

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PROBİYOTİK KATKILI ARI KEKİ HAZIRLANMASI,  
STABİLİZASYONU VE RAF ÖMRÜ ÇALIŞMASI**

**Pelin SARIKAYA**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven Özdemir**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu:**

**Sunuş Tarihi**

16.06.2023

Bornova-İZMİR



Pelin Sarıkaya tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan Probiyotik katkılı arı keki hazırlanması, stabilizasyonu ve raf ömrü çalışması " başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 16.05.2023-tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

.....

Raportör Üye

.....

Üye

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Probiyotik katkılı arı keki hazırlanması, stabilizasyonu ve raf ömrü çalışması " başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

TARİH

Pelin SARIKAYA

16.06.2023



## ÖZET

### PROBİYOTİK KATKILI ARI KEKİ HAZIRLANMASI, STABİLİZASYONU VE RAF ÖMRÜ ÇALIŞMASI

*Apis mellifera*'nın sağlığını tehdit eden birçok bakteriyal bir hastalıktan biri olan Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı ülkemizde ve dünyada oldukça ciddi problemlere yol açmaktadır. Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına neden olan bakteri *Paenibacillus larvae*'dir. Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığını kontrol etmek için kullanılan yöntemler arasında; antibiyotik tedavisi (Oksitetrasiklin, tilosin ve streptomisin), seçici ıslah, biyoaktif uçucu yağların kullanılması, yağ asitlerinin kullanılması, propolis, arı sütü ve probiyotiklerle kolonilerin desteklenmesi yer almaktadır. Probiyotikler, yerli mikrobiyotanın yararlı etkilerini artırarak konakçıya fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin kullanımıyla hem pestisit toksisitesi azalır hem de antibiyotik direnci çıkma olasılığını düşürür ve arı ürünlerine geçmesi engellemektedir. Bu yüzden probiyotik uygulaması, Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığında kimyasal ve antibiyotik uygulamasına bir alternatif olarak düşünülmektedir. Erken ilkbahar döneminde arı kovanları, besin stoğu ve polen eksikliğinin giderilmesi için kontrol edilmektedir. Arı Keki koloniyi açlık riskinden korurken aynı zamanda içeriğindeki polenle yavru üretimini desteklemektedir. Bu çalışma da hem arıların beslenme ve üreme açısından desteklenmesi hem de Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığının tedavisi amacıyla arı kekine probiyotik mikroorganizmaların mikrokürecik yöntemiyle eklenmesi ve stabilize edilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan denemelerde öncelikle ticari amaçla kullanıma uygun olabilecek bir besiyeri içeriği için alternatif karbon kaynakları olarak F55 ve Melas denenmiştir. *Lactobacillus* türleri, karbon kaynağı olarak Melas kullanıldığında F55 e göre ortalama 1 logaritma daha fazla büyüme göstermiştir. Bu yüzden alternatif karbon kaynağı olarak melas belirlenmiştir. Alternatif karbon kaynağı ile hazırlanan Modifiye MRS Broth kullanılarak *Lactobacillus* için uygun inkübasyon sıcaklığı belirlemek için 27°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık denenmiştir. Özellikle *L.plantarum*' da 1 logaritmalık bir fark olduğundan 37°C tercih edilmiştir. *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi için hem spektrofotometrik yöntem hem de Toplam Koloni Sayımı yönteminden yararlanılmıştır. *Lactobacillus* türleri için optimum inkübasyon süresini ortalama 18-20 saattir.

Tüm optimum koşullar sağlandıktan sonra *L.plantarum* Mikrokürecik yöntemiyle Arı Kekine eklenmiştir. Mikrokürecik metoduyla kaplanmış ve Arı Keki ne eklenmiş *L.plantarum*' un canlılık sayımının yapılabilmesi için Mikroküreciklerde oluşan çapraz bağları koparılması gerekmektedir. Bunun için 1 dakikadan 10 dakikaya kadar farklı sürelerde vorteks işlemi uygulanmıştır. 1 dakika vorteks işlemi ile 10 dakika arasında 1 logaritmalık bir fark oluşmuş ve çapraz bağların koparılması için 1 dakikanın yeterli olduğu anlaşılmıştır. Mikrokürecik yöntemiyle kaplanmış ve Arı kekine eklenmiş *L.plantarum*' un 4°C ve 25 °C de canlılıkları incelenmiştir. 4°C de 25 °C ye göre 1 logaritma daha fazla canlı kalabildiği belirlenmiştir. Mikroküreciklerin stabilizasyonunu sağlamak amacıyla 3 farklı konsantrasyonda gliserol eklenmiştir fakat 3 konsantrasyonda da beklenen etki görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Arı Keki, *Apis mellifera*, Probiyotik, *Lactobacillus sp.*,Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı

SARIKAYA, Pelin

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

16.06.2023, 60 sayfa

**ABSTRACT**

**PROBIOTIC ADDED BEE PATTY PREPARATION, STABILIZATION AND  
SHELF LIFE STUDY**

American Foulbrood Disease, which is one of the many bacterial diseases that threaten the health of *Apis mellifera*, causes serious problems in our country and in the world. The bacterium that causes American foulbrood is *Paenibacillus larvae*. Among the methods used to control American Foulbrood Disease; antibiotic treatment (oxytetracycline, tylosin and streptomycin), selective breeding, use of bioactive essential oils, use of fatty acids, support of colonies with propolis, royal jelly and probiotics. Probiotics are defined as live microorganisms that benefit the host by enhancing the beneficial effects of the native microbiota. With the use of probiotics, both pesticide toxicity decreases and the possibility of antibiotic resistance is reduced and it prevents the transfer to bee products. Therefore, probiotic administration is considered as an alternative to chemical and antibiotic administration in American Foulbrood Disease. In the early spring period, beehives are checked for nutrient stock and pollen deficiency. While Bee Cake protects the colony from the risk of starvation, it also supports the production of offspring with its pollen content. In this study, it was aimed to add and stabilize probiotic microorganisms to bee cake by microsphere method in order to support bees in terms of nutrition and reproduction and to treat American Foulbrood disease.

In the trials, F55 and Molasses were tried as alternative carbon sources for a medium that can be found suitable for commercial use. *Lactobacillus* species produced an average of 1 logarithm more growth than Molasses growth F55 as a carbon source. Therefore, molasses was determined as an alternative carbon source. Two different temperatures, 27°C and 37°C, were tried to determine the appropriate incubation temperature for *Lactobacillus*. Especially in *L.plantarum*, 37°C was preferred since there is a difference of 1 logarithm. Both the spectrophotometric method and the Total Colony Count method were used to determine the optimum incubation time of *Lactobacillus* structure. The optimum incubation time for *Lactobacillus* species is 18-20 hours on average.

After all the optimum conditions are met, *L.plantarum* is kept in the Bee Cake with the Microsphere method. In order to count the viability of *L.plantarum* coated with the microsphere method and added to the Bee Cake, the cross-links formed in the microspheres must be broken. For this, vortexing was applied at different times from 1 minute to 10

minutes. It has been found that 1 minute is sufficient to break the crosslinks and layers with a difference of 1 logarithm between 1 minute of vortexing and 10 minutes. The vitality of *L.plantarum*, which is coated with the microsphere method and added to the bee cake, ignites at 4oC and 25oC. It was used because it can survive 1 logarithm more at 4oC than at 25oC. Glycerol preservation at 3 different strengths in order to stabilize the microspheres, but the expected effect was not observed in all 3 potentials.



Keywords: Bee Cake, *Apis mellifera*, *Lactobacillus sp.*, American Foulbrood Disease

SARIKAYA, Pelin

MSC in Department of Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR  
16 /06/2023,60pages

## TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması FYL-2022-23543 nolu Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiŐtir. Maddi desteklerinden dolayı teŐekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisansa baŐladıĐımdan itibaren, tüm tez çalışması sürecim dahil olmak üzere, deneyimlerini, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkür ederim. Lisans ve Yüksek Lisans eğitimimde bana bilgi birikimlerini aktaran Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma çok teşekkür ederim. Benim için laboratuvar arkadaşından çok daha ötesi olan, laboratuvara ilk geldiğim zamandan itibaren her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, aynı zamanda bana her konuda destek olan Selin SARIÇAYIR'a, Lisans eğitimimin baŐından bu yana her zaman yanımda olup her konuda destek olan Emre Can EKİNEK'e ve Laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. EĞitim yaşamım boyunca maddi ve manevi ellerinden gelen her türlü desteği saĐlamıŐ olan, her zaman koŐsulsuz bana güvenen baŐta babaannem Muazzez SARIKAYA olmak üzere; babam Necip SARIKAYA'ya, annem Dilek Sena İZMİRLİ'ye, ablam Bahar SARIKAYA'ya ve halam Banu Orkun'a sonsuz teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
İÇİNDEKİLER .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
RESİMLER DİZİNİ .....	xvii
GRAFİKLER DİZİNİ .....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xix
1.GİRİŞ .....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ .....	3
2.1 Probiyotik Nedir .....	3
2.2 Probiyotiklerin Tarihçesi .....	3
2.3 Probiyotiklerin Özellikleri ve Sahip Olması Gereken Kriterler .....	3
2.5 Laktik Asit Bakterileri .....	7
2.5.1 Laktik asit bakterilerinin tanımı ve genel özellikleri .....	7
2.5.2 Laktik asit bakterilerinin metabolizması .....	7
2.5.3 Fruktofilik laktik asit bakterileri .....	9
2.6 Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı (AFB) .....	9
2.6.1 AFB' nin tanımı .....	9
2.6.2 AFB' nin etki mekanizması .....	10
2.6.3 AFB ve tedavisi için doğal stratejiler .....	11
2.6.3.1 Uçucu yağlar .....	11
2.6.3.2 Yağ asitleri .....	12
2.6.3.3 Propolis .....	13
2.6.3.4 Arı sütü .....	13
2.6.4 AFB ve probiyotikler .....	14
2.7 Arı Keki .....	15
2.8 Kitosan ve Mikrokürecik Yöntemi .....	18
3.MATERYAL VE YÖNTEM .....	19
3.1 Materyal .....	19
3.1.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin büyütülmesi için kullanılan besiyeri ve içeriği .....	19
3.1.3 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar .....	20

3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar .....	20
3.2 Yöntem .....	21
3.2.1 <i>Lactobacillus</i> türlerinin inkübasyon koşulları .....	21
3.2.2 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi .....	21
3.2.3 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının ve süresinin belirlenmesi .....	21
3.2.3.1 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi .....	21
3.2.3.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi .....	22
3.2.4 <i>Lactobacillus</i> türlerinin arı kekine eklenmesi ve stabilizasyonun sağlanması .....	22
3.3 Raf Ömrü Çalışması .....	24
4. Bulgular .....	25
4.1 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları .....	25
4.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının ve süresinin belirlenmesi için yapılan deneme sonuçları .....	26
4.2.1 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları .....	26
4.2.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum büyüme süresinin belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları .....	27
4.2.2.1 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon süresinin Toplam Koloni Sayımı hesaplanarak belirlenmesi .....	27
4.2.2.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon süresinin Spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmesi .....	28
4.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Arı Keki'ne mikrokürecik metoduyla eklenmesi için yapılan denemelerin sonuçları .....	28
4.3.1 <i>L. plantarum</i> 'un mikrokürecik ile arı kekine eklenmesinden sonra çapraz bağların koparılması .....	28
4.3.2 Mikrokürecik metodunda karıştırma süresinin belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları .....	29
4.3.3 Mikrokürecik içeren Arı Keki'nin saklama koşullarının belirlenmesi .....	30
4.3.4 <i>L. plantarum</i> içeren mikroküreciklerin arı kekinde stabilizasyonunun sağlanması için yapılan denemenin sonuçları .....	30
4.4 Raf Ömrü Çalışması ve Sonuçları .....	33
5. Sonuçlar ve Tartışma .....	34
6. Kaynakça .....	37
7. Özgeçmiş .....	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	Sayfa
Şekil 2.1 Aday bir probiyotik suşunun tanım kriterlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için karar ağacı (Binda, Hill, & Johansen, 2020).....	5
Şekil 2.2 Probiyotiklerin fonksiyonel mekanizmaları (Bajaj, Claes, & Lebeer, 2015).....	6
Şekil 2.3 Laktik asit üretiminin (a) Homefermentatif ve (b) heterofermentatif yolları. (Novik ve ark., 2017).....	8



