksek duyarlılık tüm illere ait örnekler üzerindeki tek sonuçtur. EFB izolatları içinde de Antalya iline ait 07/10 no'lu örnekte orta derecede dirençlilik/duyarlılık saptanmıştır (Çizelge 4. 13.).

Deneye alınan antibiyotiklerin AFB ve EFB hastalık etkenleri üzerindeki etki performansları tüm izolatlar üzerinden yüzdelik etki oranlar açısından da değerlendirilmiş, böylelikle sonuçların daha rahat yorumlanabilmesi amaçlanmıştır (Çizelge 4. 14., Çizelge 4. 15., Çizelge 4. 16., Çizelge 4. 17., Çizelge 4. 18., Çizelge 4. 19.).

Çizelge 4.14. Amoxycillin clavulanic asid'in yüzdelik etki oranları

Amoxycillin clavulanic asid	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	%27.1	% 23.6
Intermediate (Orta)	-	-
Susceptible (Duyarlı)	%72.9	% 76.4

Çizelge 4. 15. Sulbactam ampicillin'in yüzdelik etki oranları

Sulbactam ampicillin	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	% 9	% 5.9
Intermediate (Orta)	% 18.1	-
Susceptible (Duyarlı)	% 72.3	% 94.1

Çizelge 4. 16. Tobramycin'in yüzdelik etki oranları

Tobramycin	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	% 45.5	% 29.4
Intermediate (Orta)	-	% 23.6
Susceptible (Duyarlı)	% 54.5	% 47

Çizelge 4. 17. Erythromycin fosfat'ın yüzdelik etki oranları

Eritromycin fosfat	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	% 36.4	% 29.4
Intermediate (Orta)	% 9	-
Susceptible (Duyarlı)	% 54.6	% 70.5

Çizelge 4. 18. Azitromycin'in yüzdelik etki oranları

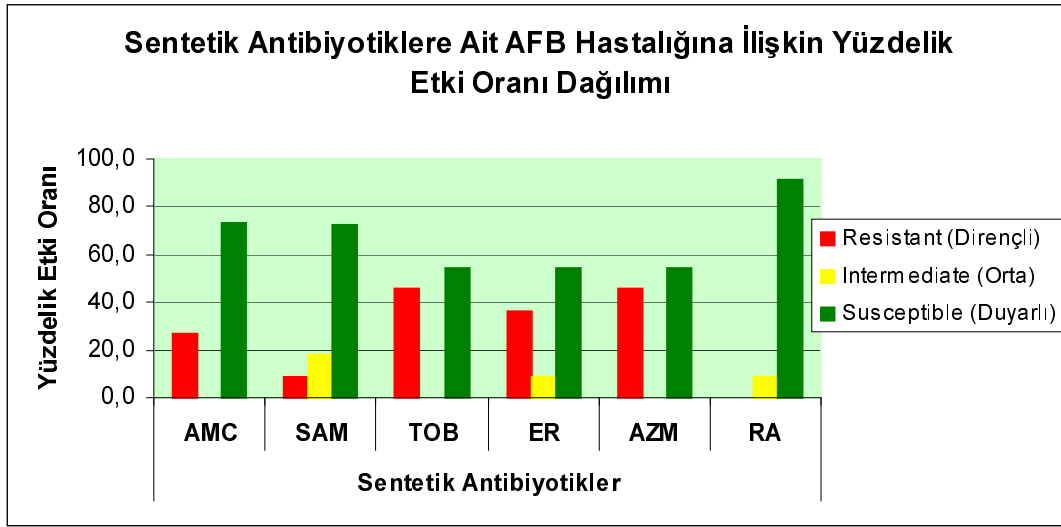
Azitromycin	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	% 45.5	% 29.4
Intermediate (Orta)	-	% 5.8
Susceptible (Duyarlı)	% 54.5	% 64.8

Çizelge 4. 19. Rifampin'in yüzdelik etki oranları

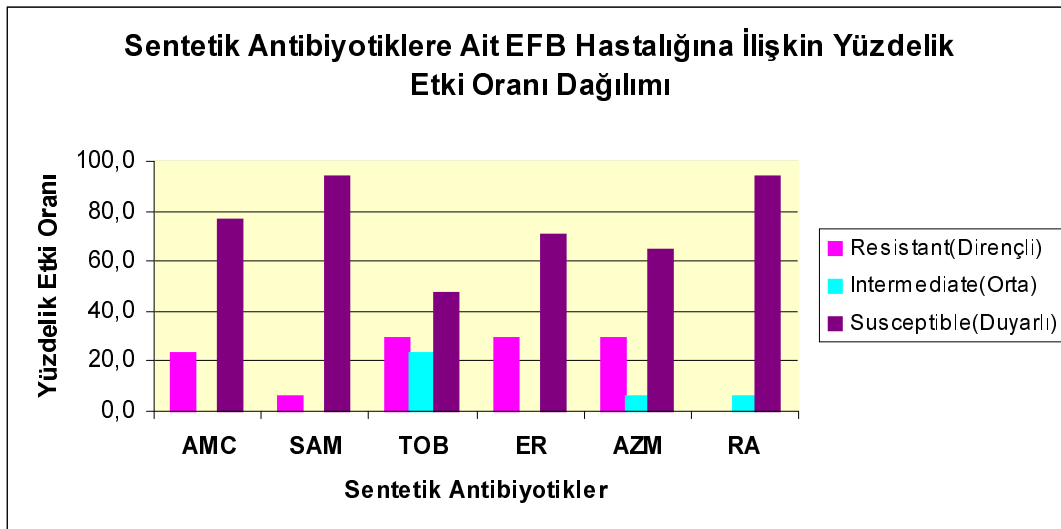
Rifampin	Amerikan Yavru Çürüklüğü	Avrupa Yavru Çürüklüğü
Resistant (Dirençli)	-	-
Intermediate (Orta)	% 9	% 5.8
Susceptible (Duyarlı)	%91	% 94.2

Amerikan ve Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalık etkenleri üzerinde antibiyotiklerin etki yüzdelerine topluca bakıldığında, her iki hastalıkta da antibiyotiklerin etki sıralamasının hemen hemen aynı çıkması ilginç bir sonuçtur. Buna göre; hastalıklara karşı en etkili antibiyotiğin rifampin olduğu göze çarpmaktadır (Çizelge 4. 19.). Daha sonra sırasıyla sulbactam-ampicillin ve amoxycillin-clavulanic asid hastalık etkenleri üzerinde geniş etkiye sahip antibiyotikler olarak gelmektedir (Çizelge 4. 14; Çizelge 4. 15). Etki sıralamasına göre bu üç antibiyotiği erythromycin fosfat izlemektedir (Çizelge 4. 17.). Erythromycin fosfat'ın aynı zamanda uygulamada yani hastalığın tedavisinde genel olarak kullanılmakta olan

antibiyotik olması nedeniyle de Türkiye’de antibiyotiğin kullanım şekliinden kaynaklanabilecek direnç ya da etki performansının sürekliliğinin saptanması amacıyla da diğer antibiyotiklerden farklı olması, antibiyogram testinden elde edilen sonuçların daha farklı yorumlanabileceği anlamına gelmektedir. Düşük yüzdelerle etkiye sahip azitromycin de protein sentezini engelleyerek etkili olan başka bir antibiyotiktir (Çizelge 4. 18.). Deneylerde en az etkiye sahip olarak yüzdelerle etki oranı sonucu veren antibiyotik ise tobramycin olmuştur (Çizelge 4. 16.).



Şekil 4. 3. Sentetik antibiyotiklere ait AFB hastalığına ilişkin yüzdelerle etki oranı dağılımı



Şekil 4. 4. Sentetik antibiyotiklere ait EFB hastalığına ilişkin yüzdelik etki oranı dağılımı

4. 2. Sentetik Antibiyotiklerin Etki Performanslarına Ait İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

Deneye alınan farklı etki mekanizmalarına sahip 6 adet sentetik antibiyotiğin antibiyogram test sonuçlarına göre oluşturmuş oldukları zon çapları arasındaki ilişki istatistiksel açıdan da incelenmiştir. İstatistiksel analizlerde Tanımlayıcı İstatistiki Analizler, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve kendi aralarındaki karşılaştırmaların yapılabilmesi amacıyla Duncan Testleri uygulanmıştır (Sokal and Rohlf, 1995).

Öncelikle sentetik antibiyotiklerin, Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) hastalığına karşı antibakteriyel etki performansları, oluşturdukları inhibisyon zon çaplarının büyüklükleri açısından incelenmiş ve tanımlayıcı istatistiki bulgular elde edilmiştir (Çizelge 4. 20). İncelenen bulgularda, her antibiyotiğin tüm izolatlar üzerindeki antibiyogram test sonuçlarına ait ortalama inhibisyon çapı, standart sapma ve standart hata ile tüm deneylerden elde edilen minimum ve maksimum zon çapı değerlerine ulaşılmıştır. Ardından deney sonuçları arasındaki dağılımın gözlemlenebilmesi (ANOVA) ve antibiyotiklerin etki performanslarının birbirleriyle karşılaştırılabilmesi (Duncan Testi) amacıyla farklı testler uygulanmış, sonuçlar çizelgeler halinde özetlenmiştir (Çizelge 4. 21; Çizelge 4. 22).

Test sonuçlarına göre sentetik antibiyotiklerin tüm izolatlar üzerindeki farklı etki performansları istatistiki açıdan birbirinden farklı ve anlamlı bulunmuştur (Sig; $P \leq 0.05$, ANOVA). Bu farklılıkların derecesinin belirlenmesinde kullanılan Duncan Testi sonuçlarına göre ise, AFB hastalık etkeni üzerinde denemeye alınan sentetik antibiyotikler etki derecelerine göre gruplandırılmış ve bu gruplandırma sonucunda TOB, ER ve AZM (a:1. derece) hemen hemen hiç etkili bulunmamış ve aynı grupta yer almış; ER ve RA (b: 2. derece) diğerlerine göre daha etkili bulunarak 2. grubu oluşturmuş; AMC, SAM ve RA ise (c: 3. derece)en etkili sonuç veren grup olarak yer almışlardır. Bazı antibiyotiklerin iki grupta birden yer alması, kendilerine ait zon değerlerinin grup sınırlarında bulunmasından kaynaklanmaktadır. Duncan testi

sonuçları doğrultusunda oluşan mevcut derecelendirme, sentetik antibiyotiğin etki performansının artması durumunda sayısal olarak da (1,2,3,) artmaktadır.

Çizelge 4. 20. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistik bulgular

Sentetik Antibiyotik	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
AMC	,00	62,00	24,0238	17,8319	2,7515
SAM	,00	52,00	21,8571	13,9713	2,1558
TOB	,00	28,00	14,1905	10,3080	1,5906
ER	,00	33,00	15,9762	12,6192	1,9472
AZM	,00	30,00	14,0476	11,5926	1,7888
RA	,00	29,00	19,9524	7,0571	1,0889

Çizelge 4. 21. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	3717,270	5	743,454	4,633	,000*
Grup İçi	39477,381	246	160,477		

*P≤ 0.05 önemlidir. SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 22. Sentetik antibiyotiklerin AFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları

	Sentetik Antibiyotik	Ortalama İnhibisyon Çapı-mm* (Standart Sapma)
Duncan	AZM	14,0476(11,5926) ^a
	TOB	14,1905(10,3080) ^a
	ER	15,9762(12,6192) ^b
	RA	19,9524(7,0571) ^c

SAM	21,8571(7,0571) ^c
AMC	24,0238(17,8319) ^c

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar aynı grupta yer almaktadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır

Sentetik antibiyotiklerin Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla da aynı istatistiki testler, aynı amaçlarla kullanılmış ve tanımlayıcı istatistiki bilgiler ile antibiyotik etkinliğinin derecelendirilmesine ait bulgular çizelgeler halinde düzenlenmiştir (Çizelge 4. 23; Çizelge 4. 24; Çizelge 4. 25).

Sonuçlar doğrultusunda, her antibiyotiğin tüm izolatlar üzerindeki antibiyogram test sonuçlarına ait ortalama inhibisyon çapı, standart sapma ve standart hata ile tüm deneylerden elde edilen minimum ve maksimum zon çapı değerlerine ulaşılmıştır. Anova Testi sonuçlarına göre sentetik antibiyotiklerin tüm izolatlar üzerindeki farklı etki performansları istatistiki açıdan da birbirinden farklı ve anlamlı bulunmuştur (Sig; $P \leq 0.05$, ANOVA). Bu farklılıkların derecesinin belirlenmesinde kullanılan Duncan Testi sonuçlarına göre ise, EFB hastalık etkeni üzerinde denemeye alınan sentetik antibiyotikler de etki derecelerine göre gruplandırılmış ve bu gruplandırma sonucunda sadece 2 grup meydana gelmiş, buna göre TOB (a: 1. derece) hemen hemen hiç etkili bulunmamış; deneye alınan diğer tüm sentetik antibiyotikler (b: 2. derece) 2. grupta yer almıştır. Duncan testi sonuçları doğrultusunda oluşan mevcut derecelendirme, sentetik antibiyotiğin etki performansının artması durumunda sayısal olarak da (1,2) artmaktadır.

Çizelge 4. 23. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular

Sentetik Antibiyotik	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
AMC	,00	36,00	20,0385	7,6208	1,0568
SAM	,00	31,00	18,6961	6,7625	,9469
TOB	,00	26,00	14,2549	5,2758	,7388
ER	,00	34,00	18,9688	10,5721	1,5260
AZM	,00	38,00	17,5625	10,0338	1,4483
RA	9,00	28,00	18,7647	5,2291	,7322

Çizelge 4. 24. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	1039,41 2	5	207,882	3,408	,005*
Grup İçi	17992,3 41	295	60,991		

*P≤ 0.05 önemlidir. SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 25. Sentetik antibiyotiklerin EFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları

	Sentetik Antibiyotik	Ortalama İnhibisyon Çapı-mm* (Standart Sapma)
Duncan	TOB	14,2549(5,2758) ^a
	AZM	17,5625(10,0338) ^b
	SAM	18,6961(6,7625) ^b
	RA	18,7647(5,2291) ^b
	ER	18,9688(10,5721) ^b
	AMC	20,0385(7,6208) ^b

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar aynı grupta yer almaktadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır

4. 3. Bitkisel Yağların GC-MS Bulguları ve Saptanan İçerikleri

Deneylerde kullanılan bitkisel yağların GC-MS analizleri yapılmış ve sonuçlara göre tüm bitkisel yağların içerikleri ve yağdaki yüzde oranları çizelgeler halinde düzenlenmiştir (Çizelge 4.26- Çizelge 4. 35.). Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir (Başer et al., 1999a).