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGE

#### Sayfa

Çizelge 3.1 MRS Broth.....	19
Çizelge 3.2 MRS Agar.....	19
Çizelge 4.1 Karıştırma süresinin belirlenmesi için yapılan deneme sonuçları.....	29



## RESİMLER DİZİNİ

RESİM	Sayfa
Resim 2.1 Enfekte olmamış larvalar ve sonrasında oluşan kara gözlü pupalar. Kırmızı halka ile gösterilen enfekte olmuş pupa.(Rauch ve ark., 2009).....	9
Resim 2.2 Aynı yaştaki sağlıklı pupa (solda) ve enfekte olmuş pupa (sağda). (Genersch, 2010).....	10
Resim 2.3 Enfekte bir larvadadan alınan ip kütlesi (solda) ve aynı yaşta sağlıklı bir kara gözlü pupa (sağda). (Rauch ve ark., 2009).....	10
Resim 2.4 <i>P.larvae</i> 'nin enfeksiyon mekanizması.....	11
Resim 2.5 Arı Keki.....	17
Resim 3.1 Mikrokürecik metodu ile kaplanmış <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un görüntüsü.....	23
Resim 3.2 Mikrokürecik metodu ile kaplanmış <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un ependrofta çöktürülmüş halinin görüntüsü.....	23
Resim 3.3 Arı kekine eklenmiş: Mikrokürecik metodu ile kaplanmış <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un görüntüsü.....	24
Resim 4.1 Arı Kekine Mikrokürecik metodu ile kaplanarak eklenen <i>L.plantarum</i> 'un görüntüsü.....	33
Resim 4.2 Arı Kekine Mikrokürecik metodu ile kaplanarak eklenen <i>L.plantarum</i> 'un 30.gün görüntüsü.....	33

## GRAFİKLER DİZİNİ

GRAFİK	Sayfa
Grafik 4.1 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi grafiği.....	25
Grafik 4.2 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığını saptama grafiği.....	26
Grafik 4.3 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi grafiği ..	27
Grafik 4.4 <i>Lactobacillus</i> türlerinin optimum inkübasyon süresinin spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmesi grafiği.....	28
Grafik 4.5 Vorteks işlemi sonrası canlılık grafiği.....	29
Grafik 4.6 Saklama koşullarının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuç grafiği....	30
Grafik 4.7 <i>L.plantarum</i> içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %0,5 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği.....	31
Grafik 4.8 <i>L.plantarum</i> içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %1 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği.....	31
Grafik 4.9 <i>L.plantarum</i> içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %2 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği.....	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FAO.....	Gıda ve Tarım Örgütü
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
LAB.....	Laktik Asit Bakterileri
FLAB.....	Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri
AFB.....	Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı
EO.....	Uçucu Yağlar
FA.....	Yağ Asitleri





## 1.GİRİŞ

Arılar için 7 farklı ailede ve 20000 farklı tür tanımlanmıştır ve henüz tanımlanamayan birçok tür bulunmaktadır. Arıların evrimsel sürecinin çiçekli bitkilerin evrimsel sürecine denk gelmesiyle birlikte arılar, tozlaştırıcı olarak önemli bir ekolojik rol üstlenmiştir. Tozlaşmanın yabani ve yönetilen arıların çeşitliliği, mahsul tozlaşması dahil ekolojik, ekonomik birçok önemi bulunmaktadır. Arılar, tozlaştırıcı olarak en kalabalık grup olmasa da en baskın taksonomik gruptur. Arılar tüylü vücutları sayesinde kolaylıkla polen taşıyabilmektedir. Ayrıca sosyal olan türleri sayesinde polenler arıdan arıya aktarılabilir. Tozlaşmanın yabani ve yönetilen arıların çeşitliliği, mahsul tozlaşması dahil ekolojik, ekonomik birçok önemi bulunmaktadır. (Patel ve ark., 2021)

Arılar çiçeklerden topladıkları polen ve nektarla beslenmektedir. İhtiyaç duydukları karbonhidrat, protein ve lipidleri polenler ve nektarlardan karşılamaktadır. Dünya üzerindeki yaygın kentleşme, tarım arazilerinin ve ormanların azalması, tehlike altında olan bitki türleri vb. sebeplerden dolayı bal arıları her zaman gerekli hayatta kalmak ve gelişmek için gerekli maddeleri sağlayamamaktadır. Beslenme stresi arılar için önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bal arılarının sıklıkla karşı karşıya kaldığı diğer bir kritik stres etkeni ise patojen organizmalardır. Bal arıları; virüsler, bakteriler, mantarlar ve ayrıca eklem bacaklı zararlıları dahil olmak üzere çeşitli patojenlere ev sahipliği yapmaktadır. Örneğin; *Varroa* akarı gelişmekte olan pupalar ve yetişkin arıları enfekte etmektedir ve aynı zamanda virüsleri bünyesinde taşıyarak arılarda viral enfeksiyona sebep olmaktadır. *Nosema ceranae*, fungal bir bağırsak parazitidir, kovan kayıplarına neden olabilmektedir. Amerikan ve Avrupa yavru çürüklüğüne sebep olan bakteri *Paenibacillus larvae* ise larva ve pupalara etki eden oldukça bulaşıcı bir bakteridir ve bulaştığı kovanlar genelde yakılmaktadır. (Dolezal & Toth, 2018)

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB), bal arılarını etkileyen ciddi bir hastalıktır. Hastalığın sebebi olan *Paenibacllus larvae*, gram pozitif ve sporlu bir bakteri türüdür. Tedavi yöntemleri arasında antibiyotik kullanımı bulunsa da bu yöntem; bakterinin direnç kazanması, bal ve diğer arı ürünlerinde kalıntı bırakması sebebiyle birçok ülkede yasaklanmıştır. Alternatif ve zararsız kontrol yöntemleri ise uçucu yağlar, bitki özleri, propolis, arı sütü, bakteri ve bakteriyosinler gibi doğal stratejilerdir. (Fuselli ve ark., 2018)

Bal arılarının bağırsak mikrobiyotasında birçok probiyotik mikroorganizma bulunmaktadır. Bal arılarından izole edilen probiyotik özellikteki Laktik Asit Bakterileri nin arı sağlığı üzerinde faydalı etkilerinin olmasının yanı sıra patojenlere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bal arısı kolonilerini patojenlere karşı korumada probiyotiklerin moleküler mekanizmalarının bilinmesi oldukça önemlidir. Arı yemine probiyotik mikroorganizmaların eklenmesi arı sağlığını olumlu etkiler ve patojenleri azaltır. Bu beslenme stratejisi hastalıklarla mücadeleye olanak tanırken aynı zamanda sağlıklı arıların daha fazla bal üretmesine olanak sağlamaktadır. (Royan m. , 2019)

Bu çalışmada *Paenibacillus larvae*' nin sebep olduğu bilinen Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı'nın, taranılan literatürden yola çıkılarak; arıların sindirim sisteminde bulunan, bağışıklıklarını destekleyen ve patojenitesi üzerindeki güçlü antagonistik etkisi bulunan probiyotik mikroorganizmaların Arı Kekine eklenerek hastalığın tedavisi ve önlenmesi amaçlanmaktadır.

## **2.LİTERATÜR ÖZETİ**

### **2.1 Probiyotik Nedir**

2002 yılında FAO ve WHO uzmanları, probiyotikleri “Yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır. Mikroorganizmaların probiyotik suş olarak sınıflandırılabilmesi için; kullanım güvenliği, fonksiyonel ve teknolojik özellikleri ile ilgili uygun kriterler belirlenerek kesin olarak tanımlanması gerekmektedir. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için temel gereksinimlerden bazıları; uygulanırken canlı olması, uygulanacağı konakçının sağlığı üzerinde faydalı bir etkiye sahip olması ve bu faydalı etkiyi sağlayabilmesi için önerilen etkili dozda uygulanabilmesidir. (Zielińska & Kolohyn, 2018)

### **2.2 Probiyotiklerin Tarihçesi**

Probiyotik kelimesi, Latince pro ve Yunancada kelimenin tam anlamıyla "yaşam için" anlamına gelen bios kelimelerinden türetilmiştir. Fuller 1992'de probiyotikleri "konakçı hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek faydalı bir şekilde etkileyen canlı bir mikrobiyal yem takviyesi" olarak tanımlamıştır. (Gasbarrini, Bonvicini, & Gramenzi, 2016)

Probiyotiklerin modern tarihi, 1900'lerin başında Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde çalışan bir Rus bilim adamı Elie Metchnikoff'un öncü çalışmalarıyla başlamaktadır. Louis Pasteur, fermantasyon sürecinden sorumlu mikroorganizmaları tanımlamış olmasına rağmen Metchnikoff ilk kez bu mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olası etkilerini bulmaya çalışan bilim insanıdır. Metchnikoff "bağırsak mikroplarının gıdaya bağımlılığının, vücudumuzdaki florayı değiştirecek önlemler almayı ve zararlı mikropların yerini yararlı mikroplarla değiştirmeyi mümkün kıldığını" da belirtmiştir. Metchnikoff'un bu cümlesi probiyotik kavramını net bir şekilde açıklamaktadır. Metchnikoff, bu kavramı ortaya atarak Nobel ödülü almıştır. (Gasbarrini, Bonvicini, & Gramenzi, 2016)

### **2.3 Probiyotiklerin Özellikleri ve Sahip Olması Gereken Kriterler**

Probiyotik bakteriler konakçı tarafından alındıklarında ve kolona ulaştıklarında, intestinal mikrobiyal dengeyi geliştirip zenginleştirmekte, alıcı reseptörlere bağlanıp patojen mikroorganizmaların yaşam alanını azaltmakta ve patojenlerin dışkı yolu ile organizmadan uzaklaştırılmalarını sağlamaktadır. Probiyotik bakterilerin biyoterapötik etki gösterebilmesi

için konakçının vücuduna alması gereken canlı hücre konsantrasyonunun en az  $10^6$  kob/g, kabul edilebilir düzey olarak da  $10^7$  - $10^8$  kob/g arasında olması gerektiği bilinmektedir.