Çizelge 4. 26. *Seseli petraeum* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

Polar RRI	Bileşik	<i>S. petraeum</i> H925C % Oranları
1032	α -Pinene	1.81
1076	Camphene	tr*
1118	β -Pinene	tr*
1132	Sabinene	9.52
1174	Myrcene	0.71
1188	α -Terpinene	tr*
1203	Limonene	0.44
1218	β -Phellandrene	tr*
1246	(Z)- β -Ocimene	0.60
1255	γ -Terpinene	11.32
1280	<i>p</i> -Cymene	6.46
1479	δ -Elemene	1.23
1504	Daucene	6.09
1549	β -Cubebene	1.81
1594	trans- β -Bergamotene	0.67
1600	β -Elemene	1.01
1614	Carvacrol methylether	0.96
1650	γ -Elemene	tr*
1659	γ -Gurjunene	0.56
1668	(Z)- β -Farnesene	6.89
1687	α -Humulene	0.99
1704	γ -Muurokene	3.50
1705	Zizanene	tr*
1726	Germacrene D	7.83
1741	β -Bisabolene	0.98
1755	Bicyclogermacrene	1.65
2045	**Carotol	20.68
2092	β -Oplophenone	5.39
2202	4 α -Hydroxy germacrene-1 (10)-5-diene	2.80
2239	Carvacrol	0.45
2257	β -Eudesmol	0.45
49.6	Guaia-6,10 (14)-dien-4 β -ol	0.65
	Toplam %	95.45
	Bileşik Sayısı	32

*tr: Trace (Eser miktarda < 0.1 %) ** Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 27. *Seseli resinosum* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

Polar RRI	Bileşik	<i>S. resinosum</i> H925D % Oranları
1032	α -Pinene	13.66
1118	**β-Pinene	37.51
1132	Sabinene	4.32
1174	Myrcene	2.16
1203	Limonene	2.00
1218	β -Phellandrene	1.41
1255	γ -Terpinene	tr*
1280	<i>p</i> -Cymene	tr*
1479	δ -Elemene	tr*
1590	Bornyl acetate	tr*
1600	β -Elemene	tr*
1612	β -Caryophyllene	1.42
1650	γ -Elemene	0.85
1687	α -Humulene	2.39
1705	Zizanene	1.52
1726	Germacrene D	6.18
1740	α -Muurolene	1.52
1755	Bicyclogermacrene	tr*
1854	Germacrene B	0.80
2202	4 α -Hydroxy germacra-1 (10)-5-diene	21.67
2209	T-Muurolol	1.48
49.6	Guaia-6,10 (14)-dien-4 β -ol	1.10
	Toplam %	98.47
	Bileşik sayısı	22

*tr: Trace (Eser miktarda < 0.1 %) ** Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 28. *Seseli andronakii* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

Polar RRI	Bileşik	<i>S. andronakii</i> H925E % Oranları
1032	α -Pinene	4.73
1076	Camphene	0.40
1118	β -Pinene	0.49
1132	Sabinene	0.24
1174	Myrcene	0.96
1203	Limonene	0.47
1255	γ -Terpinene	1.11
1259	Butyl-3-methyl butyrate	0.34
1280	<i>p</i> -Cymene	0.34
1299	2-Methyl butyl-3-methyl butyrate	0.23
1479	δ -Elemene	0.24
1504	Daucene	1.64
1549	β -Cubebene	0.35
1590	Bornyl acetate	0.24
1594	trans- β -Bergamotene	0.89
1600	β -Elemene	0.26
1650	γ -Elemene	2.40
1668	(<i>Z</i>)- β -Farnesene	0.88
1704	γ -Curcumene	1.18
1704	γ -Muurokene	2.16
1726	Germacrene D	8.66
1727	7-epi-1,2- Dehydro sesquicineole	2.93
1741	β -Bisabolene	0.97
1784	trans- α -Bisabolene	0.78
1854	Germacrene B	2.46
2045	**Carotol	52.69
2094	<i>p</i> -Cresol	1.77
2232	α -Bisabolol	0.90
49.2	β -Sinensal	0.24
2257	β -Eudesmol	0.53
	Toplam %	91.48
	Bileşik Sayısı	30

*tr: Trace (Eser miktarda < 0.1 %) ** Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 29. *Seseli tortuosum* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

Polar RRI	Bileşik	<i>S. tortuosum</i> H926A % Oranları
1032	α -Pinene	13.45
1076	Camphene	0.46
1118	β -Pinene	1.27
1132	Sabinene	19.66
1176	α -Phellandrene	2.24
1188	α -Terpinene	1.57
1203	Limonene	2.26
1218	β -Phellandrene	7.78
1255	γ -Terpinene	2.56
1280	<i>p</i> -Cymene	1.05
1290	Terpinolene	0.49
1299	2-Methyl butyl-3-methyl butyrate	tr*
1590	Bornyl acetate	tr*
1600	β -Elemene	0.36
1614	Carvacrol methylether	1.04
1650	γ -Elemene	1.22
1668	(<i>Z</i>)- β -Farnesene	tr*
1687	α -Humulene	tr*
1726	Germacrene D	2.13
1755	Bicyclogermacrene	tr*
1854	Germacrene B	1.37
2045	Carotol	tr*
2094	<i>p</i> -Cresol	0.70
2100	(<i>E</i>)-Sesquilandulyl acetate	0.56
2183	**(<i>E</i>)-Sesquilandulol	37.04
2232	α -Bisabolol	0.40
50.7	(2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i>)-Farnesol	0.43
	Toplam %	98.04
	Bileşik sayısı	27

*tr: Trace (Eser miktarda < 0.1 %) ** Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 30. *Bifora radians* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>B. radians</i> - <i>Kışniş otu</i> H610B % Oranları
1611	Undekanal	1.0
1830	Tridekanal	2.8
1875	(E)-2-Dodekanal	2.3
2000	*(E)-2-Tridekanal	52.9
2100	(E)-2-Tetradekanal	24.6
2135	Hekzadekanal	1.5

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdeler orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 31. *Anethum graveolens* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>A. graveolens</i> - <i>Dereotu</i> H442B % Oranları
1203	Limonen	38.2
1645	<i>cis</i> -İzodihidrokarvon	1.5
1751	*Carvon	56.4
2384	Dillapiol	0.8

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdeler orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 32. *Heracleum platytaenium* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>H. platytaenium</i> - <i>Tavşancıl otu</i> H354B % Oranları
1483	*Oktil asetat	87.9
1562	Oktanol	1.6
1623	Oktil butirat	1.4
1829	Oktil hekzanoat	2.4
2020	Oktil oktanoat	2.1

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdeler orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 33. *Pimpinella anisum* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>P. anisum-Anason</i> H582A % Oranları
1687	Metil kavikol	1.6
1845	*(E)-Anetol	94.6
2053	Anisaldehit	0.2
2571	Psödoizoöjenil-2-metil bütirat	1.7

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 34. *Rosmarinus officinalis* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>R. officinalis-Biberiye</i> E772F % Oranları
1032	α -pinen	10.1
1076	kamfen	2.8
1118	β -pinen	2.6
1174	mirsen	1.8
1203	limonen	2.2
1213	*1,8-sineol	46.9
1255	γ -terpinen	1.3
1280	p-simen	1.9
1532	kafur	7.1
1590	bornil asetat	3.0
1611	terpinen-4-ol	1.9
1612	β -karyofillen	3.5
1706	α -terpineol	4.6
1719	borneol	2.6

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdelik orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 35. *Origanum onites* uçucu yağı ana bileşikleri ve yüzde oranları

RI	Bileşikler	<i>O. onites</i> -Ticari kekik E961A % Oranları
1032	α -pinen	1.0
1174	mirsen	1.6
1188	α -terpinen	1.4
1255	γ -terpinen	3.3
1280	p-simen	8.3
1553	linalol	9.3
2198	timol	1.7
2239	*Carvakrol	66.4

* Yağ içeriğinde en yüksek yüzdeler orana sahip bileşen, etken ana madde olarak kabul edilmiştir.

4. 4. Bitkisel Yağların Antibiyogram Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen Amerikan Yavru Çürüklüğü ve Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalık etkenlerinin oluşturduğu izolatlar üzerinde yine Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan ve çoğunluğu endemik olarak seçilen 11 adet bitkisel yağ örneğinin antibakteriyel etki performansları saptanmıştır (Şekil 4. 5.) Elde edilen bulgular hem AFB (Çizelge 4. 36.) hem de EFB (Çizelge 4. 37.) izolatları için ayrı ayrı düzenlenen çizelgeler halinde sunulmuştur.

İnhibisyon zon çaplarının ölçümüne kullanılan diskler de dahil edilmiştir. Ancak daha önce de ifade edildiği gibi genel anlamda literatürde kullanıldığı üzere, bitkisel yağ hastalık etkeni üzerinde hiçbir etki gösterememiş ve zon oluşturmamışsa, sonuç değerinin sadece disk çapını ifade etmemesi amacıyla çizelgelerde bu tip durumlar için "0" değeri kullanılmıştır (Kochansky et al., 2001).

Çizelgelerde yer alan bazı zon çapı ölçümlerinin yanında bulunan sekonder üreme simgesiyle de, öncelikle temiz bir zonun oluştuğu, ancak daha sonra üremenin

azalarak devam etmesiyle bulanık görüntü veren ikinci zon oluşumunun varlığı ifade edilmiştir.



Şekil 4. 5. Bitkisel yağın (kekik yağı) AFB izolatu üzerindeki antibiyogram testi

Fakat ölçümlerde her zaman berrak görünümdeki gerçek zon çapı değer olarak çizelgelerde yer almıştır. Yalnız sekonder üreme her bitkisel yağ örneği ya da her izolatta görülmeyeceği için simgesel ifade kullanılarak, bu sonucun da göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır.

Deneylerde kullanılan bitkisel yağların daha önce hiçbir bal arısı hastalık etkeni üzerindeki antibakteriyel etkisi bilinmediğinden, çalışılmış ve standartize edilmiş zon çapı ölçümlerine sahip değildir. Bu nedenle çizelgelerde R, I, S nitelendirmelerinin yapılması mümkün olmamıştır. Elde edilen bulgular, kullanılan bitkisel yağların AFB ve EFB hastalıklarına ait ilk değerleridir. Hatta bu durum nedeniyle çalışmanın ikinci aşamasında etkili-yarı etkili olarak saptanmış olan

bitkisel yağ örneklerinin mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MIC değerlerinin saptanmasına ve bundan sonraki çalışmalar için standart oluşturmaya çalışılmıştır.

Çizelge 4. 36. Farklı bölgelerden elde edilen Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi

İzolat	<i>Seseli petraeum H925 C</i>			<i>Seseli resinosum H925 D</i>			<i>Seseli andronakii H925 E</i>			<i>Seseli tortuosum H926 A</i>			<i>Bifora radians H610 B</i>			<i>Anethum graveolens H442 B</i>		
	Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*		
06/01	0	0	0	0	0	0	11	9	13	8	6.5 ø	6 ø	7 ø	7 ø	6.5	7	8	8.5
07/09	0	0	0	0	0	0	9	9	11	8	6.5	7	8	7	6.5	8 ø	9	8.5
07/19	0	0	0	0	0	0	9	10	9	7	8	6	6.5	7.5	9	6.5	8	6.5
07/20	0	0	0	0	0	0	11	10	11	8	8	8.5	7.5	7	7.25	6.5	7.5	7
48/19	0	0	0	0	0	0	9	8	8	8	7	8	8	8	7	7	7	8
48/52	0	0	0	0	0	0	12	11	11	8	6	6.5	8	8	7	11	10	9
48/62	0	0	0	0	0	0	9	9	9.5	6.5	7.5	8	8	7	7.5	12	11	9
48/63	0	0	0	0	0	0	10	9 ø	8	8	6.5 ø	8	6	8	7	6	9	7.5
48/64	0	0	0	0	0	0	9	10	10	8	7	6.5	8	8	7	12	10	11
52/01	0	0	0	0	0	0	13	9	11	7	6	8	7	7	7	6	7	8
52/04	0	0	0	0	0	0	9	10 ø	10	8	6.5	6.5	8	9	7	6.5	8	8
61/01	0	0	0	0	0	0	10	11	11	7	7	9	8	8	9	11	9	9
24/02	0	0	0	0	0	0	9	8	8	6.5	7	8	6	6.5	6	7	8	6.5
24/03	0	0	0	0	0	0	9	9	9	7	8	7	8	6	7	7	7	7

*: İnhibisyon zon çapları diski (5.5 mm) de içermektedir.

ø: Sekonder üreme

Çizelge 4. 36. (devamı) Farklı bölgelerden elde edilen Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi

İzolat	<i>Heracleum platytaenium</i> H354 B			<i>Pimpinella anisum</i> H582 A			<i>Rosmarinus officinalis</i> E772 F			Karvakrol (Sigma)			<i>Origanum onites</i>		
	Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*		
06/01	6	6.5	6.5	7	7	7	8	8	8	21	22	21.5	23	26	26
07/09	6.5	8	6.5	7.5 ø	7	7.25	10	9	9.5	24	23	22	40	22	30
07/19	8	7	8	10	9	6.5	16	14	8	22	21	21.5	41	31	37
07/20	6	7	6.5	8 ø	7	7.5	8 ø	7.5 ø	7.75 ø	26	24	24	20	26	25
48/19	6	7	8	11	13	6.5	20	22	11	21	24	22	28	46	32
48/52	6.5	8	7	9	8	8.5	18	12 ø	15	23	24	23	54	30	38
48/62	8	6.5	6	10.5	10.7	13.75	20	27	23.5	23	22	24	51	41	44
48/63	6.5	6.5	6.5	6	8 ø	6.5	7 ø	7 ø	7	23	23	22	23	34	30
48/64	6.5	6.5	6.5	8 ø	8	8	23	9	16	22	20	22	29	21	24
52/01	7	6.5	6	7 ø	6	6.5	9	10	9.5	24	20	21	35	28	37
52/04	6	8	6.5	6.5	7 ø	6.5	8	10	5	21	25	24	26	39	34
61/01	8	6.5	6.5	8.5	6 ø	7.25	11	12	11.5	24	21	22	30	46	40
24/02	8	7	7	12 ø	10	11	8	9 ø	8.5	22	21	22	48	22	37
24/03	6.5	7.5	6.5	7 ø	6 ø	6.5	7	7	7	24	19	20	20	25	27

*: İnhibisyon zon çapları diskî (5.5 mm) de içermektedir.

ø: Sekonder üreme

Çizelge 4. 37. Farklı bölgelerden elde edilen Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi

İzolat	<i>Seseli petraeum</i> H925 C			<i>Seseli resinosum</i> H925 D			<i>Seseli andronakii</i> H925 E			<i>Seseli tortuosum</i> H926 A			<i>Bifora radians</i> H610 B			<i>Anethum graveolens</i> H442 B		
	Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*		
07/03	8	9	8.5	10	8	9	12	11	11.5	7	7	7	7	6	6.5	11	7	9
07/10	7	7	7	7	7	7	10	9	9.5	6	8	7	6	6	6.5	10	9	9.5
07/15	8	7	7.5	8	8	9	11	14	12.5	7	7	7	6.5	6.5	8	8	8	8
07/18	9	8	8.5	8	7	7.5	20	16	18	9 ø	14	11.5	22	16	14	14	9	7
22/11	8	7	7.5	6	6.5	7	14	12	14	8	7	7.5	10	11	10.5	10	10	10
37/01	8	7	7.5	6	7	3.5	15	11	13	8	10	9	20	18	17	14	8	11
48/08	8	7	7.5	7	9	6	11	12	11.5	8 ø	8	8	21	32	26.5	15	20	17.5
48/20	8	8	8	8	7	6	20	19	19.5	11	8	9.5	18	20	22	8	6.5	10
48/28	8	7	7.5	7	8	6.5	11	8	9.5	7	7	7	8	10	9	8	9	8.5
48/42	7	8	7.5	8	8	8	17	19	18	8	8	8	12	15	15.5	13	11	10
48/44	9	8	8.5	9	8	8	18	18	21	10	14	12	21	12.5	10.5	11	16	14
48/48	15	9	12	12	11	11.5	20	12	16	9	9	9	22	24	10	16	18	17
48/49	9	9	9	11	9	10	14	16	18	8	10	8	21	20	15	16	12	14
48/55	9	9	9	8	10	9	18	20	19	8 ø	9	8.5	19	8	12	9	10.5	8
48/56	0	0	0	8	7	6.5	11	11	11	11	9	8	17	10	8.5	11	7	6.5
48/65	9	8	8.5	9	8	6	11	10	10.5	8	7	8.5	15	16	11	12	12	12
24/01	9	10	9.5	9	11	11	14	20	17	7	7	7	7	8	7.5	12	8	10

*: İnhibisyon zon çapları diski (5.5 mm) de içermektedir. ø: Sekonder üreme

Çizelge 4. 37. (devamı) Farklı bölgelerden elde edilen Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) izolatları üzerinde bazı bitkisel yağların antimikrobiyal etkisi

İzolat	<i>Heracleum platytaenium</i> H354 B			<i>Pimpinella anisum</i> H582 A			<i>Rosmarinus officinalis</i> E772 F			Karvakrol (Sigma)			<i>Origanum onites</i>		
	Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*			Çap (mm)*		
07/03	7	6.5	6.5	7 ø	7 ø	7	7 ø	8 ø	7.5	30	25	27.5	22	21	21.5
07/10	6	7	6.5	7	7 ø	6.5	7	8	7	25	27	26	19	21	20
07/15	8 ø	6	6.5	7 ø	8	7.5	7	8.5	6.5	25	26	25.5	23	23	23
07/18	6.5	7	8	7	7	7	8	8	8	36	38	39	25	25	25
22/11	12 ø	11 ø	11.5	8 ø	8	8	7	7.5	8.5	32	28	30	24	22	23
37/01	9	6.5	6.5	7	8	6.5	10	11	10.5	33	34	33.5	40	37	38.5
48/08	12	7	6	6	7	6.5	7 ø	7 ø	7	33	34	33.5	17 ø	21	19
48/20	8	6	11	6	7	6.5	11	11	11	46	34	40	41	41	41
48/28	10	8	9	7 ø	7 ø	7	7	8	7.5	24	34	29	25	27	26
48/42	7	9	12	9	10	9.5	18	11	14.5	34	32	33	36	44	38
48/44	8	7	6.5	10	7	8.5	15	11	7.5	36	41	42	32	35	36
48/48	10	8	6.5	8	8	8	10 ø	10	10	33	42	37.5	32	38	28
48/49	7	9	8	10	9	9.5	7	8 ø	7.5	40	39	39.5	26	27	26.5
48/55	10	11	10	8	8	8	9	10	9.5	40	34	37	37	37	32
48/56	7.3	8.5	9.5	9	8	8.5	8	6.5	6.5	25	23	24	30	30	30
48/65	6	8	6.5	8.5	7.5	6.5	7	9	8	24	32	28	23	25	24
24/01	6.5	7.5	8	8	7	7.5	8	8	8	28	27	27.5	28	34	31

*: İnhibisyon zon çapları diski (5.5 mm) de içermektedir. ø: Sekonder üreme

Bitkisel yağların AFB ve EFB hastalık etkenleri üzerindeki antibakteriyel etki performanslarına ilişkin bulgular, her izolat ve her yağ çeşidi için farklı sonuçlar vermiş olsa da genel anlamda bir bitkisel yağ çeşidinin AFB ya da EFB'ye ait tüm izolatlar üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapı değerlerinin birbirine yakın ve tutarlı olduğu gözlemlenmiştir. Bulguların daha iyi değerlendirilmesi ve daha somut sonuçlara ulaşılabilmesi amacıyla ayrıntılı istatistiki çalışmalar yapılmış ve analiz testleri uygulanmıştır.

4. 5. Bitkisel Yağların Etki Performanslarına Ait İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

Deneye alınan 11 adet bitkisel yağa ait çizelgeler halinde düzenlenen sonuçların öncelikle standart tanımlayıcı istatistiki bilgileri saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında oluşturulan çizelgelerde yağların oluşturduğu inhibisyon zonlarına ait ortalama, standart sapma, standart hata, minimum ve maksimum zon çapı değerleri yer almaktadır. Tanımlayıcı istatistik çalışmaları hem AFB hem de EFB hastalığı için ayrı ayrı yapılmıştır.

AFB hastalığına ilişkin analizlerde, yukarıda belirtilen bilgiler çizelge halinde özetlendikten sonra (Çizelge 4. 38.) yağlara ait inhibisyon zon çapı değerlerinin dağılımı Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak (Çizelge 4. 39.), yağların birbirlerine göre karşılaştırmalı etki dereceleri ise Duncan testi (Çizelge 4. 40.) ile saptanmıştır (Sokal and Rohlf, 1995).

Antibiyogram testine tabi tutulan 11 adet bitkisel yağın oluşturduğu inhibisyon zon çapı değerlerinin dağılımına ait ANOVA bulguları ise, bitkisel yağların AFB hastalığı açısından tüm izolatlar üzerindeki farklı etki performanslarının istatistiki açıdan da birbirinden farklı ve anlamlı olduğunu göstermektedir (Sig; $P \leq 0.05$, ANOVA) (Çizelge 4. 39.). Bu farklılıkların derecesinin belirlenmesinde kullanılan Duncan Testi sonuçlarına göre ise, AFB hastalık etkeni üzerinde denemeye alınan bitkisel yağlar etki derecelerine göre gruplandırılmış ve bu gruplandırma sonucunda *S. petraeum* ve *S. resinosum* (a: 1. derece) hemen hemen hiç etkili bulunmamış ve aynı grupta yer almış; *S. tortuosum*, *B. radians*, *A. graveolens*, *H. platytaenium*, *P. anisum* (b: 2. derece) diğerlerine göre daha etkili bulunarak 2. grubu oluşturmuş; *S. andronakii* (c: 3. derece) etkili sonuç veren grup olarak yer

almıştır. Derecelendirmeye göre sıralama *R. officinalis* (d: 4. derece), *Karvakrol (saf halde)* (e: 5. derece), *O. onites* (f: 6. derece) şeklinde devam etmektedir. Sonuçta, uygulanan Duncan testine göre AFB hastalığı üzerinde en etkili inhibisyon zonu oluşturan bitkisel yağ *O. onites* olarak saptanmıştır (Çizelge 4. 40.). Duncan testi bulguları doğrultusunda oluşan mevcut derecelendirme, bitkisel yağın etki performansının artması durumunda sayısal olarak da (1,2,3,4) artmaktadır.

Çizelge 4. 38. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular

BİTKİSEL YAĞLAR	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon Çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
<i>S. petraeum</i>	,00	,00	,0000	,0000	,0000
<i>S. resinosum</i>	,00	,00	,0000	,0000	,0000
<i>S. andronakii</i>	8,00	13,00	9,7738	1,2601	,1944
<i>S. tortuosum</i>	6,00	9,00	7,2738	,7902	,1219
<i>B. radians</i>	6,00	9,00	7,3512	,7907	,1220
<i>A. graveolens</i>	6,00	12,00	8,2262	1,6313	,2517
<i>H. platytaenium</i>	6,00	8,00	6,8452	,6939	,1071
<i>P. anisum</i>	6,00	13,75	8,0940	1,9575	,3021
<i>R. officinalis</i>	6,50	27,00	11,5417	5,3840	,8308
<i>*Karvakrol (saf halde)</i>	19,00	26,00	22,3810	1,5094	,2329
<i>O. onites</i>	20,00	54,00	32,5238	8,9067	1,3743

*: Karvakrol *O. onites*'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

Çizelge 4. 39. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	37495,727	10	3749,573	342,551	,000*
Grup İçi	4936,657	451	10,946		

*P≤ 0.05 önemlidir . SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi
MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 40. Bazı bitkisel yağların AFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları

	BİTKİSEL YAĞLAR	Ortalama İnhibisyon Çapı-mm* (Standart Sapma)
Duncan	<i>S. petraeum</i>	,0000(,0000) ^a
	<i>S. resinosum</i>	,0000(,0000) ^a
	<i>S. tortuosum</i>	6,8452(,7902) ^b
	<i>B. radians</i>	7,2738(,7907) ^b
	<i>A. graveolens</i>	7,3512(1,6313) ^b
	<i>H. platytaenium</i>	8,0940(,6939) ^b
	<i>P. anisum</i>	8,2262(1,9575) ^b
	<i>Seseli andronakii</i>	9,7738(1,2601) ^c
	<i>R. officinalis</i>	11,5417(5,3840) ^d
	<i>**Karvakrol (saf halde)</i>	22,3810(1,5094) ^e
	<i>O. onites</i>	32,5238(8,9067) ^f

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar aynı grupta yer almaktadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır

**:: Karvakrol O. onites'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

EFB hastalığına ilişkin bitkisel yağ antibiyogram sonuçları değerlendirildiğinde ise öncelikle tanımlayıcı istatistiki bulgular çizelge halinde özetlenmiş (Çizelge 4. 41.), ardından da AFB'de olduğu gibi yağlara ait inhibisyon zon çapı değerlerinin dağılımı Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak (Çizelge 4. 42.), yağların birbirlerine göre karşılaştırmalı etki dereceleri ise Duncan testi (Çizelge 4. 43.) ile saptanmıştır (Sokal and Rholf, 1995).

Antibiyogram testine tabi tutulan 11 adet bitkisel yağın oluşturduğu inhibisyon zon çapı değerlerinin dağılımına ait ANOVA bulguları, bitkisel yağların EFB hastalığı açısından tüm izolatlar üzerindeki farklı etki performanslarının istatistiki açıdan da birbirinden farklı ve anlamlı olduğunu göstermektedir (Sig; $P \leq 0.05$, ANOVA) (Çizelge 4. 42.). Bu farklılıkların derecesinin belirlenmesinde kullanılan Duncan Testi sonuçlarına göre ise, EFB hastalık etkeni üzerinde denemeye alınan bitkisel yağlar etki derecelerine göre gruplandırılmış ve bu gruplandırma sonucunda *S. petraeum*, *S. resinosum*, *S. tortuosum*, *H. platytaenium*, *P. anisum*, *R. officinalis* (a: 1. derece) hemen hemen hiç etkili bulunmamış ve aynı grupta yer almış; *A. graveolens* (b: 2. derece) diğerlerine göre daha etkili bulunarak 2. grubu oluşturmuş; *S. andronakii* ve *B. radians* (c: 3. derece) etkili sonuç veren grup olarak yer almıştır. *O. onites* (d: 4. derece) ve *Karvakrol (saf halde)* (e: 5. derece) farklı derecelerde etki göstermişlerdir (Çizelge 4. 43.). Sonuçta, uygulanan Duncan testine göre EFB hastalığı üzerinde en etkili inhibisyon zonu Karvakrol (Sigma) tarafından oluşturulmuştur. Duncan testi bulguları doğrultusunda, mevcut derecelendirme, bitkisel yağın etki performansının artması durumunda sayısal olarak da (1,2,3,4,..) artmaktadır.