Probiyotik olarak tanımlanan bir mikroorganizmanın özellikleri şu şekilde sıralanmaktadır;

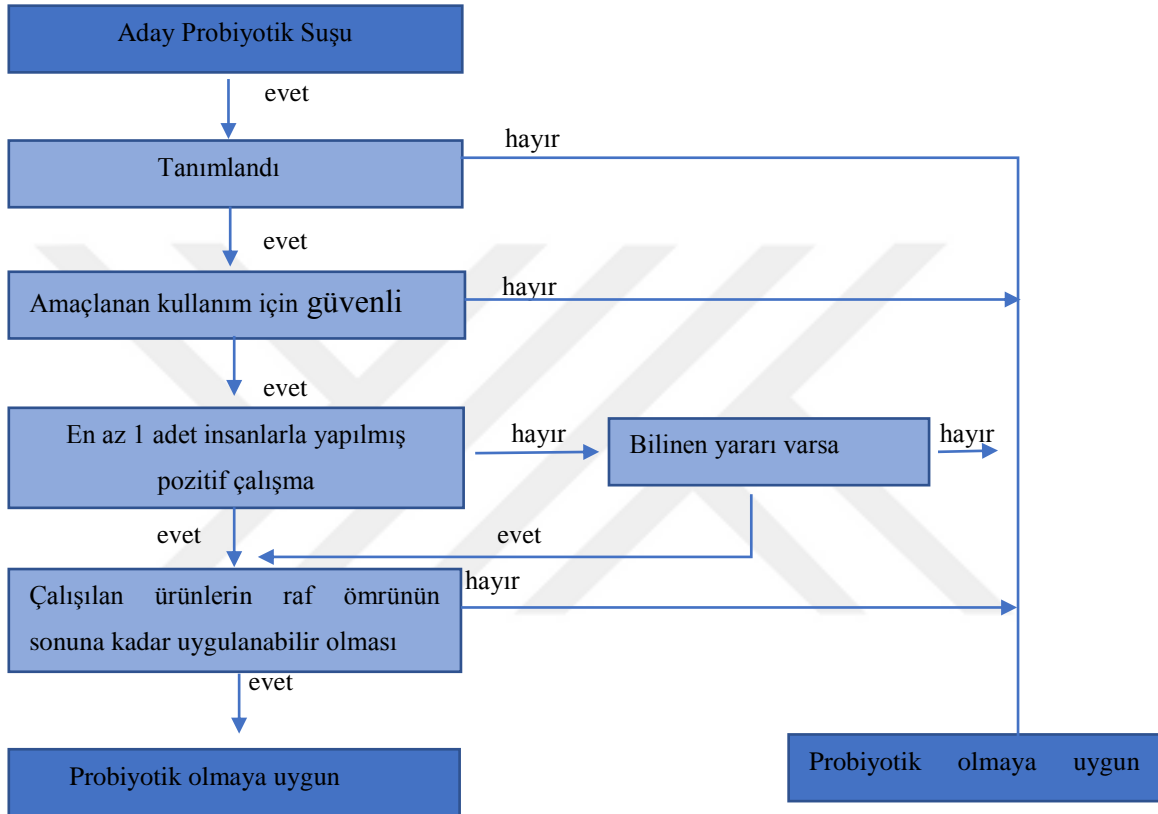
- Normal mikrobiyal yapıyı bozmadan patojen bakterileri etkileyebilmesi,
- Kullanılacağı konakçı kaynaklı olması, uygun koşullar sağlandığında canlı kalabilmesi, başka bir ortamda ürememesi,
- Konakçı için patojen olmaması 'non-invazif' ve 'non-karsinojenik' olması,
- Asit, pH ve safra tuzlarına dirençli olması,
- Mukoza yüzeyine tutunabilmesi,
- Gastrointestinal sistemde geçici olarak kolonize olabilmesi,
- Antimikrobiyal maddeler üretebilmesi,
- Besinlere ekleme ve klinikte kullanım için güvenilir olması,
- Klinik etkinliğinin ortaya konulmuş olması,
- İyi teknik özelliklerine sahip olması: stabil bir suş olması, fajlara dirençli olması, ürün içinde canlı kalabilmesi, oksijene dirençli olması, liyofilize preparat haline gelebilmesi,
- Mikrobiyota içinde kolay tanımlanabilir olması,
- Konakçıda sistemik toksisite, immünolojik duyarlılık ve dirençli mikroorganizmaların gelişmesine neden olmaması,
- Uzun süre etki edebilmesi için konakçı dokularında yerleşebilmesi. (Delikanlı & Özcan, 2014)

Ayrıca bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için sahip olması gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Bu kriterlere uymayan mikroorganizmalar probiyotik olarak sınıflandırılmamaktadır. Aday bir probiyotik suşunun sahip olması gereken kriterler kısaca şunlardır;

- Yeterince karakterize edilmiş olması,
- Amaçlanan kullanım için güvenli olması,
- Kabul görmüş bilimsel standartlara göre yürütülen en az bir pozitif insan klinik deneyi ile desteklenmesi,

- Üründe raf ömrü boyunca etkili bir doz olacak kadar canlı probiyotik barındırmasıdır.

Ayrıca aday bir probiyotik suşunun tanım kriterlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için bir karar ağacı kullanılabilir. Karar ağacı son uygulamadan bağımsız olarak probiyotik statüye uygun olup olmadığını belirlemek için bir araç olarak hizmet etmektedir. Karar ağacı Şekil 2.1’ de gösterilmiştir. (Binda, Hill, & Johansen, 2020)



Şekil 2.1 Aday bir probiyotik suşunun tanım kriterlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için karar ağacı (Binda, Hill, & Johansen, 2020)

## 2.4 Probiyotiklerin Eylem Mekanizmaları

Probiyotikler eylem mekanizmalarını çeşitli şekillerde yerine getirebilmektedir. Bu mekanizmalar arasında; bağırsak mikrobiyal homeostazının düzenlenmesi, patojenlerin mukozayı kolonize etme ve enfekte etme kabiliyetine müdahale, lokal ve sistemik bağışıklık tepkilerinin modülasyonu, gastrointestinal bariyer fonksiyonunun stabilizasyonu veya sürdürülmesi, prokarsinojenik enzim aktivitenin inhibisyonu ve iyi beslenmeyi destekleyen enzim aktivitenin indüklenmesi yer almaktadır.

Probiyotiklerin etki mekanizmaları üç etki biçimine göre sınıflandırılabilir.

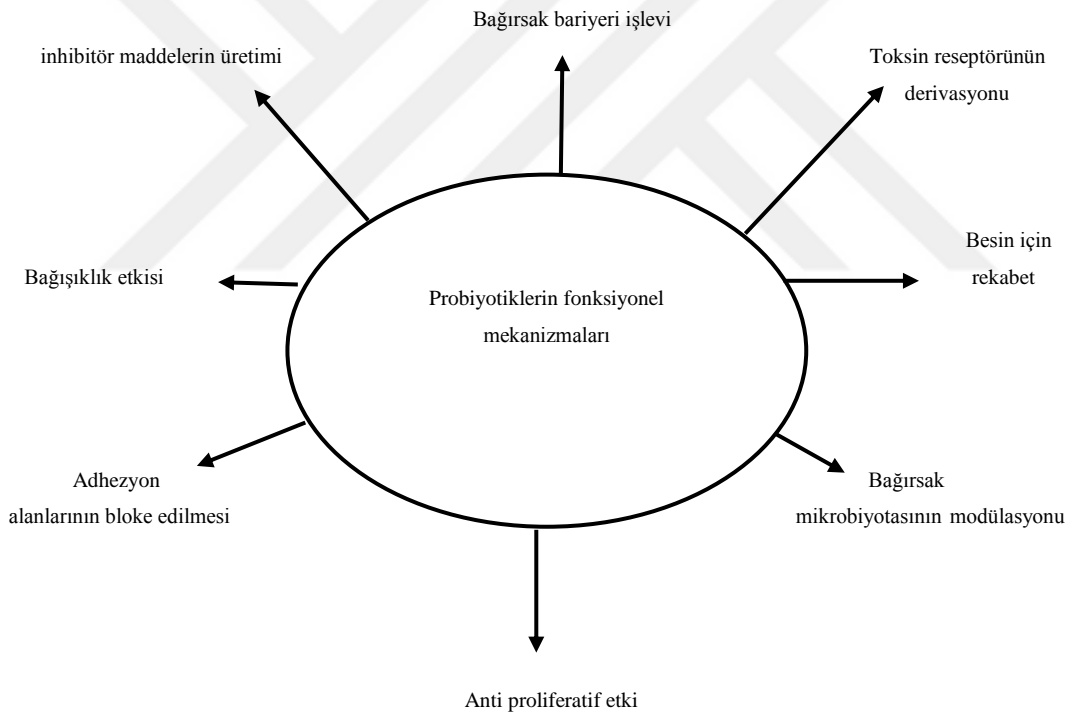
(i) Probiyotik mikroorganizmalar, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemi dahil olmak üzere konağın savunma mekanizmasını modüle edebilmektedir.

Bu etki şekli sadece bulaşıcı hastalıkların tedavisi için değil, aynı zamanda sindirim sistemi veya bölümlerinin (kronik) iltihabının tedavisi ve neoplastik hücrelerin yok edilmesi için önemlidir.

(ii) Probiyotikler mikroorganizmalar, kommensal ve/veya patojenik mikroorganizmalar üzerinde doğrudan etki gösterebilmektedir. Bu etki, birçok durumda enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisi ve bağırsaktaki mikrobiyal dengenin restorasyonu için oldukça önemlidir.

(iii) Probiyotikler mikroorganizmalar; toksinler, safra tuzları gibi mikrobiyal ürünleri etkileyen eylemler gerçekleştirebilmektedir. Bu eylemler ise toksinlerin inaktivasyonuna, bağırsaktaki konakçı ve gıda bileşenlerinin detoksifikasyonuna neden olabilmektedir.

Yukarıda sıralanan üç etki; enfeksiyon savunmasında, kanserin önlenmesinde ve bağırsak mikrobiyotası ile ev sahibi arasındaki fizyolojik dengenin stabilize edilmesinde veya yeniden oluşturulmasında rol oynamaktadır. (Oelschlaeger, 2010)



Şekil 2.2 Probiyotiklerin fonksiyonel mekanizmaları (Bajaj, Claes, & Lebeer, 2015)

## **2.5 Laktik Asit Bakterileri**

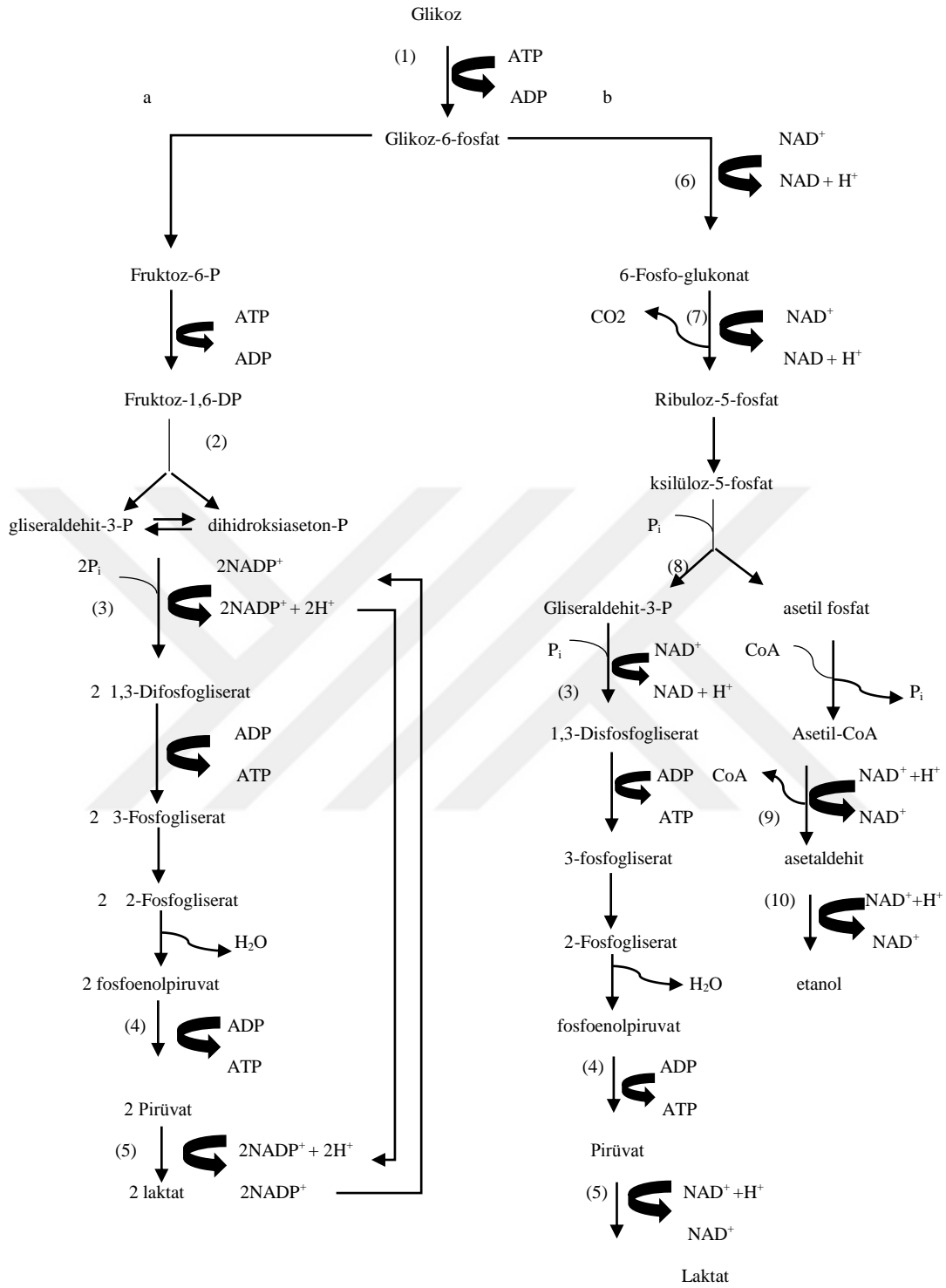
### **2.5.1 Laktik asit bakterilerinin tanımı ve genel özellikleri**