Çizelge 4. 41. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular

BİTKİSEL YAĞLAR	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon Çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
<i>S. petraeum</i>	,00	15,00	7,8529	2,3902	,3347
<i>S. resinosum</i>	6,00	12,00	8,1373	1,5655	,2192
<i>S. andronakii</i>	8,00	21,00	14,4020	3,7723	,5282
<i>S. tortuosum</i>	6,00	14,00	8,4608	1,7229	,2413
<i>B. radians</i>	6,00	32,00	13,7549	6,3019	,8824
<i>A. graveolens</i>	6,50	20,00	11,0000	3,2879	,4604
<i>H. platytaenium</i>	6,00	12,00	8,0745	1,7998	,2520
<i>P. anisum</i>	6,00	10,00	7,6765	1,0189	,1427
<i>R. officinalis</i>	6,50	18,00	8,7941	2,2939	,3212
<i>*Karvakrol (saf halde)</i>	23,00	46,00	32,2843	5,8543	,8198
<i>O. onites</i>	17,00	44,00	28,8333	7,1124	,9959

*: Karvakrol *O. onites*'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

Çizelge 4. 42. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) test sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	39095,215	10	3909,522	252,546	,000*
Grup İçi	8514,222	550	15,480		

* P ≤ 0.05 önemlidir. . SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi
MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 43. Bazı bitkisel yağların EFB üzerindeki etki performanslarına ait Duncan testi sonuçları

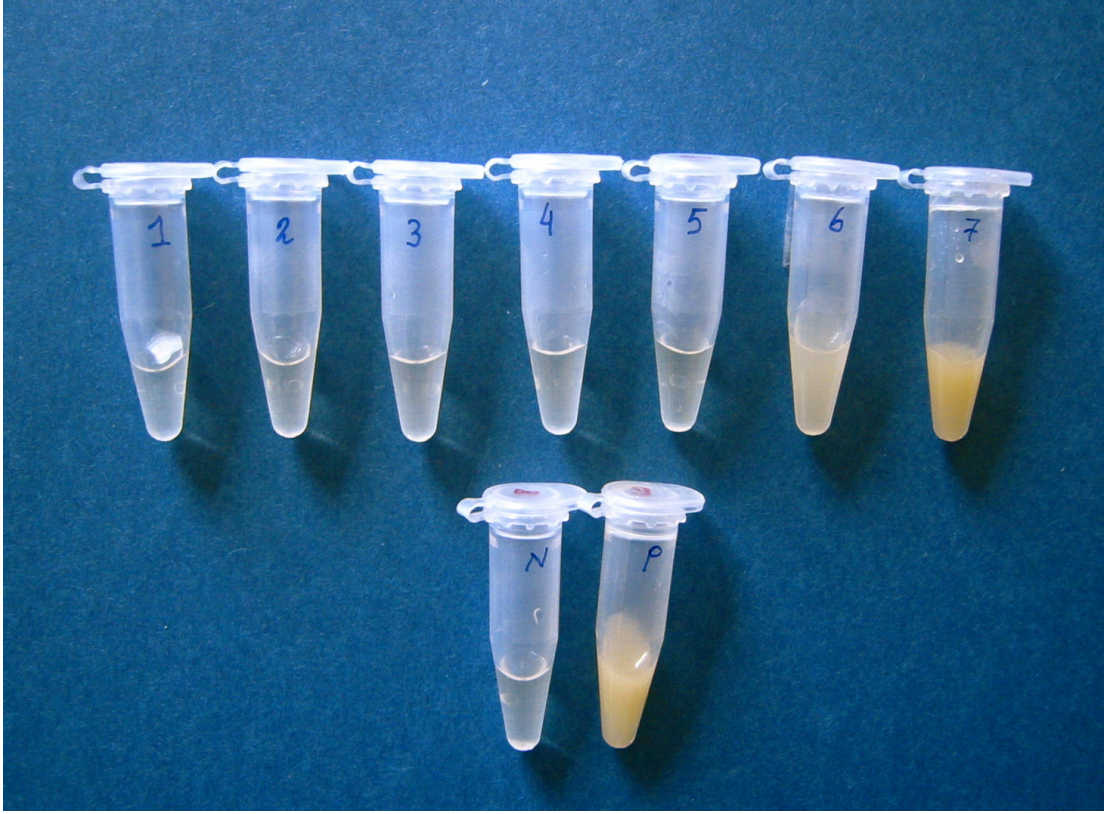
	BİTKİSEL YAĞLAR	Ortalama İnhibisyon Çapı-mm* (Standart Sapma)
Duncan	<i>S. petraeum</i>	7,6765(2,3902) ^a
	<i>S. resinosum</i>	7,8529(1,5655) ^a
	<i>S. tortuosum</i>	8,0745(1,7229) ^a
	<i>H. platytaenium</i>	8,1373(1,7998) ^a
	<i>P. anisum</i>	8,4608(1,0189) ^a
	<i>R. officinalis</i>	8,7941(2,2939) ^a
	<i>A. graveolens</i>	11,000(3,2879) ^b
	<i>S. andronakii</i>	13,7549(3,7723) ^c
	<i>B. radians</i>	14,4020(6,3019) ^c
	<i>O. onites</i>	28,8333(7,1124) ^d
	**Karvakrol (saf halde)	32,2843(5,8543) ^e

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar aynı grupta yer almaktadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır

**:: Karvakrol O. onites'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

4. 6. Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Bulguları

Gerek yapılan antibiyogram deneyleriyle, gerekse sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar doğrultusunda AFB ve EFB hastalıkları üzerinde ayrı ayrı antibakteriyel etki performansı gösterdiği saptanan yağ örnekleri etkin oldukları Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIC) belirlenmesi amacıyla Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak deneye alınmışlardır. Deney bulguları AFB ve EFB hastalık etkenleri açısından ayrı ayrı değerlendirilmiş ve yöntem gereği bitkisel yağın uygulanan farklı konsantrasyonlarında üremenin meydana geldiği ilk yoğunluk Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4. 6.).



Şekil 4. 6. Herhangi bir izolat için düzenlenmiş 7 konsantrasyonlu MIC deneyi seti
P: Sentetik antibiyotik ya da yağ içermeyen pozitif kontrol N: Etkinliği daha önce saptanmış sentetik antibiyotik (AFB için oxytetracycline, EFB için erythromycin fosfat) içeren negatif kontrol, üreme başlangıcı olan 6 no'lu tüpteki bitkisel yağ konsantrasyonu MIC değerini vermektedir.

Deneye alınacak bitkisel yağın etkinlik derecesi istatistiki değerlendirmelerin sonucuna göre belirlendiğinden her hastalık etkeni için (AFB ya da EFB) ayrı olmak üzere en etkili grup olarak gözlemlenen yağ örneğinden başlanarak, bitkisel yağın deneye alınması gereken yeterli miktarı da gözönüne alınarak, bitkisel yağ örneklerinin MIC değerleri tek tek saptanmıştır.

MIC deneylerinde 5 mg mL^{-1} olarak başlanmış olan % 50 sulandırma faktörü uygulanan konsantrasyonların sayısı ise yine yağın etkinlik derecesine göre 5 ya da 7 farklı konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Örneğin f: 6. dereceden etkili olan *O. onites* yağının AFB izolatları üzerinde çok geniş inhibisyon zonları oluşturduğundan, MIC değerinin oldukça düşük

konsantrasyonlarda elde edileceği düşünülerek 7. konsantrasyon olan 0.078 mg mL⁻¹'e kadar inilmiştir. Ancak b:2. dereceden etkili görülen *A. graveolens* yağının MIC deney seti 5 konsantrasyon şeklinde düzenlenmiş, başka bir deyişle son konsantrasyon 0.312 mg mL⁻¹ olmuştur.

Ayrıca MIC deneyleri, izolatların gösterebileceği farklı tepkiler göz önüne alınarak, her izolat için ayrı ayrı kurulmuştur. Ancak sonuçlar incelendiğinde deneye alınan bütün bitkisel yağların tüm AFB izolatları üzerinde hemen hemen aynı konsantrasyonda MIC değeri verdiği gözlemlenmiştir.

AFB üzerinde etkinlik gösteren bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları çizelge halinde özetlenmiştir (Çizelge 4. 44.). Buna göre farklı illerden elde edilmiş olan ve saf kültür haline getirilen 14 adet AFB izolatı, istatistiksel olarak etkinlik derecelerine göre sırasıyla *O. onites* (f:6. derece/grup), Karvakrol (sigma) (e: 5. derece/grup), *R. officinalis* (d:4. derece/grup) ve *A. graveolens* (b: 2. derece/grup)'nın MIC değerlerinin saptanması amacıyla deneye alınmışlardır. c: 3. derecede etkili bulunan *S. andronakii* miktarının yeterli düzeyde bulunmaması sebebiyle; *S. tortuosum*, *B. radians*, *H. platytaenium* ve *P. anisum* yağı ise b: 2. derecede etkili grubu *A. graveolens* yağının (AFB izolatları üzerindeki zon çaplarının hemen hemen aynı olması) temsil ediyor olması nedeniyle deneye alınmamışlardır.

AFB izolatları kullanılarak f:6. derecede etkili *O. onites* yağının MIC değerinin saptanması çalışmalarında 7 farklı konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olmak üzere 126 tüplük bir deney seti hazırlanmış ve kekik yağının MIC değeri 7. konsantrasyon değeri olan 0.078 mg mL⁻¹ olarak saptanmıştır (Çizelge 4. 44.).

AFB izolatları üzerinde e:5. derecede etkili görülen ve kekik yağının içeriğinde bulunan Karvakrol (Sigma) de 7 farklı konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olmak üzere 126 tüplük bir deney seti olarak hazırlanmış ve MIC değerinin gözlemlendiği tüp daha yüksek bir konsantrasyon içeren 6 no'lu tüp olarak tespit edilmiştir. 6. tüpteki karvakrol konsantrasyon değeri 0.156 mg mL⁻¹'dir (Çizelge 4. 44.).

d:4. derece etki göstermiş olan *R. officinalis*'den elde edilen bitkisel yağ örneği için 7 farklı konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olmak üzere 126 tüplük bir deney seti kullanılarak 4. konsantrasyon, diğer bir deyişle 0.625 mg mL^{-1} MIC değeridir (Çizelge 4. 44.).

Etkinlik derecesine göre daha düşük sıralarda bulunan *A. graveolens* yağı (b:2. derece/grup) 5 konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olarak 98 tüp içeren bir deney setinde hazırlanmış, MIC değeri 2. tüpteki 2.5 mg mL^{-1} olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4. 44.).

EFB hastalık etkeni ile yapılan MIC değeri çalışmaları da aynı düzen içinde hazırlanmıştır. Buna göre farklı illerden elde edilmiş olan ve saf kültür haline getirilen 17 adet EFB izolatu, istatistiksel olarak etkinlik derecelerine göre sırasıyla Karvakrol (Sigma) (e:5. derece/grup), *O. onites* (d:4. derece/grup), *B. radians* (c:3. derece/grup) ve *A. graveolens* yağı (b:2. derece/grup)'nın MIC değerlerinin saptanması amacıyla deneye alınmışlardır. c:3. derecede etkili bulunan *S. andronakii* miktarının yeterli düzeyde bulunmaması ve *B. radians* ile aynı grupta yer alması (EFB izolatları üzerindeki zon çaplarının hemen hemen aynı olması) nedeniyle deneye alınmamışlardır.

EFB üzerinde etkinlik gösteren bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları çizelgeler halinde özetlenmiştir (Çizelge 4. 45.).

Etkinlik derecesi sıralamasına göre EFB izolatları üzerinde en yüksek antibakteriyel etki performansı gösteren Karvakrol (Sigma) (e:5.derece/grup), 7 konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olmak üzere 153 adet farklı konsantrasyondaki tüple çalışılmış, MIC değeri 6 no'lu tüp konsantrasyonunda 0.156 mg mL^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 45.).

O. onites yağının EFB izolatları üzerindeki etki performans derecesine göre (d:4. derece/grup) MIC değeri çalışması da 7 farklı konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol şeklinde 153 tüplük deney setiyle hazırlanmış, MIC değeri yine 6. tüpteki 0.156 mg mL^{-1} olarak saptanmıştır (Çizelge 4. 45.).

c: 3. derecede etkili olarak belirlenen *B. radians*'a ait bitkisel yağ örneği de 7 konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol şeklinde 153 adet tüple çalışılmış, MIC değeri 3. tüpte 1.25 mg mL^{-1} konsantrasyonunda saptanmıştır (Çizelge 4. 45.).

EFB izolatları üzerinde hemen hemen en az etkiye sahip *A. graveolens* yağı (b:2. derece/ grup), 5 farklı konsantrasyon, 1 pozitif ve 1 negatif kontrol olmak üzere 119 tüp içeren deney seti hazırlanarak çalışılmış ve MIC değeri 2. tüpte 2.5 mg mL^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 45.).

Çizelge 4. 44. AFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları

AFB	BİTKİSEL YAĞLAR (MIC Değerleri, mg mL^{-1})				Standart Negatif Kontrol
<i>Paenibacillus larvae</i>	f:6	e:5	d:4	b:2	MIC Değeri mg mL^{-1}
	<i>O. onites</i>	*Karvakrol (sigma)	<i>R. officinalis</i>	<i>A. graveolens</i>	erythromycin fosfat
	0.078	0.156	0.625	2.5	2

*: Karvakrol *O. onites*'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

Çizelge 4. 45. EFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan bitkisel yağlar ve MIC değeri bulguları

EFB	BİTKİSEL YAĞLAR (MIC Değerleri, mg mL^{-1})				Standart Negatif Kontrol
<i>Melissococcus pluton</i>	e:5	d:4	c:3	b:2	MIC Değeri mg mL^{-1}
	*Karvakrol (sigma)	<i>O. onites</i>	<i>B. radians</i>	<i>A. graveolens</i>	oxytetracycline (terramycin)
	0.156	0.156	1.25	2.5	4

*: Karvakrol *O. onites*'in en büyük yağ bileşeni olup, kontrol amacıyla kimyasal olarak formüle edilmiş şekli (Sigma) kullanılmıştır.

4. 7. Sentetik Antibiyotikler ve Bazı Bitkisel Yağların AFB ve EFB Hastalık Etkenleri Üzerindeki Antibakteriyel Etki Performanslarının İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Bal arılarında sıklıkla görülen ve ciddi kayıplara neden olan Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) ve Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) hastalık etkenlerinin, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki birçok ilden elde edilmiş olan izolatları üzerinde sentetik antibiyotiklerin ve bazı bitkisel yağların antibakteriyel etki performansları ve MIC değerleri şimdiye dek yapılan deneylerle belirlenmiştir. Bu çalışmaların ardından, elde edilen sonuçlar sentetik antibiyotiklerle bitkisel yağların antibakteriyel etkilerini istatistiksel olarak da karşılaştırma imkanını sağlamıştır. Hem AFB hem de EFB hastalık etkenlerinin tüm izolatları üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları incelenmiş ve veri tabloları T-Testine tabi tutulmuştur (Sokal and Rholf, 1995).

AFB hastalığına ait elde edilmiş olan bulgular, sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağlar açısından karşılaştırıldığında, deneye alınan sentetik antibiyotiklerin oluşturdukları inhibisyon zon çapları açısından bitkisel yağlardan daha etkin oldukları göze çarpmaktadır (sent. ant. ort. zon çapı: 18.34 mm; bitk. yağ ort. zon çapı: 10.36 mm). Yapılan istatistiki değerlendirmeye (T-Testi) ilişkin bulgular Çizelge 4. 46'da özetlenmiştir.