Laktik Asit Bakterileri (LAB); Gram pozitif, sporsuz, katalaz negatif, fakültatif anaerob, asit toleranslı ve fermentatif mikroorganizmalardır. Laktik Asit Bakterileri genellikle çeşitli gıda ürünlerinde (süt, et, sebzeler) buldukları gibi aynı zamanda bazıları ağız, bağırsak ve memelilerin vajinasında da bulunmaktadır. (Khalid, 2011)

Laktik Asit Bakterileri'nin çeşitli özellikleri bulunmaktadır. Bunlar arasında; antimikrobiyal bileşikler üretme yetenekleri, anti tümöral aktivite, patojenik türlerin inhibisyonu, kolon kanserine karşı koruma, bağışıklık sisteminin uyarılması, bağırsak mikrobiyotasının stabilizasyonu, laktoz intoleransının hafifletilmesi, antitümör ve antimutajenik etkileri bulunmaktadır. (Chang ve ark., 2010)

### **2.5.2 Laktik asit bakterilerinin metabolizması**

LAB şekerleri fermente ederek laktik asit elde etmek için iki farklı fermentasyon metabolizmasına sahip olabilmektedir. Bu iki metabolizma Homofermentatif ve Heterofermentatif olarak Homofermentatif veya heterofermentatif olarak adlandırılmaktadır. Homofermentatif LAB, ana ürün olarak laktik asit üretmesini sağlayan aldolaz enzimine sahiptir ve bir mol glikoz EmbdenMeyerhof-Parnas (EMP) glikolitik yoluyla herhangi bir yan ürün üretilmeden 2 mol Laktik asite dönüştürülebilmektedir. Heterofermentatif LAB ise heksozları ve pentozları kullanarak fosfoketolaz yoluyla 1 mol laktik asite ilave olarak etanol, asetik asit ve CO<sub>2</sub> gibi yan ürünler üretmektedir. Bu nedenle Homofermentatif LAB'nin Heterofermentatif LAB'nden Laktik asit verimi daha fazladır. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* ve bazı *Lactobacillus* türleri, Homofermentatif metabolizmaya sahip türler içermektedir. *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Lactobacillus* bazı türleri Heterofermentatif metabolizmaya sahiptir. (Chung ve ark, 2021)



Şekil 2.3 Laktik asit üretiminin (a) Homefermentatif ve (b) heterofermentatif yolları. Anahtar enzimler: (1)glukokinaz; (2) fruktoz-1,6-difosfat aldolaz; (3) gliseradehit-3-fosfat dehidrojenaz; (4) pirüvat kinaz; (5) laktat dehidrojenaz; (6) glukoz-6-fosfat dehidrojenaz; (7) 6-fosfo-glukonat dehidrojenaz; (8) fosfoketolaz; (9) asetaldehit dehidrojenaz ve (10) alkol dehidrojenaz. (Novik ve ark., 2017)

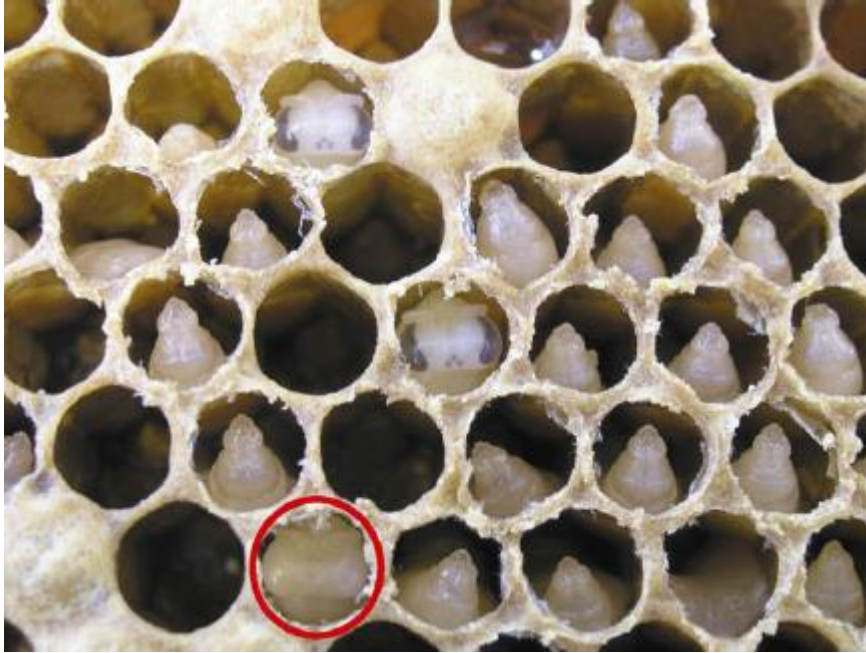
### 2.5.3 Fruktofilik laktik asit bakterileri

Fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), diğerk laktik asit bakterilerinin aksine büyüme substratı olarak glikoz yerine fruktozu kullanmayı tercih etmektedir. Bu nedenle FLAB çiçekler, meyveler gibi fruktoz açısından zengin maddelerden elde edilen fermente gıdalarda bulunmaktadır. Ayrıca fruktozla beslenen böceklerin bağırsaklarında yüksek sayıda FLAB hücresine rastlanmaktadır. (Endo ve ark., 2018) FLAB ortamda tek karbon kaynağı glikoz olduğunda oldukça zayıf büyürken; pirüvat, oksijen, fruktoz gibi harici elektron alıcısı olduğunda oldukça iyi büyümektedir. Biyokimyasal olarak obligat heterofermentatif laktik asit bakterileri arasında yer almaktadır. (Endo & ark., 2012)

### 2.6 Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı (AFB)

#### 2.6.1 AFB' nin tanımı

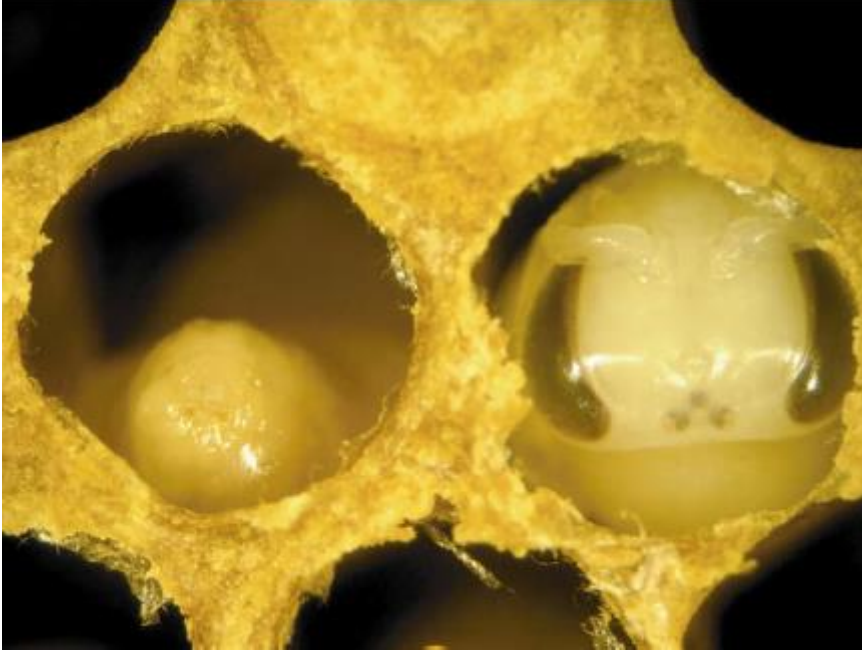
Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığı, sporlu bir bakteri olan *Paenibacillus larvae* nin neden olduğu bal arıları etkileyen (*Apis mellifera*, *Apis herana*) bulaşıcı bir hastalıktır. Kovanlardaki enfekte olan kuluçkalarda çürüme görülür. Dünya çapındaki tüm arıcılar için ciddi bir sorundur. AFB, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü Office International des Epizooties'in (OIE) B listesinde sınıflandırılmıştır. Liste B hastalıklar, ülkeler içinde sosyo-ekonomik ve/veya halk sağlığı açısından önemi kabul edilen ve uluslararası hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretinde önemli olan bulaşıcı hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. (Graaf ve ark., 2006)



Resim 2.1 Enfekte olmamış larvalar ve sonrasında oluşan kara gözlü pupalar. Kırmızı halka ile gösterilen enfekte olmuş pupa. (Rauch ve ark., 2009)



Resim 2.2 Aynı yaştaki sağlıklı pupa (solda) ve enfekte olmuş pupa (sağda). (Genersch, 2010)

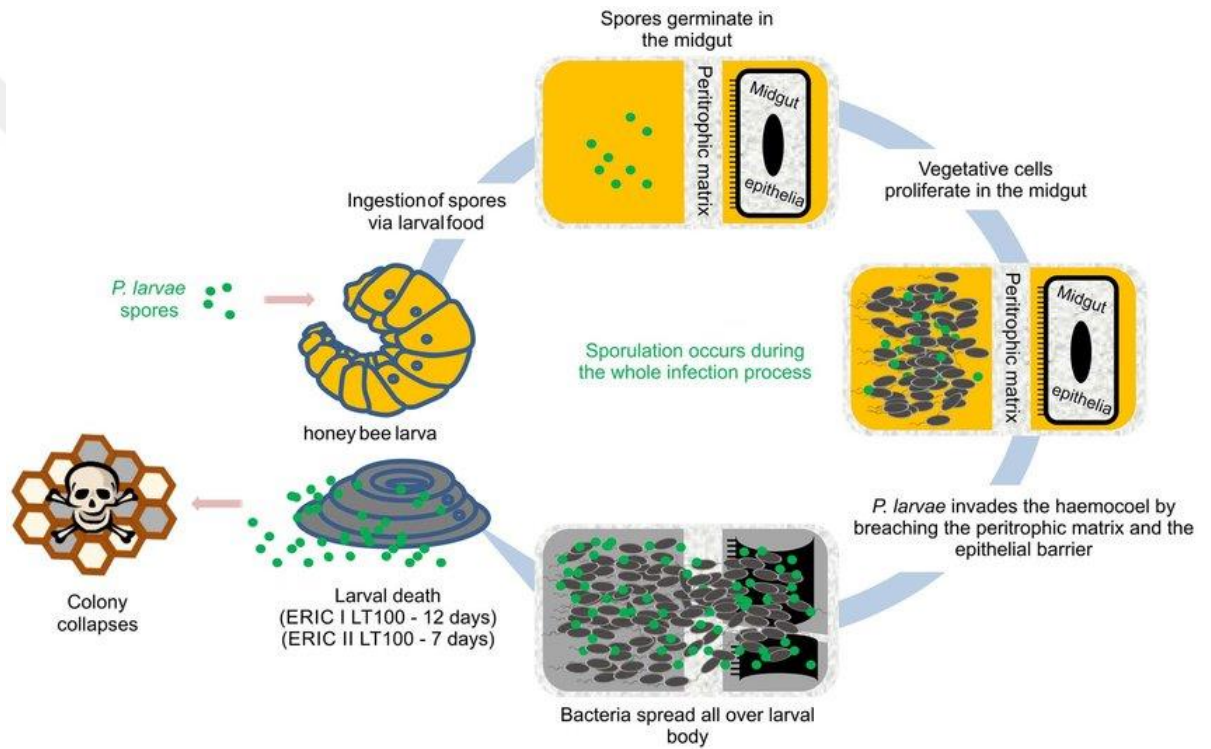


Resim 2.3 Enfekte bir larvadan alınan ip kütlesi (solda) ve aynı yaşta sağlıklı bir kara gözlü pupa (sağda)

### 2.6.2 AFB'nin etki mekanizması

Amerikan Yavru Çürüklüğü, bakteriyel bir hastalıktır ve bu hastalığın etkeni isimli gram pozitif, sporlu bir bakteridir. Hastalık, *P. larvae*'nin endosporları ile bulaşmaktadır. Endosporlar sadece arı larvaları için bulaşıcıdır. Larvaların enfeksiyona en duyarlı oldukları dönem erken larva (yumurtadan çıktıktan sonra 12-36 saat aralığı) evresidir. Larvanın

enfekte olması için on adet civarı endosporun ağızdan alınması yeterli olmaktadır. Larvanın yuttuğu sporeler ön bağırsaktan geçtikten sonra orta bağırsakta filizlenir. Vejetatif bakteriler orta bağırsakta kolonize olarak kitlesel olarak çoğalır. Peritrofik zar bakterilerin orta bağırsakta tutunmasını sağlamaktadır. Bakteriler sahip oldukları proteazlar sayesinde hücre-hücre ve hücre-matris bağlantı yapılarını bozar. Paraselüler boşluktan hareket ederek hemosöle geçer ve hemosölü istila ederler. *P. larvae*'nin sahip olduğu aktif hücre dışı proteazların bir diğer işlevi ise larva kalıntılarının daha sonra kahverengimsi, yarı sıvı, tutkal benzeri bir kolloide bozunması sağlamaktır. Bozunmuş olan larva hastalık bulaşmasını sağlayan milyonlarca spore içermektedir. Sporeler 35 yıldan fazla bir süre bulaşıcı kalmaktadır ve sıcak, soğuk, nem gibi zorlu şartlara oldukça dayanıklıdır. (Genersch, 2010)



Resim 2.4 *P.larvae*'nin enfeksiyon mekanizması

## 2.6.3 AFB ve tedavisi için doğal stratejiler

### 2.6.3.1 Uçucu yağlar

Uçucu yağlar (EO), bitkilerin uçucu bileşenleridir. Hoş aromatik kokuya sahip, genellikle keskin tadı olan sıvı maddelerdir. Teknik açıdan yağ olarak sınıflandırılırsalar da bazılarının kıvamı su veya alkolü andırırken, bazılarının kıvamı ise yapışkan ve sümüksüdür. Hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler, esterler, fenolik esterler ve diğer alifatik ve siklik bileşikler gibi organik bileşiklerden oluşmaktadır. (Baudoux, 2000)

Bitkilerin ikincil metabolitleri olan uçucu yağlar; hücrelerde, hücreler arası boşluklarda, çeşitli organlarda, parankimöz dokularda bulunurlar ve salgı bezlerinde, salgı tüylerinde üretilmektedirler. EO'lar; yapraklar, yapraklar, ağaç veya ağaç kabuğu, kökler veya yeraltı parçaları, reçine ve tohumlardan ekstrakte edilebilmektedir. Özellikle; *Daucaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae* ve *Silenaceae* familyalarından bitkiler tarafından üretilmektedir. (Rafiei & Rajaei, 2007)

EO'ların karakteristik bir özelliği, bakteri hücrelerinin membran lipidlerine bağlanmalarına izin veren hidrofobik özellikleridir. Bu, hücre zarlarının geçirgenliğini artırır ve hasarlarına neden olmaktadır. Hücreden iyonların ve diğer bileşenlerin salınımı artar, bu da hücre ölümüne yol açan homeostaz bozuklukları ile sonuçlanır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı daha kalın (yaklaşık 20 nm) olmasına rağmen yapısı daha basittir bu yüzden Gram pozitif bakteriler, EO'ların etkisine Gram negatif bakterilerden daha duyarlıdır.

Bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkisi, yapısal konfigürasyonları ve onları oluşturan fonksiyonel gruplarla ilgilidir ancak patojenlere karşı inhibitör aktivitesini araştırırken, bal arıları üzerindeki potansiyel toksik etkilerini göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Antimikrobiyal etkiye sahip uçucu yağlara örnek olarak; *Origanum vulgare*'te bulunan karvakrol ve *Thymus vulgaris*'te bulunan timol örnek verilebilir. (Kuzyšinová ve ark., 2016)

#### 2.6.3.2 Yağ asitleri

İnsanların ve hayvanların sağlığını olumlu yönde etkilemek için kullanılacak başka bir alternatif doğal karakter yöntemi, yağ asitlerine (FA) dayanmaktadır. FA'ler, R-COOH genel formülüne sahip alifatik (kural olarak daha yüksek) monokarboksilik asitler olarak tanımlanır; burada R, farklı uzunlukta uzun bir karbonhidrat zinciridir. Doğada, kompleks lipidlerin (fosfolipidler, açilgliseroller, trigliseritler) bir parçası olarak, çoğunlukla esterlenmiş formda yüzden fazla FA bulunmaktadır. Bir zincirdeki çift bağlar açısından, doymuş (örneğin palmitik ve stearik) ve doymamış yağ asitleri olarak ikiye (örneğin oleik, linoleik, araşidonik) ayrılmaktadır. (Rustan & Drevon, 2005)

FA'lerin önemli bir özelliği, bakteri hücre duvarı üzerinde hareket etme yetenekleridir. Bakteri hücreleri düzeyindeki etki mekanizmaları, zar lipidlerine entegre olma ve hücre zarlarının geçirgenliğini değiştirme yeteneklerinden oluşur, bu da homeostaz bozukluklarına ve ardından hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Linoleik ve oleik asit seçilmiş Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktivitesini incelemiştir ve örnek olarak verilebilir. (Dilika, Bremner, & Meyer, 2000)

FA'lar bal arısı beslenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Büyümeleri, gelişmeleri, üremeleri ve sağlıkları için kaçınılmazdırlar. Arı sütü ile birlikte arı larvalarına verilen polen, mükemmel bir FA kaynağıdır. Diğer asitlerin yanı sıra öncelikle oleik, palmitik, linoleik ve araşidonik asitleri içerir.

Bununla birlikte, polenlerdeki bireysel FA'ların içeriğinin coğrafi alana ve yerel bitki örtüsüne göre değişebileceği belirtilmelidir. (Bastos ve ark., 2015) Polenden izole edilen doymuş ve doymamış yağ asitlerinin antimikrobiyal aktivitesini araştırılmış ve test edilen 40 asitten en yüksek aktivite laurik, palmitoleik ve linoleik asitlerde gözlenmiştir. Bu araştırma bal arılarının gıda yoluyla bağışıklıklarının güçlendirilebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Yapılan farklı çalışmalar FA'ların *P.larvae*'yi inhibe edebileceğini göstermiştir. Enfeksiyondan önce polenle beslenen larvalar, kontrol grubuna göre %20 daha düşük ölüm oranına sahiptir. (Kuzyşinová ve ark., 2016)

#### 2.6.3.3 Propolis

Bal arıları tarafından kovan duvarlarını ve girişini kapatmak için üretilen bitki reçinelerinden elde edilen doğal bir üründür ve koloninin farklı patojenlere karşı korunmasına katkıda bulunmaktadır. Farklı kimyasal bileşiklerin (80'den 300'e kadar) karmaşık bir karışımından oluşmaktadır. Propolisin ana bileşenlerinin konsantrasyonları, coğrafi ve botanik kökenine göre değişmektedir. Antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, hepatoprotektif, immünomodülatör ve antiinflamatuvar gibi çeşitli biyolojik özellikler propolise atfedilmiştir. Bu özellikleri sayesinde, AFB'yi kontrol etmek için *P.larvae*'e karşı antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır. (Alonso-Salces ve ark., 2017)

#### 2.6.3.4 Arı sütü

Arı sütü, işçi bal arılarının hipofaringeal ve mandibular bezleri tarafından salgılanan kraliçe larva ve işçi larvalarının larva diyetidir. Ana bileşenleri karbonhidratlar, peptitler, proteinler, yağlar ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Arı sütünde bulunan düşük moleküler ağırlıklı proteinler ve peptitler, bal arısı patojenlerine karşı savunmada rol oynamaktadır. Arı sütünde tanımlanan ilk antibiyotik bileşik, yağ asidi 10-hidroksi- $\Delta^2$ -dekenoik asittir. Daha sonra royalisin (şu anda defensin1 olarak adlandırılır) adlı güçlü bir antibakteriyel protein de tanımlanmıştır. Royalisin, düşük konsantrasyonlarda çeşitli gram-pozitif bakterilere karşı spesifik aktiviteye sahiptir. Özellikle, farklı coğrafi kökenlerden gelen arı sütünün *P.larvae* e karşı in vitro antimikrobiyal aktivitesi de literatürde bildirilmiştir. (Alonso-Salces ve ark., 2017)

#### 2.6.4 AFB ve probiyotikler

AFB gibi bulaşıcı bakteriyal hastalıklar dünya çapında arıcılık endüstrisine büyük zarar vermektedir. Hastalıkla mücadele için kullanılan yöntemlerden biri olan antibiyotik, arıların faydalı bağırsak mikrobiyotası içi toksik olduğundan ve arı ürünleri ile insanlara geçebileceğinden endişe kaynağıdır. Ayrıca antibiyotiklerin bilinçsiz kullanılması, antibiyotiğe dirençli *Paenibacillus larvae* suşlarının ortaya çıkmasıyla ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu durumdan dolayı antibiyotiklerin bal arısı endüstrisinde kullanımını çoğu ülkede yasaklanmıştır.

Bal arısı hastalıklarının tedavisi ve önlenmesi için alternatif ve doğal olan yöntem probiyotiklerin kullanılmasıdır. Arıların bağırsak mikrobiyotasında bulunan probiyotik mikroorganizmalar besin emiliminde ve bağışıklık fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır. Arıcılık endüstrisinde probiyotik takviyelerin kullanımı umut vermektedir.

Arıların sindirim sistemi, farklı türde mikrobiyal toplulukları içeren karmaşık bir ekosistemdir. Olgun bal arılarının gastrointestinal sistemi dört ana bölüme ayrılmaktadır: bal midesi, orta mide, ileum ve rektum. Gastrointestinal sistemin her bölümünde farklı bir mikrobiyota bulunmaktadır.

Bal arısının mikrobiyotası, polen tanelerinin parçalanması ve kullanılması ve toksik bileşiklerin parçalanması, vitamin sağlanması ve patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemek için bağışıklık sisteminin harekete geçirilmesi ile ilgilidir. Bal arısı gastrointestinal bakterileri, gıda türüne, coğrafi bölgeye, mevsime, yaşa göre değişmektedir. Yeni doğan işçi arıların sindirim sistemlerinde bakteri yoktur veya çok azdır; larvaların sindirim sistemindeki bakteriler, hemşire arıların beslenmesinden kaynaklanır.