EFB hastalığına ait elde edilmiş olan bulgular sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağlar açısından karşılaştırıldığında da deneye alınan sentetik antibiyotiklerin oluşturdukları inhibisyon zon çapları açısından bitkisel yağlardan daha etkin oldukları göze çarpmaktadır (sent. ant. ort. zon çapı: 18.04 mm; bitk. yağ ort. zon çapı: 13.57 mm). Yapılan istatistiki değerlendirmeye (T-Testi) ilişkin bulgular Çizelge 4. 47'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 46. AFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan sentetik antibiyotikler ve bazı bitkisel yağların antibakteriyel etki performanslarına ilişkin T-testi sonuçları

Antibakteriyel Etki	Ortalama (Standart Sapma)	t	P
Sentetik Antibiyotikler	18.34 (13.11)	- 8.49	0.000*
Bitkisel Yağlar	10.36 (9.59)		

* $P \leq 0.05$ önemlidir.

Çizelge 4. 47. EFB hastalık etkeni üzerinde antibakteriyel etki göstermiş olan sentetik antibiyotikler ve bazı bitkisel yağların antibakteriyel etki performanslarına ilişkin T-testi sonuçları

Antibakteriyel Etki	Ortalama (Standart Sapma)	t	P
Sentetik Antibiyotikler	18.04 (7.96)	- 7.44	0.000*
Bitkisel Yağlar	13.57 (9.22)		

* $P \leq 0.05$ önemlidir.

4. 8. Türkiye'nin Farklı İllerinden Elde Edilen AFB ve EFB İzolatlarının Sentetik Antibiyotikler ve Bitkisel Yağlara Karşı Göstermiş Oldukları Direnç Farklılıklarının Karşılaştırılması

Sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağlarla ilgili tüm antibiyogram testleri ve MIC değeri bulguları, AFB ve EFB hastalık etkenlerinin Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 14 ilde toplanan 98 adet petek örneğinden 6 il kapsamında pozitif tanı konularak saf kültür haline getirilen izolatları üzerinde ayrı ayrı denenmiştir. Bu denemelerde farklı izolatların kullanılma amaçlarından biri de iller bazında izolatlar arasındaki direnç ya da duyarlılık tepkisini ve bu tepkiler arasındaki farklılıkları ölçmek olmuştur. Sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağ antibiyogram testlerinden elde edilen inhibisyon zon çapı değerleri, izolatlar arasında hem AFB hem de EFB için tek tek analiz edilmiş ve istatistiksel bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

İstatistiksel analizlerde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan testleri kullanılmıştır (Sokal and Rohlf, 1995).

AFB hastalık etkeninin Türkiye'den elde edilen izolatları üzerindeki sentetik ve bitkisel antibakteriyel etkinin varyans dağılımı normal görünümündedir. Ancak Duncan testi sonuçlarına göre, izolatlar arasında antibakteriyel etkiye cevap yönünden istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır. Diğer bir deyişle, direnç/duyarlılık tüm illerde hemen hemen aynıdır ve oluşan inhibisyon zon çapları birbirine yakın değerlerdedir. AFB'ye ilişkin tanımlayıcı istatistiki bulgular ve analiz sonuçları Çizelge 4. 48; Çizelge 4. 49. ve Çizelge 4. 50.'da özetlenmiştir.

Çizelge 4. 48. AFB hastalık etkeninin farklı illerden elde edilen izolatlarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular

İL TRAFİK KODLARI	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon Çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
06	,00	32,00	13,0784	8,9590	1,2545
07	,00	62,00	12,5539	12,0336	,9729
24	,00	48,00	11,8725	9,1901	,9100
48	,00	54,00	13,4724	10,6514	,6670
52	,00	56,00	13,7941	16,2941	1,6134
61	,00	46,00	15,0833	10,3303	1,4465

Çizelge 4. 49. AFB izolatlarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	479,880	5	95,976	,711	,615*
Grup İçi	95522,114	708	134,918		

* P≤ 0.05 önemlidir. SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi
MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 50. AFB izolatları arasındaki farkın karşılaştırılmasına ilişkin Duncan testi sonuçları

	İL TRAFİK KODU	Ortalama İnhibisyon Çapı-mm* (Standart Sapma)
Duncan	24	13,0784 (8,9590) ^a
	07	12,5539 (12,0336) ^a
	06	11,8725 (9,1901) ^a
	48	13,4724 (10,6514) ^a
	52	13,7941 (16,2941) ^a
	61	15,0833 (10,3303) ^a

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar, istatistiksel olarak aynı gruptadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

EFB hastalık etkeninin de Türkiye'den elde edilen izolatları üzerindeki sentetik ve bitkisel antibakteriyel etkinin varyans dağılımı normal görünümündedir (Çizelge 4. 51; Çizelge 4. 52.). Ancak varyans dağılımındaki P değeri izolatlar arasında bir farklılığın sözkonusu olduğunu göstermektedir. Bu farklılığın hangi izolat ya da izolatlar arasında olduğu sonucu ise Duncan testi uygulamasıyla elde edilmiştir. Duncan testi sonuçlarına göre, izolatlar arasında antibakteriyel etkiye cevap

yönünden en duyarlı izolat grubu Muğla (48) iline ait olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 53.). Diğer illerin EFB izolatları arasında her ne kadar belirgin bir farklılık bulunmayıp aynı grupta yer almış olsalar da değerler incelendiğinde Edirne (22) örneklerinin de çok az bir farkla diğer illere göre daha fazla dirençlilik gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4. 53.).

Çizelge 4. 51. EFB hastalık etkeninin farklı illerden elde edilen izolatlarına ait tanımlayıcı istatistiki bulgular

İL TRAFİK KODLARI	Minimum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Maximum Değer (İnhibisyon Çapı-mm)	Ortalama İnhibisyon Çapı (mm)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
07	,00	39,00	13,7770	8,0383	,5628
22	,00	32,00	11,6569	8,8688	1,2419
24	6,00	34,00	14,3627	7,8626	1,1010
37	,00	40,00	13,9792	10,7713	1,5547
48	,00	46,00	16,2152	9,2413	,4100

Çizelge 4. 52. EFB izolatlarına ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları

	SS (KT)	DF	MS (KO)	F	P
Gruplar Arası	1680,445	4	420,111	5,226	,000*
Grup İçi	68892,038	857	80,387		

* P≤ 0.05 önemlidir. SS: Kareler toplamı DF: Serbestlik derecesi
MS: Kareler ortalaması

Çizelge 4. 53. EFB izolatları arasındaki farkın karşılaştırılmasına ilişkin Duncan testi sonuçları

	İL TRAFİK KODU	Ortalama İnhibisyon Çapı- mm* (Standart Sapma)
Duncan	22	11,6569(8,8688) ^a
	07	13,7770(8,0383) ^a
	37	13,9792(10,7713) ^a
	24	14,3627(7,8626) ^a
	48	16,2152(9,2413) ^b

*: Aynı harfi taşıyan ortalamalar, istatistiksel olarak aynı gruptadır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

5. TARTIŞMA

Bal arısı hastalıklarının arıcılık sektörünü büyük zarara uğrattığı ve bu alanda en çok önem verilen başlıca konu olduğu artık bilinen bir gerçektir (Alippi, 1997; Erickson et al., 1999; Fries and Camazine, 2001; Govan et al., 2002; Özkırım and Keskin, 2002; Doughty et al., 2004; Kochansky and Pettis 2005). Özellikle çok hızlı dağılım gösteren bakteriyel hastalıkların yayılımı, bulaşımı, teşhis yöntemleri ve tedavisi üzerinde durulmakta, aynı zamanda da bal arılarının en değerli ürünü olan balın kirlenmesi engellenmeye çalışılmaktadır (Djordjevic et al., 1999; Frow and Delacan, 1999; Elzen et al., 2002; Elzen et al., 2003; Hansen et al., 2003; Feldlaufer et al., 2004). Uzun yıllar boyunca bal arılarının iki önemli bakteriyel hastalığı olan Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) ve Avrupa Yavru Çürüklüğü (EFB) tedavisinde değişik sentetik antibiyotikler denenmiş, hatta bazıları uygulamaya aktarılmıştır (Gochnauer, 1981; Morse and Hooper, 1985; Peng et al., 1992; Peng et al., 1996; Nakajima et al., 1997; Nakajima et al., 1998; Peng et al., 1998; Peng et al., 1999; Piccini and Zunino, 2001; Thompson and Brown, 2001; Alippi et al., 2001; Doughty et al., 2004). Ancak zamanla kullanılmakta olan antibiyotiklerin arıda ve diğer arı ürünlerinde kalıntı bırakması, arıcılıkta yeni bir problem olarak kendini göstermiştir (Alippi, 1997; Erickson et al., 1999; Kochansky, 2000; Kochansky et al., 2001; Elzen et al., 2003; Feldlaufer et al., 2004; Kochansky and Pettis, 2005; Lodesani and Costa, 2005). Varolan bu yeni problem karşısında çalışmalar, arı ve arı ürünlerinde kalıntı bırakmayan, uçucu özellikte olup, kovan içi huzursuzluğa neden olmayan, etki süresi uzun yeni etken madde arayışlarına yönelmiştir. Bu amaçla bitkilerden elde edilen antiseptik etkiye sahip uçucu yağların, bal arısı bakteriyel hastalık etkenleri üzerindeki antibakteriyel etki performansları test edilmeye başlanmıştır (Alippi et al., 1999; Hammer et al., 1999; Padin et al., 2000; Hornitzky and White, 2001; Waite et al., 2003; Albo et al., 2003; Lodesani and Costa, 2005). Uçucu bitkisel yağların içerdikleri fenolik bileşikler ve alkaloidler nedeniyle yüksek antioksidan ve antibakteriyel etki sahip oldukları çeşitli çalışmalarla da rapor edilmiştir (Larson, 1998 ; Rice-Evans et al., 1999). Bu bakımdan Türkiye floral zenginliği ile arıcılık açısından çok değerli bir kaynak durumundadır. Ülkemizde bitkisel yağlarla ilgili hemen hemen her alanda çalışma yapılmış, içerikleri saptanmış ve birçok farklı bakteri türü üzerinde etkinlikleri ispatlanmıştır (Bisset et al., 1977 ; Guinaudeau et al., 1984 ; Başer and Ertan,

1990 ; Aydın et al., 1994 ; Aydın et al., 1996 ; Rahman et al., 1998 ; Başer et al., 1999 (a) ; Başer et al., 1999 (b) ; Demirci et al., 2000 ; Demirci et al., 2001 ; Demirci et al., 2002 ; Zeytinoğlu et al., 2003 ; Tunalier et al., 2004 ; Demirci et al., 2005 ; van Vuuren et al., 2006 ; Demirci et al., 2006 ; Tosun et al., 2006). Ancak, bakteriyel arı hastalıkları üzerindeki etkinlikleri konusunda yapılmış hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Çeşitli amaçlarla denenen bitkisel yağların antibakteriyel özelliklerinin, bal arısı hastalıklarından AFB ve EFB üzerinde de saptanmasının ve etkinlik derecelerinin sentetik antibiyotiklerle karşılaştırmalı olarak belirlenmesinin, ülkemiz arıcılığının gelişimi açısından çok önemli bir aşama olduğu düşünülmektedir.

Bu amaçla yapılan çalışmada, elde edilen bulgular ışığında ulaşılabilen sonuçları birkaç grupta incelemek mümkün olacaktır. Buna göre ilk grubu, deneye alınmış olan farklı etkiye sahip 6 adet sentetik antibiyotiğin AFB ve EFB hastalık etkenlerinin izolatları üzerindeki antibakteriyel etki performanslarına ait sonuçlar oluşturmaktadır.

Sonuçlar incelendiğinde hem her iki hastalık etkeninin farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip olması, hem de *Paenibacillus larvae*'nin spor oluşturmak suretiyle antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, iki hastalığın antibiyogram değerlerinde gözle görülür bazı farklılıkların doğmasına sebep olmuştur. Ancak, bu arada Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı etkeninin deneyler sırasında vejetatif formda tutulduğu ve antibiyogramın taze besiyerinden alınmış mikroorganizma üzerinde yapıldığı unutulmamalıdır. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda inkübasyon süresi uzatılıp spor formun oluşumuna izin verildikten sonra yapılan antibiyogramlarda herhangi bir antibiyotik etki gözlenmemiştir (Miyagi et al., 2000; Elzen et al., 2002; Feldlaufer et al., 2004; Kochansky ve Pettis, 2005). Yine de bazı izolatlarda hiçbir zon oluşmaması, sporlanmaya geçiş sürecinin çok kısa olması ya da vejetatif form üzerinde kullanılan antibiyotiğin etkisiz olması şeklinde yorumlanabilir.

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB) hastalık etkenleri üzerinde antibiyotiklerin etki yüzdelerine ve istatistiki değerlendirmelerine topluca bakıldığında, etki derecelerine göre farklı 3 grup olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4. 3.; Çizelge 4.

22). Oluşan grupların aynı zamanda içerdikleri antibiyotiklerin etki mekanizmalarıyla paralellik göstermesi de etki derecelendirmesinin deney sonuçlarını yönlendirmesine çok güzel bir örnek teşkil etmektedir. Şöyle ki; AFB hastalık etkeninin 14 farklı izolatına karşı en etkili grubu rifampin (RA), sulbactam-ampicillin (SAM) ve amoxycillin-clavulanic asid (AMC) antibiyotikleri oluşturmuştur. Bunlar arasında RA bakteride nükleik asit sentezi aşamasında inhibisyon meydana getirdiğinden, bakterinin, genetik materyalini kopyalayamadan üremesi engellenmektedir (Kochansky and Pettis, 2005). Dolayısıyla en etkin inhibisyonun RA'da gözlenmesi doğal karşılanmaktadır (Çizelge 4. 19.). Çünkü bakteri daha üreme ve gelişiminin başlangıç aşamasında durdurulmakta ve varlığına izin verilmemektedir. Yalnız antibiyotiğin renkli (turuncu) olması, ürünü bal gibi bir gıda maddesi olan arı üzerinde kullanılmasını pratikte mümkün kılmamaktadır (Varaldo et al., 1985; Gharaibeh et al., 1998). Diğer yandan rifampinin tüberküloz tedavisi hariç, insan üzerinde direkt ya da indirekt etkili olabilecek bir alanda tedavi amaçlı kullanılması da sakıncalıdır (Kochansky et al., 2001; Kochansky and Pettis, 2005).