In vitro çalışmalar, bal arısının mide-bağırsak yolundaki bir dizi faydalı bakterinin patojenleri uzaklaştırma kabiliyetine sahip olduğunu göstermiş ve faydalı bakteri suşlarının kurulmasının hastalığın önlenmesine yol açtığını öne sürmüştür. Bal arıları için probiyotik takviyelerin araştırılması ve geliştirilmesinin temel amacı hastalıkların azaltılması ve kontrolüdür. Bal üretimini artırmak ana amaç olarak görülmesede, kesinlikle hastalıkları azaltmak ve bal üretimini artırmak daha güçlü bir koloni oluşturacaktır. (Royan M. , 2019)

Bal arıları, patojenlerin hücre zarlarında kanallar oluşturarak hücre lizisine neden olan antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler) apidaesin, abaesin, hymenoptaesin ve defensin ailelerindeki katyonik peptitleri sentezler. AMP'ler, patojen büyümesi ve kopyalanması için gerekli olan enzimleri kısıtlamaktadır.

Bal arılarında oluşturdukları peptide göre iki ana defensin geni tanınır; defensin 1 ve 2, bazı Gram-negatif bakteriler ve mantarlar üzerinde de etkili olmalarına rağmen, daha çok Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkilidir. Patojenleri kontrol ettikleri ve baldaki ana antimikrobiyal faktör olduğu bilinmektedir. (Royan M. , 2019)

Arıların kendi mikrobiyotasında bulunan ve probiyotik olan *Lactobacillus sp.* türleri AFB tedavinde kullanılabilir. Tirozin ve ürik asit AFB etkeni olan *Paenibacillus larvae* sporlarının çimlenmesini sağlayan iki maddedir. *Lactobacillus spp.* ürikaz (EC 1.7.3.3), allantoinaz (EC 3.5.2.5) ve allantoikaz (EC 3.5.3.4) dahil olmak üzere ürik asit katabolizma enzimleri bakımından büyük ölçüde zengindir. *L.plantarum* ise tirozini parçalayabilen tirozin dekarboksilaz (EC 4.1.1.25) a sahiptir. *Lactobacillus sp.* arıların bağışıklık sistemlerini güçlendirirken aynı zamanda bu enzimleri salgılayarak *Paenibacillus larvae* sporlarının çimlenmesini engellemektedir. Ayrıca *Lactobacillus sp.* arılarda bulunan, antimikrobiyal peptit ve peritrofik matris ile ilgili kodlayan Def-1 geninin regülasyonunu sağlamaktadır. (Daisley ve ark., 2019)

## 2.7 Arı Keki

Son yıllarda meydana gelen iklim değişiklikleri, doğada yaşayan tüm canlı türlerini etkilediği gibi, çiçekli bitkilerle mutualist yaşamı olan bal arılarını da olumsuz etkilemektedir. İklim değişiklikleri nedeniyle meydana gelen sıcaklık, nem artışları veya azalışları bazı bitki türlerinin azalması, yok olması; bitki türlerinin çimlenme hızı, çiçeklenmesi, nektar ve polen salgılaması gibi fizyolojik faaliyetlerinin olumsuz etkilenmesine sebep olabilmektedir. (Thuiller ve ark., 2005) Tüm bu nedenlerle doğada bulunan veya ziraatı yapılan bitkilerdeki nektar ve polen salgılanmasının azalması veya olmaması; bal arısı kolonilerinde açlığa ve yavru yetiştirme faaliyetlerinin durmasına neden olduğu gibi, besin eksikliği nedeniyle de ergin ve yavru arıların bağışıklık sisteminin zayıflamasına, hastalık ve zararlıların kolonilerde daha hızlı etki etmesine neden olmaktadır. Bal arılarında görülen hastalık ve zararlıların sayısının giderek artması ve bunların mücadelesinde kullanılan kimyasallara karşı oluşan direnç ve kimyasal kalıntı problemi arı sağlığını ve aynı zamanda insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. (Oskay & Sönmez, 2017)

Bal arısı kolonilerinin; kolonilerinin ilkbahar aylarında yüksek arı popülasyonları geliştirmesi, ilkbahar bölmelerinin oluşturulması, sonbaharda kuluçka oluşumunu sağlayarak kışa genç işçi arı popülasyonu ile girilmesi, ana arı ve erkek arı yetiştirilmesi, zirai ilaç zehirlenmesinden sonra kolonilerin arı popülasyonunun iyileştirilmesi ve olumsuz koşullar sonucu oluşabilecek açlığın önlenmesi amacıyla polen ve bal beslemesi yapılabilmektedir.

Bu ek beslemeler, farklı teknik ve yem ham maddeleriyle hazırlanmış arı keki ve şurubu gibi alternatif besin kaynaklarıyla yapılmaktadır.

Türk Standardı Enstitüsü (TS 12064, 1996) tarafından hayvan yemleri kapsamında bal arısı keki standardı oluşturulmuştur. Bu standart incelendiğinde; arı keklerinin içerdiği ham maddeye göre 5 grupta sınıflandırıldığı bilinmektedir. Bunlar “Sade, Proteinli, Vitaminli, Polenli ve Kompoze” keklerdir.

Bu gruplarda kullanılması önerilen hammaddelerin; bal (süzülmüş), polen, pudra şekeri, süt tozu (yağsız), soya unu (yağsız), bira mayası (kuru), vitaminler (A, B kompleksi, C, E ve K3) ve mineral maddeler (P, K, Ca, Mg) olduğu belirtilmiştir.

Bal arıları ihtiyaç duydukları proteini doğadaki çiçeklerin polenlerinden karşılarlar. Koloni için polen; ana arının daha fazla yumurtlayarak yavrulu alanlarını arttırması için gereklidir. Ayrıca işçi arıların arı sütü salgılama bezlerinin, beyin, uçuş kasları vb. organlarının gelişmesini, bağışıklık sistemi proteinlerini oluşturarak arıların hastalıklara karşı dirençli olmasını sağlar. Hoffman ve ark., (2010) da yaptıkları çalışmada, proteinli arı kekleriyle beslenen arılardaki virüs düzeylerinin hiç beslenmeyenlere göre daha düşük düzeyde olduğunu, beslemede kullanılan proteinli arı keklerinde bulunan proteinlerin bağışıklık sisteminde rol oynadığını belirtmiştir. Bunun yanında arıların patojenlere karşı geliştirdikleri bireysel bağışıklık sistemlerinin parçası olan ve arıların kanında bulunan antimikrobiyal peptitlerin proteince zengin beslenmeyle ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. (DeGrandi-Hoffman ve Chen 2015)



Resim 2.5 Arı Kekİ

## 2.8 Kitosan ve Mikrokürecik Yöntemi

Kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir polimerdir. Selülozdan sonra yer yüzünde en fazla bulunan doğal bir polimerdir ve genellikle yengeç, ıstakoz, karides ve kril gibi deniz kabuklularının dış iskeletinden elde edilmektedir. Kitosan, beta-(1Y4) bağlarıyla bağlı 2-amino-2-deoksi-d-glukoz ve 2-asetamido-2-deoksid-glukoz birimlerinden oluşan bir kopolimerdir. (Yan Wang ve ark., 2005) Kitosanın Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş bir inhibisyon spektrumuna sahip olmakla beraber aynı zamanda memeli hücrelerine karşı toksisitesi oldukça azdır. (Kong ve ark., 2008)

Kitosanın ölçülü miktarlarda çok değerlikli anyon ile reaksiyona girmesi, kitosan molekülleri arasında çapraz bağlanmaya yol açmaktadır. Çapraz bağlama uygulanan yönteme bağlı olarak asidik, nötr ya da bazik ortamlarda gerçekleştirilebilmektedir. Bu çapraz bağlama, kitosan mikroküreciklerinin hazırlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Sinha ve ark., 2004)

Mevcut mikroküreciklerin üretim süreci, suda az çözünür olan kitosanın çözünürlük davranışına dayanmaktadır. Bir asidin eklenmesi, amino gruplarının protonlanmasının bir sonucu olarak çözünürlüğün artmasıyla sonuçlanmaktadır. Çözünürlük ayrıca çözültide bulunan diğer anyonlara da bağlıdır. Asetat, laktat veya glutamat varlığında kitosan iyi çözünürlük gösterirken fosfat, polifosfatlar ve sülfat çözünürlüğü azaltır. Bu nedenle mikroküre formülasyonu için sülfat kullanılmıştır. Sülfat, zayıf çözünür bir kitosan türevine yol açar, bu sayede mikroküre formülasyonu mümkün hale gelir. Yüksek kitosan konsantrasyonları viskoziteyi arttıracığından tercih edilmemektedir. Eklenen sodyum sülfatın homojen bir dağılımı mümkün olmaz ve bu da topakların oluşmasına yol açar. Süspansiyonları stabilize etmek için bir polisorbitat 80 ilavesi de oldukça önemlidir. Polisorbitat 80 ilavesi olmadan topaklanma problemi oluşmaktadır. (Berthold & ark., 1996)

### 3.MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan probiyotik mikroorganizmalar güncel literatürlerin taranması ile belirlenmiştir. Arı Kekine eklenmesi kararlaştırılan türler; *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus*'tur. Bu türler Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı stoklarından temin edilmiştir. Mikrokürecik deneylerinde kullanılan *L.plantarum*'un NCBI dan alınan Accession number ıOR252329dur.

#### 3.1.2 *Lactobacillus* türlerinin büyüülmesi için kullanılan besiyeri ve içeriği

Çalışmada *Lactobacillus sp.* için seçici besiyeri olan Merck MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) Agar ve Merck MRS Broth kullanılmıştır.

#### Çizelge 3. 2 MRS Broth

Bileşen	Miktarı g/L
D(+)-Glikoz	20,00
Pepton	10,00
Meat extract	5,00
Yeast extract	4,00
Di-PotasyumHidrojenFosfat	2,00
Tween80	1,00
Amonyum Hidrojen Sitrat	2,00
Sodyum Asetat	5,00
Magnezyum Sülfat	0,2
Mangan Sülfat	0,02

#### Çizelge 3. 2 MRS Agar

Bileşen	Miktarı g/L
D(+)-Glikoz	20,00
Pepton	10,00
Meat extract	5,00
Yeast extract	4,00

Di-PotasyumHidrojenFosfat	2,00
Tween80	1,00
Amonyum Hidrojen Sitrat	2,00
Sodyum Asetat	5,00
Magnezyum Sülfat	0,2
Mangan Sülfat	0,02
Agar	15

---

Ticari olarak temin edilen MRS Agar hazır besiyerinden litresinden 62,5 gram olacak şekilde suda çözdürülmüş, 1,5 atmosfer basınç altında 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. 45<sup>0</sup>C'ye soğutulup sonra petri kaplarına dökülmüştür.

### **3.1.3 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar**

Çalışmada; kitosan(Merck,Art 900344), Tween80(Merck,Art P1754), NaSO<sub>4</sub>(Merck,Art 238597) , Anaerocult™ A (Merck, Art 132381) kullanılmıştır.

### **3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar**

- Hassas Terazı (Denver Instrument): Ortam bileşenleri ve kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
- Otoklav (Hirayama Hiclave-HV 50L): Hazırlanan taze ortamların ve kullanılmış organizmalı besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
- Steril Kabin: Yapılan tüm ekim işlemlerinde kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır.
- İnkübatör (Memmert): Katı besiyerlerindeki organizmaların 37<sup>0</sup>C 'de geliştirilmesi için kullanılmıştır.
- Çalkalayıcı (New Brunswick Scientific Innova 4340): Sıvı ortamdaki mikroorganizmaların 37<sup>0</sup>C 'de 120 rpm'de büyütülmesinde kullanılmıştır.
- Densitometre (Grant bio): Aşı olarak kullanılacak mikroorganizmaların OD değerini ayarlamak için kullanılmıştır.
- Vortex (VWR): Mikroküreciklerde oluşan çapraz bağların kırılması için kullanılmıştır.
- Mikropipetler (Eppendorf): 10µl, 100µl ve 1000µl pipetler tüm düşük hacimdeki aktarım işlemlerinde kullanılmıştır.