Etki derecesi açısından aynı grupta yer alan amoxycillin-clavulanic acid (AMC) ve sulbactam-ampicillin (SAM) ise antibakteriyel özelliklerini hücre duvarı sentezinin inhibisyonu ile göstermektedirler (NCCLS, 1997). Bir bakteri açısından bölünme sırasında en büyük önem taşıyan ikinci olay ise hücre duvarı sentezinin başlaması ve başarıyla sona erdirilmesidir (Madigan and Martinko, 2006). AMC ve SAM gibi hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklerin de yüksek antibakteriyel etki gösterebilmesi bu şekilde açıklanabilir. Zonlar üzerinde görülen sekonder üremelerin de, inkübasyonun sonlarına doğru, antibiyotiğin etkisinin azalmasıyla birkaç koloninin fırsattan istifade ederek bölünmelerini tamamlayabilmeleri sonucu olduğu şeklinde yorumlanabilir. Başka mikroorganizmalar (*Staphylococcus ssp.*, *Bacillus ssp.*, *Acinetobacter baumannii vb.*) üzerinde yapılan diğer çalışmalarda da bu tip sekonder üremelerle karşı karşıya kalınmış ve sonuçlar benzer şekilde yorumlanmıştır (Ko et al., 2004; Melichar et al., 2005). AMC ve SAM gibi antibiyotikler tarafından üremenin hücre duvarı sentezi döneminde engellenmesi, AFB hastalık etkeni olan *P. larvae* üzerinde her iki antibiyotiğin de yüksek antibakteriyel etki performansına sahip olmasına neden olacaktır. Bu nedenle AFB hastalık etkeni açısından RA, AMC ve SAM'ın en etkin grubu oluşturması

beklenen bir sonuç olmuştur (Varaldo et al., 1985; Gharaibeh et al., 1998; Ko et al., 2004; Melichar et al., 2005; Dollman et al., 2005).

Etki sıralamasına göre bu üç antibiyotiğin ardından gelen erythromycin fosfatın protein sentezi inhibisyonu göstermesi, daha çok bakteriostatik etkisini ön plana çıkarmaktadır (Williams, 2000; Alippi et al, 2001; Doughty et al., 2004). Bu nedenle hem antibiyotiğe karşı oldukça hızlı bir şekilde direnç oluşmakta, hem de kendisinden daha etkili birçok antibiyotik bulunabilmektedir (Thompson ve Brown, 2001; Kochansky ve Pettis, 2005). AFB üzerinde de ikincil derecedeki etkisinin, üremenin en önemli aşamalarının tamamlanması nedeniyle sporlanma mekanizmasının hemen devreye girdiği ve antibiyotiğin etkisinin görülme olasılığını ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Nitekim, Arjantin'deki farklı bölgelerden elde edilen AFB izolatları üzerinde tylosin ve oxytetracyclinele karşılaştırmalı olarak yapılmış olan erythromycin fosfat denemelerinde de düşük antibakteriyel etki gözlendiği rapor edilmiştir (Alippi et al., 2001).

Düşük yüzdelik etkiye sahip Azithromycin (AZM) de protein sentezini engelleyerek etkili olan başka bir antibiyotiktir (Holmes, 2005). Deneylerde ER'den daha küçük inhibisyon zonları oluşturmaya karşın, aralarında çok büyük bir etki farkı olduğu düşünülmemektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde de AZM ve ER hem EFB hastalık etkeni üzerindeki etkisi bakımından aynı grupta yer alırken (Çizelge 4. 25.), AFB hastalık etkeni üzerinde ise çok az bir farkla ER'den daha düşük düzeyde etkiye sahip olarak görülmektedir (Çizelge 4. 22). Elde edilen birbirine yakın zon çaplarının her iki antibiyotiğin de etki mekanizmasının benzer şekilde (protein sentezi aşamasında) meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deneylerde AFB hastalığı açısından en az etkiye sahip grupta yer alan ve en düşük yüzdelik aktiviteye sahip olan tobramycin (TOB), genel bilgi kısmında da açıklandığı üzere çoğunlukla Gram(-) bakteriler üzerinde etkilidir. Ancak nadir de olsa Gram(+) bakteriler de duyarlılık göstermektedir (NCCLS, 1997; Melichar et al., 2005). Bu nedenle etkisinin düşük oranda çıkması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca AFB üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada da diğer bazı sentetik antibiyotiklere kıyasla çok düşük etki göstermiş olduğu

belirtlmifltir (Kochansky and Pettis, 2005). TOB alışmamızda da, AFB hastalık etkeni üzerindeki etki performansları sıralamasında Duncan testi sonuçlarına göre AZM ve ER gibi kendisiyle aynı etki mekanizmasına sahip, diğeri bir deyişle bakterilerde protein sentezini inhibe eden bir antibiyotik olmasına rağmen en düşük inhibisyon zon çapı ortalamasına sahip bir antibiyotik olarak gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin, AZM ve ER ribozomal alt birimlere bağlanarak etki gösterirken, TOB başlangıç, prematür proteinin sonlanması ve uygun olmayan aminoasidin inkorporasyonu olmak üzere üç aşamada etki gösterebilmesi olduğu düşünülmektedir; ayrıca lipopolisakkarit tabakada erime özelliği göstermektedir (NCCLS, 1997; Kochansky et al., 2001; Kochansky and Pettis, 2005). Daha kalın bir mrein tabakaya sahip Gram (+) bir bakterinin hücre duvarından geçmesi de aynı oranda zor olacaktır. Böylelikle, hücre içine tam başarıyla ulaşamayan ve protein sentezinin ara basamaklarında inhibisyon meydana getiren TOB'un yüksek antibakteriyel etkisinden söz etmek mümkün olmamıştır.

Sentetik antibiyotiklerin Avrupa Yavru rklğ (EFB) izolatları üzerindeki antibakteriyel etki performanslarının yüzdelik oranları ve istatistiksel değerlendirmeleri incelendiğinde de (şekil 4. 4.; izelge 4. 25.) TOB'un en düşük etki derecesine sahip olduğu açıkça gözlemlenebilmektedir. Bu sonuç, antibiyograma tabi tutulan hastalık etkeni bakterinin sporlanma özelliğine gerek kalmaksızın, TOB'un antibakteriyel özelliğinden aynı derecede etkilenmekte olduğunu göstermektedir. Başka bir deyişle, her iki hastalık etkeni üzerinde de (AFB ve EFB) antibiyotiğin etki derecesinin düşük olmasının, sporlanma özelliğinin bakterinin dayanıklılığını arttırmasıyla ilişkili olmadığını; daha hücreye taşınma aşamasında Gram özelliğini oluşturan hücre duvarı yapı farklılığı nedeniyle Gram (+) bakteriler üzerinde etkili olamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deneye alınan diğeri 5 antibiyotiğin etki performanslarının EFB izolatları üzerinde TOB'dan daha yüksek, ancak birbirine yakın sonuçlar vermesi ve istatistiksel olarak da aynı grupta yer alması ise yukarıdaki yorumun aksine sporlanma sürecinin varlığına bağlanabilmektedir. İki hastalık etkeni bakteriden biri olan *P. larvae* spor oluşturabilmesi nedeniyle üremenin başlangıç aşamalarında etkili olan nükleik asit ve hücre duvarı sentezi üzerine etkili antibiyotiklerce daha kolay inhibe edilmekte, ancak spor oluşturarak protein sentezi inhibisyonuna neden olan

antibiyotiklere karşı diğerlerine oranla, daha dirençli hale gelebilmektedir. Oysa ki, EFB hastalık etkeni *M. pluton* gibi yaşamının tüm evrelerini vejetatif formda geçiren bir bakteri için nükleik asit, hücre duvarı ve protein sentezi aşamaları birbirini izleyen ve hayati önem taşıyan aşamalardır. Bu nedenle, zincirin herhangi bir yerde kesintiye uğraması hemen hemen aynı oranda etkili olacaktır. Antibiyotikler arasındaki etki mekanizması farklılığının *M. pluton* üzerinde antibakteriyel etkinin hızı ve bakteriostatik ya da bakterisid olması ile ilişkilendirilebilir (Djordjevic et al., 1999; Williams, 2000; Thompson and Brown, 2001; Waite et al., 2003;

Çalışmada antibakteriyel etki açısından sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceği düşünülen ve bu amaçla antibiyogram testine tabi tutulan 11 adet bitkisel yağın AFB ve EFB hastalık etkenlerinin tüm izolatları üzerindeki etki derecelendirmesi de incelendiğinde birtakım benzer ve farklı sonuçlara ulaşıldığı gözlemlenmiştir.

Bitkisel yağların nasıl bir etki mekanizmasıyla bakteri üremesini inhibe ettiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmadığından, etki dereceleri ile etki mekanizmalarını ilişkilendirmek mümkün olmamaktadır. Ancak, hangi mekanizmayla olursa olsun sporlanma sürecine bağlı olmaksızın her iki hastalık etkeni üzerinde de (AFB ve EFB) *Origanum onites* –kekik yağı ve içerik grubunun (Karvakrol-Sigma) gözle görülür bir antibakteriyel etkisi sözkonusudur. Tek farklılık AFB’de en etkin yağın *O. onites*’e ait olması; EFB’de ise en etkin antibakteriyel etkinin, kekik yağının %70’lik kısmını oluşturan ve en büyük bileşeni kabul edilen karvakrolün kimyasal yapısı (formülizasyonu) tarafından oluşturulmasıdır (Çizelge 4. 40.; Çizelge 4. 43).

Teorik olarak, kekik yağı içeriğinin büyük bölümünü oluşturan karvakrol ile yağın kendisi arasında böyle bir farklılığın oluşmaması beklenmektedir. Fakat deney sonuçlarının aksi yönde gözlemlenmesi, kekik yağının %30’unu meydana getiren diğer bileşenleri ile karvakrol arasında, AFB açısından antibakteriyel etkisini artırıcı yani sinerjik bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Bazı *O. onites* bitkisel yağı çalışmalarında da karvakrol ve diğer bileşenler arasında böyle bir sinerjizmden bahsedilmektedir(Aydın et al., 1996; Başer, 1999; Duman, 2000). Yalnız bu sinerjik etkinin, bakterinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle de

ilişkili olduğu kabul edilebilir. Çünkü *O. onites*- kekik yağı ve karvakrol EFB hastalık etkeni üzerinde farklı bir sonuç vermiştir. EFB'de karvakrolün kimyasal formülünün etki derecesi kekik yağına göre daha yüksek çıkmıştır. Bu durum, EFB izolatları üzerinde kekik yağının antibakteriyel performansının oluşması sürecinde ağırlıklı etkisinin karvakrol tarafından meydana getirildiği, ancak bakterinin AFB izolatları gibi biyokimyasal ve morfolojik açıdan farklı olması durumunda belli bir inkübasyon sürecinde sinerjik etkileşimin başlayarak, kekik yağının diğer bileşenleriyle daha etkili hale dönüşebildiği şeklinde yorumlanabilir. Ortam koşullarına daha dayanıksız ve patojen özellik göstermektense, yaşadığı canlı üzerinde parazitik etki göstererek sadece canlının besinine ortak olabilen *M. pluton* için, sinerjizme gerek duyulmaksızın, büyük orandaki karvakrolün etkisiyle bakteri üremesinin inhibe edilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Antibakteriyel etki performanslarına göre bitkisel yağların derecelendirilmesinde *O. onites*-kekik yağı ve karvakrolün ardından gelen bitkisel yağ örnekleri farklı bitkilere aittir. Çizelge 4. 44. ve Çizelge 4. 45. incelendiğinde etkili bulunan bitkisel yağ gruplarının hemen hemen aynı bitkilerden oluştuğu, yalnız ortalama etki derecesinde AFB'de *R. officinalis*- biberiye yağı (d:4. derece), EFB'de ise *B. radians*- kişniş otu yağının (c:3. derece) etkin rol oynadığı gözlemlenmektedir. O halde her iki hastalık etkeni üzerinde bu iki bitkinin farklı etkilerinin olabileceği yorumu akla gelmektedir. Örneğin *R. officinalis*-biberiye yağı AFB için oldukça etkili bir grupta (d:4.derece) yer alırken, EFB için etki düzeyi en düşük olan (a:1. derece) grupta bulunmaktadır. Aynı şekilde *B. radians*-kişniş otu yağı da AFB üzerinde b:2. derecede etkili bulunan yağlar arasında yer almaktadır. Bu durumun yağların bileşenlerine ait özellik farklarından kaynaklanmakta olabileceği gibi, etkili oldukları bakterilerin fizyolojik, biyokimyasal ve spor oluşturma özelliklerine bağlı olarak da değişebileceği düşünülmektedir. Örneğin *B. radians*-kişniş otu yağının uçucu yağ bileşenlerinin en yüksek oranda bulunan maddesi % 52.9 oranıyla (E)-2-Tridekenal iken, *R. officinalis*-biberiye yağının en etkin bileşeni % 46.9 oranıyla 1, 8 sineol'dür. Etken maddelerin moleküler yapı farklılıkları antioksidan ve antibakteriyel özelliklerini tamamen değiştirebilmektedir (Larson, 1998 ; Rice-Evans et al., 1999; Başer, 1999; Demirci et al., 2001; Demirci et al., 2002). Diğer yandan bu sonucun, yağın hücre içine alınmasındaki farklılıklar ve/veya yağı

oluşturan bileşenlerin moleküler yapıları ve büyüklüklerinden ileri gelebileceği de düşünülebilir.

AFB ve EFB hastalık etkenleri üzerinde aynı derecede etkili bulunan *Anethum graveolens* –dereotu yağı, uçucu yağ oranının fazla olması ve çiçeğin tomurcuklanma döneminde kolaylıkla ve bol miktarda elde edilmesi (Kürkçüoğlu et al., 2003) etkinliğinin kısa sürede kendisini göstermesi açısından uygulama kolaylığı ile kekik yağından sonra tercih edilebilecek en elverişli yağ olarak önerilebilir.

AFB hastalık etkeni üzerindeki istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre etki derecelendirmesi doğrultusunda 6 farklı gruptan (Çizelge 4. 40) en az etkiye sahip ilk iki grubun (a:1. derece ve b:2. derece) birden fazla üyesi olmasına rağmen (*S. petraeum* ve *S. resinosum*, a:1. derece; *Seseli tortuosum*, *Bifora radians*- kişniş otu yağı, *Anethum graveolens* -dereotu yağı, *Heracleum platytenium*-tavşancıl otu yağı, *Pimpinella anisum*-anason yağı, b:2. derece), etki derecesinin artmasıyla oluşan diğer gruplar hem birer üye içermekte, hem de aralarındaki farklılık daha fazla göze çarpmaktadır.

EFB'de ise etki derecelendirmesi 5 grupta toplanmış ve 1. grubu *S. petraeum*, *S. resinosum*, *S. tortuosum*, *H. platytaenium*-tavşancıl otu yağı, *P. anisum*-anason yağı, *R. officinalis*- biberiye yağı oluştururken, b:2.derecede yalnızca *A. graveolens* -dereotu yağı yer almaktadır (Çizelge 4. 43.). Kolaylıkla farkedileceği gibi *Seseli* cinsine ait türlerden elde edilmiş olan bitkisel yağ örneklerinden hem AFB hem de EFB açısından istenilen düzeyde bir antibakteriyel etki performansı elde edilememiştir. Bu cinse ait 4 adet türden yalnızca *S. andronakii* her iki hastalık etkeni üzerinde de c:3. derecede etkili bulunmuş, diğer 3 tür ise hemen hemen hiç etki göstermemiştir. Böylelikle, aynı cinse ait farklı türlerin, antibakteriyel etki yönünden farklı sonuçlar verebileceği de gözlemlenebilmiştir (Başer et al., 1999; Tunalıer et al., 2004; Tosun et al., 2006). Ancak, *Seseli andronakii*'ye ait uçucu yağ miktarının az olması çalışmalarda ve pratikte uygulama kolaylığını ortadan kaldırmaktadır (Tosun et al.,2006).

Bal arılarında görülen yavru çürüklüğü hastalıkları üzerinde en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olan ilk 4 grubu temsil eden bitki türlerinden elde edilen yağ örnekleriyle yapılan MIC testleri sonuçları incelendiğinde, yüksek antibakteriyel etki gösteren yağ örneğinin en düşük MIC değerine sahip olduğu ve antibakteriyel etki azaldıkça MIC değerinin yükselmekte olduğu dikkat çekmiştir(Çizelge 4. 44.; Çizelge 4. 45.). Ancak, düşünülecek olursa, etken olan bakteri üzerinde çok geniş bir inhibisyon çapı oluşturabilen antibiyotik etkili bir bitkisel yağın çok az miktarının bile bakteri üremesini inhibe etmesi beklenen bir sonuçtur.

Aynı hastalık etkeninin farklı izolatları arasında da aynı antibiyotiğe karşı değişik sonuçlar elde edilmiş; bu durum Türkiye'nin farklı bölgelerine ait izolatlarda iklim şartları ve coğrafik koşullar, bulundukları arı ırkı gibi değişkenler nedeniyle dirençli ya da duyarlı suşlar oluşabileceği yorumunu akla getirmiştir. Dünya üzerinde farklı bölgeleri kapsayan çalışmaların bir bölümünü de coğrafik yapı ile antibiyotik kullanım şekli ve doz farklılıkları nedeniyle oluşan, AFB ya da EFB izolatlarının duyarlılık-dirençlilik oluşumunun belirlenmesi oluşturmaktadır(Miyagi et al., 2000; Kochansky et al., 2001; Elzen et al., 2003; Waite et al., 2003; Koenig, 2004; Böylelikle yapılmakta olan çalışmanın başka bir sonucu Amerikan ve Avrupa Yavru Çürüklüğü'nün farklı direnç kapasitelerine sahip, bölgesel suşlara sahip olduğu fikrinin şekillenmeye başlaması olabilecektir. Tüm izolatlar üzerinde, bütün antibiyotiklerin zon çapları ölçülüp değerlendirildikten sonra bölgesel farklılıkların da bu açıdan yorumlanabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan istatistiki değerlendirmelerde, AFB izolatları arasında sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağların antibakteriyel etkilerine gösterilen tepki açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4. 50.). Bunun nedeni olarak, AFB tedavisinde ülkemizde halen kullanılmakta olan herhangi bir antibiyotiğin bulunmaması ve kolonilerin yakılarak ortadan kaldırılması; dolayısıyla antibiyotiğe bağlı bölgesel bir direncin varlığının sözkonusu olmaması ileri sürülebilir.

EFB hastalığının farklı illere ait izolatlarının sentetik antibiyotikler ve bitkisel yağlara karşı gösterdiği direnç/duyarlılık tepkisi karşılaştırıldığında ise (Çizelge 4. 53.), Muğla (48) iline ait izolatların, deneye alınan tüm etkenlere (sentetik antibiyotik ve bitkisel yağlar) daha fazla duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Diğer

illere ait izolatlar aynı grupta yer almış olsalar da kaydedilen değerler doğrultusunda çok az bir farkla Edirne (22) iline ait izolatların da biraz daha fazla direnç gösterdikleri saptanmıştır.

Bal arılarındaki EFB hastalığı açısından farklı illerden elde edilen izolatlar arasındaki bu farklılığın, EFB'nin tedavisinde ülkemizde halen resmi ya da resmi olmayan şekillerde (illegal) çeşitli birçok antibiyotiğin, muhtelif dozlarda kullanılıyor olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Buna göre coğrafik ve ırksal farklılıklara göre direnç oluşumu meydana gelecek, dolayısıyla tedaviye yönelik ilaçlar da etkinliğini yitirmeye başlayacaktır. Muğla (48) ve Edirne (22) izolatları arasındaki inhibisyon zon çapı farklılığı, Muğla ilinin şimdiye dek EFB tedavisinde daha az oranda antibiyotik kullanımına yöneldiğini ve kullanımdaki çeşitliliği minimum seviyede koruduğunu, Edirne ilinin ise, tedavide uyguladığı stratejinin direnç oluşturma yönünde farklı ve yoğun antibiyotik kullanımı şeklinde olduğunu akla getirmektedir.

Diğer yandan bu farkın başka bir nedeni de, Edirne'de Trakya bal arısı ırkının, Muğla'da ise İtalyan bal arısı ırkının ön planda olması ve ırklar arasındaki bu farklılığın, yavru çürüklüğü hastalıklarına karşı genetik direnç yaratması olabilir. Farklı ırkların, farklı hastalıklara karşı dirençli ya da duyarlı olması da son yıllarda yapılan genetik çalışmalarla rapor edilmektedir (Reynaldi et al., 2003; Suazo et al., 2004; Bachanova et al., 2005).

Çalışmalarda dikkate alınan diğer bir özellik ise, sentetik antibiyotikler ile bitkisel yağların antibakteriyel etki performansları istatistiksel olarak karşılaştırılmasıdır (Çizelge 4. 46.; Çizelge 4. 47.) Her iki hastalık etkeni (AFB ve EFB) üzerinde de sentetik antibiyotiklerin daha etkili inhibisyon zonu oluşturdıkları saptanmıştır. Ancak, antibakteriyel etkinin oluşmasında bitkisel yağın öncelikle besiyerine ve daha sonra bakteriye ulaşma sürecini göz ardı etmemek gerekmektedir. Bu nedenle bitkisel yağların etki süresinin daha yavaş fakat daha uzun süreli olduğu rapor edilmektedir (Başer, 1999).

Bitkisel yağların aynı zamanda uçucu özellikte olmaları ve dolayısıyla arı ürünlerinde (bal, balmumu, polen, propolis, arı sütü vb.) kalıntı bırakmamaları

nedeniyle de tercih nedeni olabilecekleri düşünülmektedir (Hood ve McCreadie, 2001; Nasr et al., 2001; Bailey ve Perry, 2002).

Bal arılarının doğal savunma sistemlerinde yaz boyunca hastalık etkenlerine karşı dayanıklılıklarının artmasıyla, bitkisel yağların tamamen doğa kaynaklı olmaları, ilişkilendirildiğinde, sentetik antibiyotiklere göre bitkisel yağ kullanımı çok daha avantajlıdır (Morse, 1997).

Bitkisel yağların birbirini izleyen çiçeklenme dönemleri geçiren bitkilerden farklı zamanlarda elde edilebiliyor olması da kullanımları sırasında çeşitliliği arttırarak, hastalık etkeni bakterilerin tek bir yağa karşı direnç oluşturmalarını önleyebilecektir.

Uçucu yağların kendilerine has aromaları (kötü kokulu olanlar hariç) kovanda ve balda farklı bir hava ve koku yaratacağından, bal arılarının davranışlarında ve doğaya yönelmelerinde teşvik edici bir durum oluşturabileceği düşünülmektedir. Ancak, antibakteriyel etkisi belirlenmiş ve MIC değeri saptanmış her yağ örneği, arı kolonisi üzerindeki davranış özelliği ve beslenmedeki toksik etkisi bakımından in vivo olarak da denenmelidir.

Bitkisel yağların tüm bu kullanım avantajlarının yanısıra, içeriklerinin ve etki mekanizmalarının tam olarak açığa kavuşmamış olduğu da unutulmamalıdır. Bundan sonraki aşamalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalar, bitkisel yağların kalıntı analizleri, yan etkileri ve ilaç haline getirilme olasılıklarının saptanması üzerinde olmalıdır (Doughty et al., 2004; Lodesani ve Costa, 2005).

KAYNAKLAR

- Albo, G. N., Henning, C., Ringualet, J., Reynaldi, F. J., De Giusti, M. R., Alippi, A. M., 2003, Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees, *Apidologie*, 34, 417-427.
- Alippi, A. M., 1991, A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* L. in Argentina, *Journal of Apicultural Research*, 30(2), 75-80.
- Alippi, A., 1997, Background American foulbrood in Argentina, *Bee World*, 30, 92-95.
- Alippi, A. M., Ringuelet, J. A., Henning, C. P., Bandoni, A., 1999, In vitro evaluation of some essential oils and mixtures for the control of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, the causative agent of AFB, Proc. XXXVI Apimondia Congress, Vancouver, Canada, Bucharest, Apimondia Publ. House, 260.
- Alippi, A. M., Albo, G. N., Leniz, D., Rivera, I., Zanelli, M. L., Roca, A. E., 2001, Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American foulbrood of honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 38(3-4), 14-158.
- Anderson, D. L. and Gibbs, J. A., 1989, Transpuparial transmission of kashmir bee virus and sacbrood virus in the honey bee, *Ann. Appl. Biol.*, 114, 1-7.
- Aydın, S., Öztürk, Y., Arslan, R., Başer, K. H. C., Kurtar-Öztürk, N., 1994, Thyroid hormone enhancing activity of *Juglans regia* L. in mice, *Phytother. Res.*, 8, 308-310.
- Aydın, S., Öztürk, Y., Beis, R., Başer, K. H. C., 1996, Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic cctivity, *Phytother. Res.* , 10, 342-344.
- Bachanova, K., Kludiny, J., Kopernicky, J., Simuth, J., 2005, Identification of honey bee peptide active against *Melissococcus pluton* from different types of genotypic variations, *Apidologie*, 33, 259-269.
- Bailey, L. and Perry, J. N., 2002, The natural control of the tracheal mite of honey bees, *Experimental and Applied Acarology*, 25, 745.749.
- Başer, K. H. C., Ertan, A., 1990, Alkaloids of Anatolian *Thalictrum foetidum*, *Planta Med.*, 56, 337.

- Başer, K. H. C., Demirçakmak, B., Ermin, N., Demirci, F., Boydag, I., 1998, The essential oil of *Bifora radians* Bieb., J. Essent. Oil Res., 10, 451-452.
- Başer, K. H. C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., Yıldız, B., 1999(a), Composition of the essential oils of *Thymus leucostomus* Hausskn. et velen var. *gypsaceus* Jalas and *Thymus pubescens* Boiss. et Kotschy ex celak var. *cratericola* Jalas, J.Essent. Oil Res., 11, 776-778.
- Başer, K. H. C., Özek, T., Tabanca, N., Duman, H., 1999(b), Essential oil of *Pimpinella anisum* Boiss., J. Essent. Oil Res., 11, 445-446.
- Başer, K. H. C., 1999, Essential Oils In Honour of Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer On His 50th Birthday, Kırimer, N. and Mat, A. (eds), Novartis Ürünleri İlaç Sektörü Yayını, ISBN 975-94077-0-1, Eskişehir, 67-68.
- Baytop, T., 1997, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları, 508p.
- Benson, H. J., 1998, Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology, 1- 789 p. 7th Ed., The McGraw-Hill Companies, Inc, USA.
- Bisset, N. G., Başer, K. H. C., Phillipson, J. D., Bohlin, L., Sandberg, F., 1977, Muscle-relaxant activity in Asian *Strychnos* Species. A re-examination of two western Malaysian dart poisons, J. Nat Prod., 40 (6), 546-560.
- De Guzman, L. I., Rinderer, T. E., Delatte, G. T., Stelzer, J. A., Beaman, L., Harper, C., 2001, An evaluation of far-eastern Russian honey bees and other methods for the control of *Varroa destructor*, American Bee Journal, 141, 737-741.
- Demirci, F., Işcan, G., Güven, K., Kırimer, N., Demirci, B., Başer, K. H. C., 2000, Antimicrobial activities of *Ferulago* essential oils, Z. Naturforschung C, 55, 886-889.
- Demirci, F., Başer, K. H. C., Çalış, İ., Gökhan, E., 2001, Essential oil and antimicrobial evaluation of the *Pistacia eurycarpa*, Chem.Nat.Comp. 37, 332-335.
- Demirci, F., Başer, K. H. C., Çalış, İ., Gökhan, E., 2002, Antimicrobial evaluation of the *Pistachia eurycarpa* Yalt. essential oil, Chem.Nat.Comp., 37(4), 332-335.
- Demirci, B., Demirci, F., Dönmez, A. A., Franz, G., Paper, D. H., Başer, K. H. C., 2005, Effects of *Salvia* essential oils on the chorioallantoic membrane (CAM) assay, Pharmaceutical Biol., 43(8), 666-671.
- Demirci, B., Başer, K. H. C., Tabanca, N., Crockett, S. L., Wedge, D. E., 2006, Antifungal activity of *Haplopappus greenei* essential oil towards phytopathogenic *Colletotrichum* species, J. Agric. Food Chem., 54, 3146-3150.

Devlet İstatistik Enstitüsü Raporu (D. İ. E) 907/tuf-sy-4785.

Djorrdjevic, P. S., Smith, L. A., Forbes, W. A., Hornitzky, M. A., 1999, Geographically diverse Australian isolates of *Melissococcus pluton* exhibit minimal genotypic diversity by restriction endonuclease analysis, FEMS Microbiology Letters, 173, 311-318.