- Santrifüj (Hettich): Erlenlerde hazırlanan sıvı kültürlerin çöktürülmesi için kullanılmıştır.
- Karıştırıcı(Daihan Scientific): Mikrokürecik metodunun yapılması için kullanılmıştır.
- Kuru Buz Cihazı(İZMAK): Mikrokürecik metodunun buz banyosunda yapılması için kullanılmıştır.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 *Lactobacillus* türlerinin inkübasyon koşulları

*Lactobacillus sp.* MRS Agar da 37<sup>0</sup>C de 48-72 saat anaerobik jar kullanılarak inkübe edilmiştir.

### 3.2.2 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi

MRS Broth' un karbon kaynağı değiştirilerek besiyeri manuel olarak hazırlanmıştır. Hazır besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan %2 oranındaki D(+)Glukoz yerine Melas ve F55( %55 Fruktöz+%45 Glukoz) kullanılmıştır. +4<sup>0</sup>C'de saklanan *Lactobacillus* türlerinin kültürlerinden MRS Agar plaklara ekim yapılarak, 48 saatlik taze kültürler hazırlanmıştır. Taze kültürlerden Densitometre cihazını kullanarak OD değeri 1 olan hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. 50 ml farklı içeriklere sahip erlenlere %5 kadar hücre süspansiyonu eklenmiştir. Erlenler belirlenen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmış ve maksimum büyüme gösterdiği belirlenen sürede erlenlerden 1'er ml alınarak seyreltme yapılmış, dökme plaka yöntemi ile kob/ml cinsinden sonuç hesaplanarak hangi besiyeri içeriğinde optimum büyüme gösterdiği belirlenmiştir.

### 3.2.3 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının ve süresinin belirlenmesi

#### 3.2.3.1 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

+4<sup>0</sup>C'de saklanan *Lactobacillus* kültürlerinden MRS Agar plaklara ekim yapılarak, 48 saatlik taze kültürler hazırlanmıştır. Taze kültürlerden Densitometre cihazını kullanarak OD değeri 1 olan hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. 50 ml MRS Broth içeren erlenlere %5 kadar hücre süspansiyonu eklenmiştir. Farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan erlenlerden aynı süre sonunda 1'er ml alınarak seyreltme yapılmış, dökme plaka yöntemi ile kob/ml cinsinden sonuç hesaplanarak hangi sıcaklıkta optimum büyüme gösterdiği bulunmuştur.

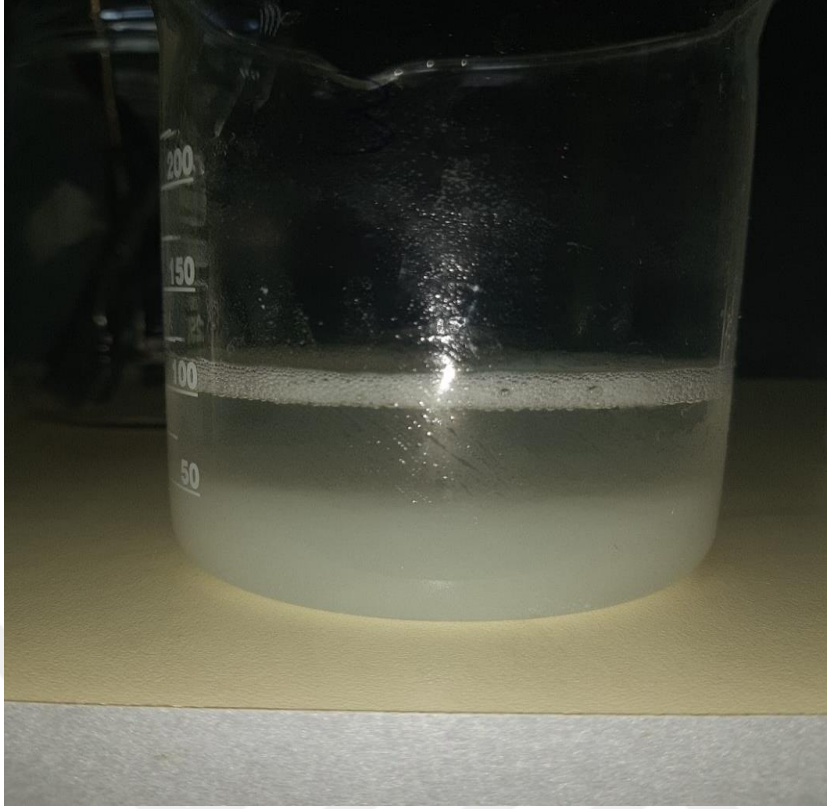
### 3.2.3.2 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

+4° C’de saklanan *Lactobacillus* kültürlerinden MRS Agar plaklara ekim yapılarak, 48 saatlik taze kültürler hazırlanmıştır. Taze kültürlerden Densitometre cihazını kullanarak OD değeri 1 olan hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. 50 ml MRS Broth içeren erlenlere %5 kadar hücre süspansiyonu eklenmiştir. Erlenler belirlenen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden 16, 20 ve 24. Saatlerde 1’er ml alınarak seyreltme yapılmış, dökme plaka yöntemi ile kob/ml cinsinden sonuç hesaplanarak kaçınıcı saatte maksimum sayıda büyüme gösterdiği belirlenmiştir.

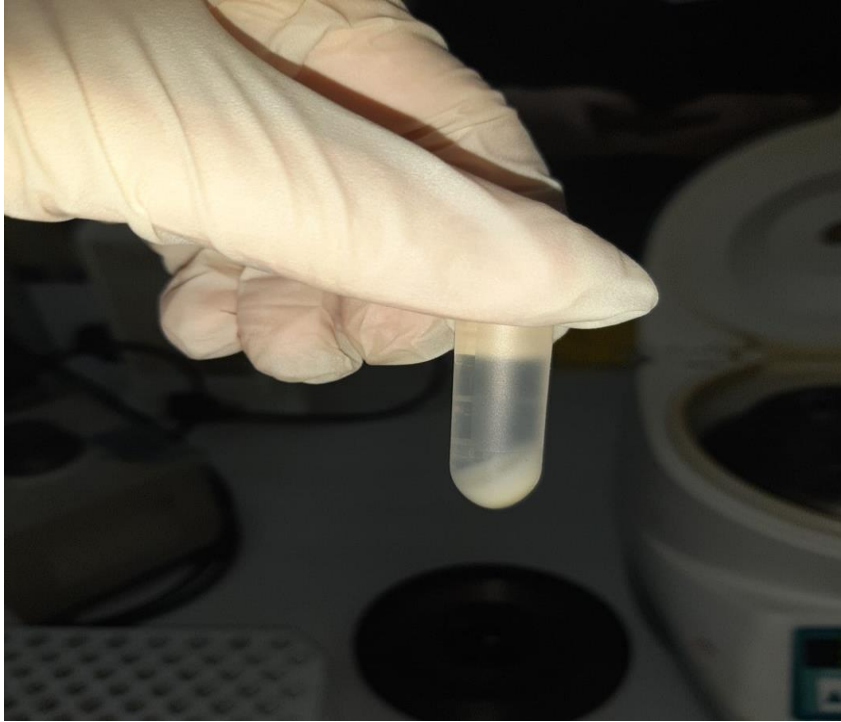
### 3.2.4 *Lactobacillus* türlerinin arı kekine eklenmesi ve stabilizasyonun sağlanması

+4° C’de saklanan *Lactobacillus* kültürlerinden MRS Agar plaklara ekim yapılarak, 48 saatlik taze kültürler hazırlanmıştır. Taze kültürlerden Densitometre cihazını kullanarak OD değeri 1 olan hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. 50 ml MRS Broth içeren erlenlere %5 kadar hücre süspansiyonu eklenmiştir. Erlenler 37°C de ortalama 18 saat inkübasyon sonrası, 3000rpm de 15dk santrifüj ile elde edilmiştir. Daha sonrasında süpernatant atılarak pellet +4° C’de muhafaza edilmiştir.

Behere 100 ml 0,1M asetik asit hazırlanmıştır. Beher buz banyosuna yerleştirilerek karıştırıcıya konulmuştur. 0,1 gram kitosan eklenmiş, çözünene kadar beklenmiştir. 1ml Tween80 eklendikten sonra önceden hazırlanan *Lactobacillus* pelleti üzerine aktarılmıştır. %20 lik NaSO<sub>4</sub> çözeltisi şırınga ile damlatılarak eklenmiştir. Stabilizasyonun sağlanması amacıyla gliserol eklenmiştir. 1 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. (Hejazi & Amiji, 2001) Beherde çöken tabakadan steril ependorfa 2ml alınmış, ardından 3000 rpm de 5dk çöktürülmüştür. Süpernatant döküldükten sonra pellet 0.5 gram arı kekine eklenmiştir. Stabilizasyonun sağlanması için ayrı ayrı mikrokürecik metodu gerçekleştirilen beherlere %0,5, %1 ve %2 gliserol eklenmiştir. Çözeltilerin soğuk ve steril olarak kullanılmıştır.



Resim 3.1 Mikrokürecik metodu ile kaplanmış *Lactobacillus plantarum* 'un görüntüsü



Resim 3.2 Mikrokürecik metodu ile kaplanmış *Lactobacillus plantarum* 'un ependrofta çöktürülmüş halinin görüntüsü



Resim 3.3 Arı kekine eklenmiş Mikrokürecik metodu ile kaplanmış *Lactobacillus plantarum*'un görüntüsü

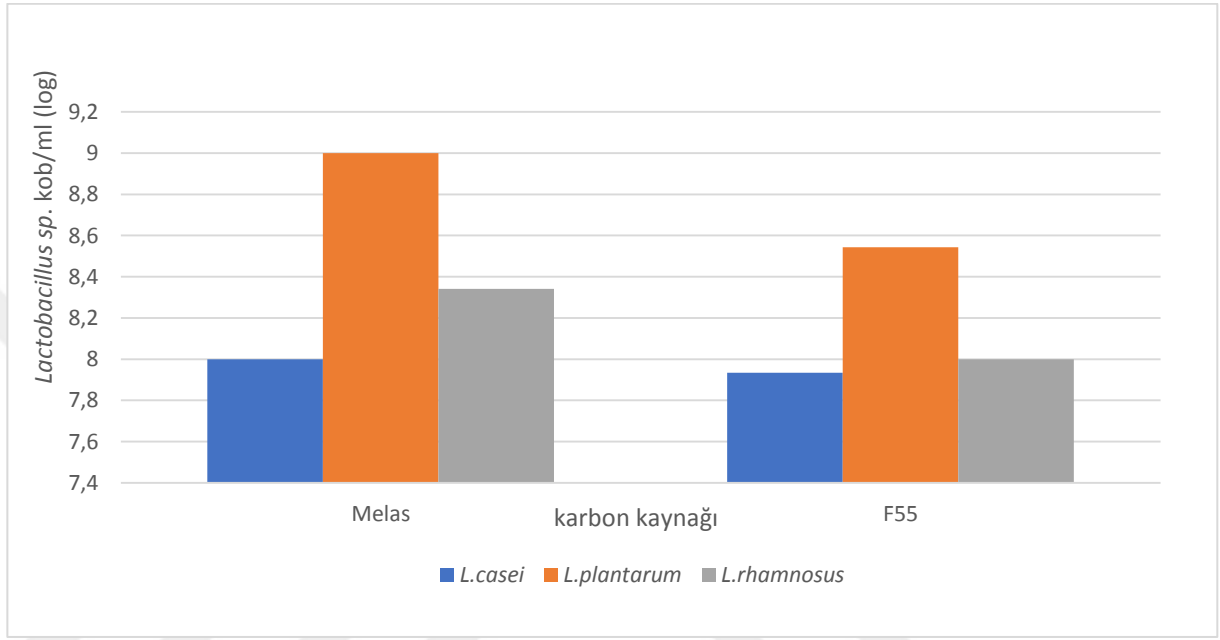
### 3.3 Raf Ömrü Çalışması

Raf ömrü çalışması için 14,30,45,60 ve 90.günlerde sayım yapılması amacıyla ayrı ayrı ependorflara Arı kekine eklenmiş Mikrokürecik metodu ile kaplanmış *Lactobacillus plantarum* konularak +4°C ye kaldırılmıştır.