Doğaroğlu, M., 2004, Modern Arıcılık Teknikleri, Doğa Arıcılık Ticaret, Tekirdağ, 296p.

Dollman, W. B., LeBlanc, V. T., Stevens, L., O'Connor, J. P., Turnidge, J. D., 2005, A community-based intervention to reduce antibiotic use for upper respiratory tract infections, Medicine and The Community, 82, 617-620.

Doughty, S., Luck, J., Goodman, R., 2004, Evaluating alternative antibiotics for control of European foulbrood disease. Rural Industries Research and Development Corporation; Publication No. 04/095.
<http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/04-095.pdf>

Duman, H., 2000, *Origanum* L. in: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.K., (eds.). Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press, Vol 11:207-208, Edinburg.

Elzen, P. J., Westervelt, D., Causey, D., Ellis, J., Hepburn, H. R., Neumann, P., 2002, Method of application of tylosin, an antibiotic for American foulbrood control with effects on small hive beetle (Coleoptera: Nitiludae) populations, Journal of Economic Entomology, 95, 1119-1122.

Elzen, P. J., Westervelt, D., Causey, D., Rivera, R., Baxter, J., Feldlaufer, M., 2003, Control of oxytetracycline-resistant American foulbrood with tylosin and its toxicity to honey bees (*Apis mellifera*), Journal of Apicultural Research, 41, 97-100.

Erickson, E. H., Stanley, Jr. D., Martin, C., Garment, B. (eds)., 1999, Bee Book, 326 p., Jawa University Press, USA.

Feldlaufer, M., Pettis, J. S., Kochansky, J. P., Kramer, M., 2004, Residue levels in honey after colony treatment with the antibiotic tylosin, American Bee Journal, 41, 143-145.

Fries, I. and Camazine, S., 2001, Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, Apidologie, 32, 199-214.

Frow, J. and Delacan, S. H., 1999, Bee Diseases Diagnosis, Bee Research Laboratory Bldg 476, BARC-East Beltsville, MD 20705., 53-58.

Gharaibeh, M. N., Gillen, L. P., Osborne, B., Schwartz, J. I., Woldman, S. A., 1998, Effect of multiple doses of rifampin on the (14C-N-methyl) erythromycin breath test in healthy male volunteers, The Journal of Clinical Pharmacology, 38, 492-495.

- Gochnauer T., 1981, The distribution of *B.larvae* spores in the environments of colonies infected with American foulbrood disease, *Am. Bee. J.*, 121, 332-335.
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C and Bima, P., 2003, Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare x appellei*) from meristem tips, *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 39 (2), 125-128.
- Govan, V. A., Brözel, V., Allsop, M. H., Davison, S., 2001, A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honey bee larvae, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1983-1985.
- Govan, V. A., Allsopp, M. H., Davidson, S., 2002, A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2243-2245.
- Gregorc, A. and Bowen, I. D., 2000, Histochemical characterization of cell death in honey bee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline, *Cell Biology International*, 24, 319-324.
- Guinaudeau, H., Freyer, A. J., Shamma, M., Başer, K. H. C., 1984, Enzymic control of stereochemistry among the *Thalictrum* bisbenzylisoquinoline alkaloids, *Tetrahedron*, 40 (11), 1975-1982.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., 1999, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Hansen, H., Brodsgaard, C. J., Kryger, P., Nicolaisen, M., 2003, A scientific note on the presence of *Paenibacillus larvae larvae* spores in sub-Saharan African honey, *Apidologie*, 34, 471-472.
- Harrison, J. F. and Camazine, S., 2001, Mite not make it home: tracheal mites reduce the safety margin for oxygen delivery of flying honey bees, *Journal of Experimental Biology*, 204, 805-814.
- Holmes, K. K., 2005, Azithromycin versus penicillin-G benzathine for early syphilis, *N. Eng. J. Medicine*, 353(12), 1291-1293.
- Hood, W. M. and McCreddie, J. W., 2001, Field tests of the Varroa treatment device using formic acid to control *Varroa destructor* and *Acarapis woodi*, *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 18, 87-96.
- Hornitzky, M. A. Z. and Karlovskis, S., 1989, A culture technique for detection of *Bacillus larvae* in honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 28(2), 118-120.
- Hornitzky, M. A. Z. and Wilson, S. C., 1989, A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 28(4), 191-195.

- Hornitzky, M. and White, B., 2001, Controlling American foulbrood: Assessing effectiveness of shaking bees and antibiotic therapy strategies, RIRDC Publication No.01/048.
- İşcan, G., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C., Demirci, F., 2002, Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3943-3946.
- Jarosz, J. And Glinski, Z., 1991, More on pathogenesis of American foulbrood disease of the honey bee, *Apiacta*, 26(1), 8-12.
- Jelinski, M., 2003, Survival of *Paenibacillus larvae larvae* endospores in honey substitute obtained from bee colonies affected with American foulbrood, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47, 271-273.
- Ko, W. C., Lee, H. C., Chiang, S. R., Yan, J. J., Wu, J. J., Lu, C. L., Chuang, Y. C., 2004, In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strain, *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 53(2), 393-395.
- Kochansky, J., 2000, Analysis of oxytetracycline in extender parties, *Apidologie*, 31, 517-524.
- Kochansky, J., Knox, D. A., Feldlaufer, M., Pettis, J.S., 2001, Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and –resistant *Paenibacillus larvae*, *Apidologie*, 32, 215-222.
- Kochansky, J. and Pettis, J., 2005, Screening additional antibiotics for efficiency against American foulbrood, *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 24-28.
- Koenig, J. P., 2004, Factors contributing to the pathogenesis of AFB in honey bee colonies, *American Bee Journal*, 24 (4), 171-178.
- Kokkini, S., 1996, Taxonomy, diversity and distribution of *origanum* species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano*, CIHEAM, Valenzano (Bari), 2-12.
- Koenig, B., 1988, The honey bee as pharmacophorus insect, *Entomol. Gener.*, 14 (2), 145-148.
- Koenig, R. E., 1994, *The Biology of The Honey Bee*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Kürkçüoğlu, M., Özek, T., Başer, K. H. C., 1995, Composition of the essential oil of *Heracleum platytaenium* Boiss. from Turkey, *J. Essent. Oil Res.* 7, 69-70.
- Kürkçüoğlu, M., Sargin, N., Başer, K. H. C., 2003, Composition of volatiles obtained from spices by microdistillation, *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 355-357.

- Larson, R. A., 1998, The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- Lauro, F. M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassu, M., Bertoloni, G., 2003, Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol, *International Journal of Food Microbiology*, 81, 195-201.
- Lodesani, M. and Costa, C., 2005, Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues, *Bee World*, 86(4), 102-108.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M., 2006, *Brock Biology of Microorganisms*, Eleventh edition (ISBN 0-13-144329), Pearson Practice Hall, Pearson Education, Inc, 992 p., NJ.
- Mahaman, B. D., Harizanis, P., Filis, I., Antonopoulou, E., Yialouris, C. P., Sideridis, A. B., 2002, A diagnostic expert system for honey bee pests, *Computers and Electronics in Agriculture*, 36, 17-31.
- Melathopoulos, A. P., Winston, M. L., Whittington, R., Smith, T., Lindberg, C., Mukai, A., Moore, M., 2000, Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae) and brood pathogens, *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, *Journal of Economic Entomology*, 93, 199-209.
- Melichar, B., Duorak, J., Hyspler, R., Zadek, Z., 2005, Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents, *Chemotherapy*, 51, 336-338.
- Miyagi, T., Peng, C.Y.S., Chuang, R. Y., 2000, Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States, *Journal of Invertebrate Pathology*, 75 (1), 95-96.
- Morse, R. A. and Hooper, T., 1985, *Encyclopedia of Beekeeping*, Blandford Press, 180-183 p., Link House, U.K.
- Morse, R. A., 1997, *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 1-56 p., Mediwa, A. I., Root Co.
- Nakajima, C., Okayama, A., Sakogawa, T., Nakamura, A., Hayama, T., 1997, Disposition of ampicillin in honey bees and hives, *J. Vet. Med. Sci.*, 59(9), 765-767.
- Nakajima, C., Sakogawa, T., Okayama, A., Nakamura, A., Hayama, T., 1998, Disposition of mirosamicin in honey bee hives, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 21, 269-273.

- Nasr, M. E., Otis, G. W., Scott-Dupree, C. D., 2001, Resistance to *Acarapis woodi* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) divergent selection and evaluation of selection progress, *Journal of Economic Entomology*, 94, 332-338.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1997, Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 4th ed. Approved Standard M₂-A₅, Villanova, PA.
- OIE, World Organisation of Animal Health Reference Laboratory Terrestrial Manual, 2004, American Foulbrood, Chapter 2. 9. 2., 970-978.
- Özkırım, A. and Keskin, N., 2002, Distribution of the major bacterial brood diseases diagnosed in apiaries in Ankara and its surroundings, *Mellifera*, 2-4, 40-44.
- Özkırım, A. and Keskin, N., 2005, The culture of *Bacillus* spp. from comb foundation, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 34, 37-41.
- Padin, S. B., Ricci, E. M., Ringuelet, J. A., Carrizo, P. J., 2000, Effect of lemongrass *Cymbopogon citratus* on American foulbrood disease, *Journal of Apicultural Research*, 43, 68-73.
- Peng, C., Mussen, E., Fong, A., Montaque, M. H., Tyler, T., 1992, Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro, *Journal of Invertebrate Pathology*, 60, 127-133.
- Peng, C., Mussen, E., Fong, A., Cheng, P., Geary, W., Montaque, M. A., 1996, Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. development and prevention of American foulbrood disease, *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 67-71.
- Peng, C. Y. S., Williams, R. J., Chuang, Y. R., Doi, R. H., Mussen, E. C., 1998, The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72, 252-257.
- Peng, C., Williams, R. J., Doi, R. H., 1999, The inhibitory effect of tylosin on *Paenibacillus larvae* for the control of American foulbrood, *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 71-74.
- Piccini, C. and Zunino, P., 2001, American foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honey bees and susceptibility to oxytetracycline, *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 176-177.
- Rahman, A. U., Shahwar, D., Parween, Z., Choudhary, M. I., Şener, B., Toker, G., Başer, K. H. C., 1998, New alkaloids from *Bongardia chrysogonum*, *Nat.Prod.Lett.*, 12 (3) 161-173.

- Reynaldi, F. J., Lopez, A. C., Albo, G. N., Alippi, A. M., 2003, Differentiation of African honey bees and European honey bees for resistance bacterial diseases, *J. Apic. Res.*, 42(4), 68-76.
- Rice, N. D., Winston, M. L., Whittington, R., Higo, H. A., 2002, Comparison of release mechanisms for botanical oils to control honey bee pathogens: *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi* in colonies of honey bees, *Journal of Economic Entomology*, 95, 221-226.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., 1999, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavanoids, *Free Rad. Res.*, 22, 375-383.
- Sakogawa, T., Shigeaki, K., Okayama, A., 1999, A scientific note on in vitro experimental infection of American foulbrood in honey bees *Apis mellifera* L., *Apidologie*, 30, 75.
- Shimanuki, H. and Knox, D. A. (eds). 1991, *Diagnosis of Honey Bee Diseases*, Department of Agriculture, Agricultural Hand Book No. AH. 690, 1-56 p., USDA.
- Shimanuki, H. and Feldlaufer, M. F., 1998, Antimicrobial extracted from honey bee larvae with chalkbrood, *Agricultural Reserch Service*, 96-98.
- Shimanuki, H. and Hung, A. C., 1999, Detection of honey bee viruses by direct RT-PCR, *Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture*, 8-27.
- Sokal, R. and Rohlf, F.J., 1995, *Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, Third Edition, WH Freeman and Co., New York, USA, 887p.
- Suazo, A., Torto, B., Teal, P. E. A., Tumlinson, J. H., 2004, Response of different genotypic honey bees to American foulbrood, *Apidologie*, 34, 525-533.
- T. C. Tarım Bakanlığı 12.04.2005 tarih, 731/06 sayılı Avrupa Birliği Yavru Çürüklüğü Önlem Kararları Yönetmeliği.
- Thompson, H. M. and Brown, M. A., 2001, Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood, *Bee World*, 82, 130-138.
- Tosun, A., Kürkçüoğlu, M., Doğan, E., Duman, H., Başer, K. H. C., 2006, Essential oil composition of *Seseli andronakii* Woron. and *Seseli petraeum* M. Bieb. growing in Turkey , *Flavour Fragr. J.* , 21(2), 257-259.
- Tunalier, Z., Koşar, M., Öztürk, N., Başer, K. H. C., Duman, H., Kırimer, N., 2004, Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species, *Chem. Nat. Prod.*, 40(3), 206-210.

- Tutkun, E. ve İnci, A., 1992, Bal Arısı Zararlıları, Hastalıkları ve Tedavi Yöntemleri, Demircioğlu Matbaası, Ankara, 1-162.
- Van Engelsdorp, D. and Otis, G. W., 2001, The role of cuticular compound in the resistance of honey bees (*Apis mellifera* L.) to tracheal mites (*Acarapis woodi*), Experimental and Applied Acarology, 21, 593-603.
- Van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M., van Zyl, F. R., van Heerden, F. R., Başer, K. H. C., 2006, The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum*, South African Journal of Botany, 72, 287-290.
- Varaldo, P. E., Dobbia, E., Schito, G. C., 1985, In vitro activities of rifapentine and rifampin alone and in combination with six other antibiotics against Staphylococci of different species, Antimicrob. Agents of Chemotherapy, 27(4), 615-618.
- Waite, R., Jackson, S., Thompson, H., 2003, Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus pluton*, a pathogen of honeybee larvae, Letter Applied of Microbiology, 36 (1), 20-24.
- Williams, D. L., 2000, A veterinary approach to the European honey bee, The Veterinary Journal, 160, 61-73.
- Winston, M. L., 2000, Neem extracts in honey bee pest management, Agri-Food Innovation Fund Grant 96000438, Simon Fraser University, Burnaby, B. C., 65-72.
- www.botit.botany.wisc.edu/images
- Zeytinoğlu, H., İncesu, Z., Başer, K. H. C., 2003, Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-ras oncogene, Phytomedicine, 10 (4), 292-299.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aslı ÖZKIRIM

Doğum Yeri : Bursa

Doğum Yılı : 1976

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu: Doktora

Lise 1989-1992

Lisans 1992-1996

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

1998-2006 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Uygulamalı Biyoloji
ABD'da Araştırma Görevlisi