## 4. Bulgular

### 4.1 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları

Alternatif karbon kaynağı olarak kullanılması planlanan Melas ve F55 ayrı ayrı besiyerine eklenerek erlenler hazırlanmıştır. Erlenlerden 24 saat sonunda örnek alınmış ve seri seyreltme yapılarak sonuçlar kob/ml olarak hesaplanmıştır.



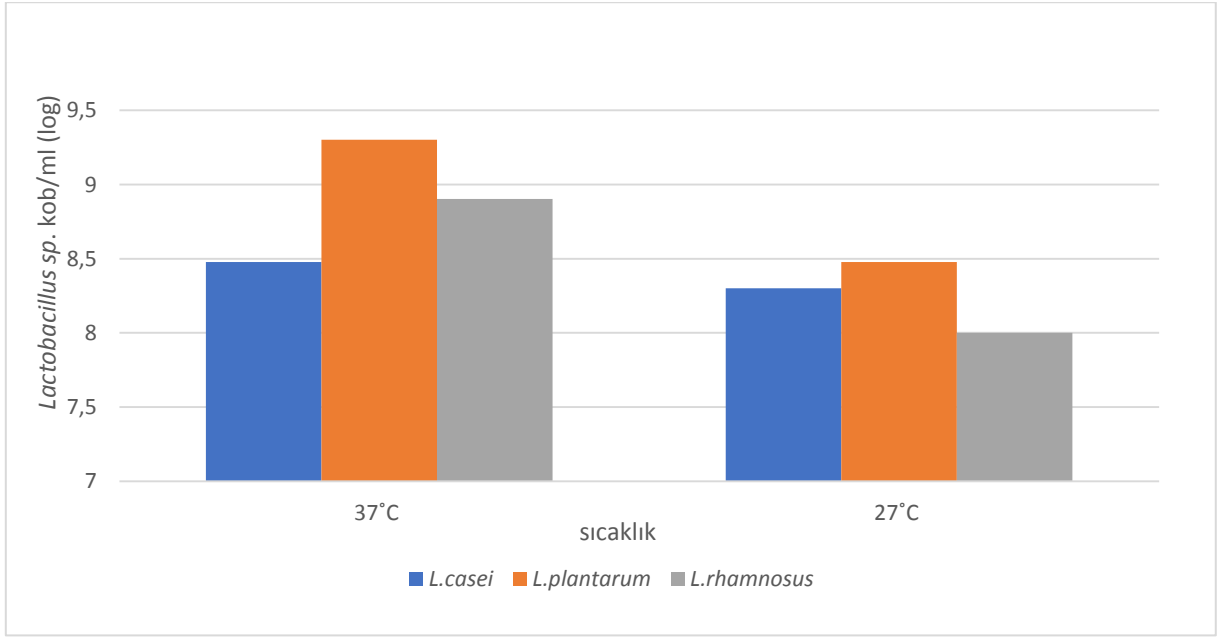
Grafik 4.1 Modifiye MRS Broth için alternatif karbon kaynağının belirlenmesi grafiği

Sayım sonuçlarına göre *Lactobacillus casei* 'nin 24 saat sonunda karbon kaynağı olarak F55 kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı  $8,6 \times 10^7$  kob/ml iken karbon kaynağı olarak Melas kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı ise  $1,0 \times 10^8$  kob/ml'dir. *Lactobacillus plantarum*'un 24 saat sonunda karbon kaynağı olarak F55 kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı  $3,5 \times 10^8$  kob/ml iken karbon kaynağı olarak Melas kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı ise  $1,0 \times 10^9$  kob/ml'dir. *Lactobacillus rhamosus*'un ise 24 saat sonunda karbon kaynağı olarak F55 kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı  $1,0 \times 10^8$  kob/ml iken karbon kaynağı olarak Melas kullanılan besiyerindeki canlılık miktarı ise  $2,2 \times 10^8$  kob/ml'dir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde canlılık miktarları karbon kaynağı Melas olarak kullanılan besiyerinde daha fazla olduğundan dolayı kullanılacak olan karbon kaynağı Melas olarak belirlenmiştir.

## 4.2 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının ve süresinin belirlenmesi için yapılan deneme sonuçları

### 4.2.1 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları

*Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan deneme için 27°C ve 37°C olacak şekilde iki ayrı sıcaklık seçilmiştir. Hazırlanan erlenlerden 24 saatlik inkübasyon sonrasında örnek alınmış ve seri seyreltme yapılmıştır. Sonuçlar kob/ml cinsinden hesaplanmıştır.



Grafik 4.2 *Lactobacillus* türlerinin Modifiye MRS Broth'ta optimum inkübasyon sıcaklığını saptama grafiği

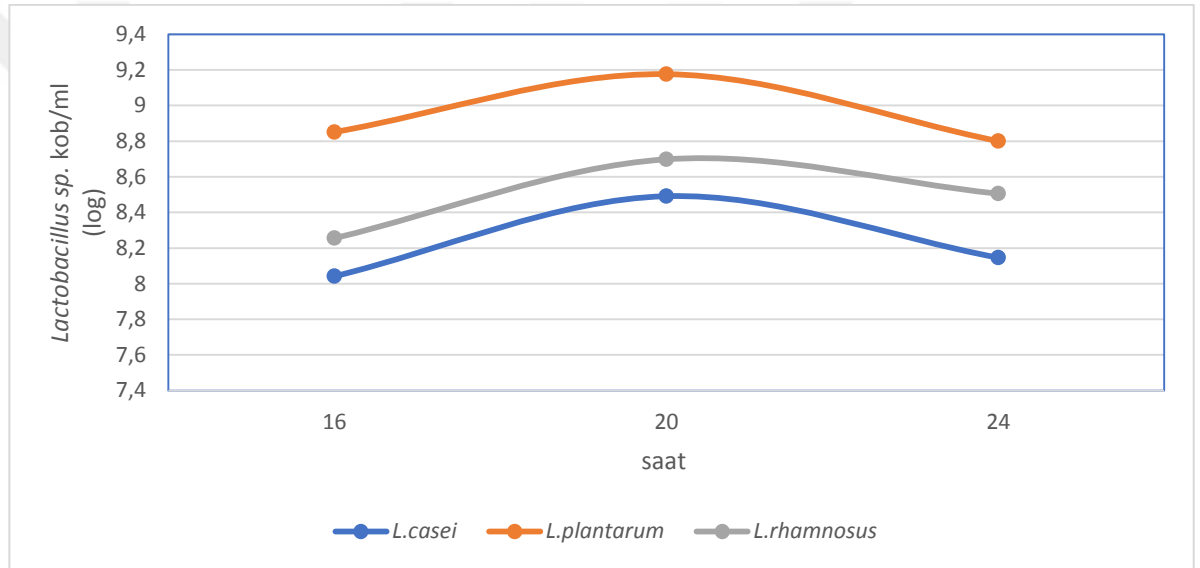
Sayım sonuçlarına göre *Lactobacillus casei* 'nin 24 saat sonunda 27 °C canlılık miktarı  $2,0 \times 10^8$  kob/ml iken 37°C de ise  $3,0 \times 10^8$  kob/ml'dir. *Lactobacillus plantarum* 'un 24 saat sonunda 27°C canlılık miktarı  $3,0 \times 10^8$  kob/ml iken 37°C de ise  $2,0 \times 10^9$  kob/ml'dir. *Lactobacillus rhamnosus* 'un ise 24 saat sonunda 27°C canlılık miktarı  $1,0 \times 10^8$  kob/ml iken 37°C de ise  $8,0 \times 10^8$  kob/ml'dir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde canlılık miktarları 37°C'de daha fazla olduğundan dolayı optimum inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak belirlenmiştir.

## 4.2.2 *Lactobacillus* türlerinin optimum büyüme süresinin belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları

### 4.2.2.1 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin Toplam Koloni Sayımı hesaplanarak belirlenmesi

*Lactobacillus* türlerinin optimum büyüme süresini belirlemek amacıyla yapılan deneme için 16 saat, 20 saat, 24 saat olacak şekilde ardışık üç farklı inkübasyon süresi seçilmiştir.

Hazırlanan erlenler 37 °C de inkübasyona bırakılmış, belirlenen sürelerde örnek alınarak seri seyreltme yapılmış ve sonuçlar kob/ml cinsinden hesaplanmıştır. Sayım sonuçlarına göre *Lactobacillus* türlerinin optimum büyüme süresi 20 saat olarak belirlenmiştir.

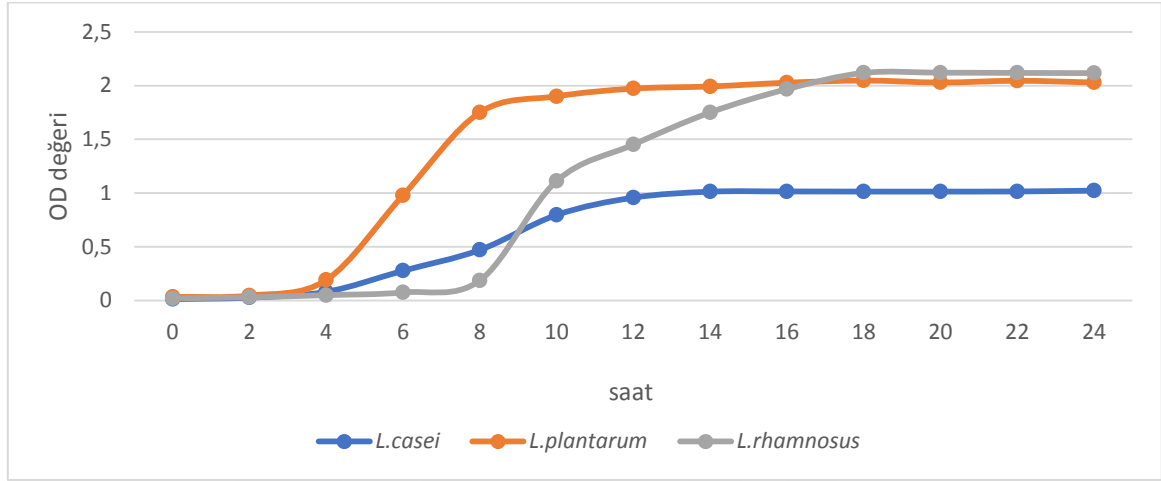


Grafik 4.3 *Lactobacillus* türlerinin Modifiye MRS Broth'ta optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi grafiği

Sayım sonuçlarına göre *Lactobacillus casei* 'nin 16 saat sonunda canlılık miktarı  $1,1 \times 10^8$  kob/ml iken 20 saat sonunda  $7,1 \times 10^8$  kob/ml ye çıkmış, 24 saat sonunda ise  $1,8 \times 10^8$  e düşmüştür. *Lactobacillus plantarum* 'un 16 saat sonunda canlılık miktarı  $3,1 \times 10^8$  kob/ml iken 20 saat sonunda  $1,5 \times 10^9$  kob/ml ye çıkmış, 24 saat sonunda ise  $3,2 \times 10^8$  e düşmüştür. *Lactobacillus rhamnosus* 'un 16 saat sonunda canlılık miktarı  $1,4 \times 10^8$  kob/ml iken 20 saat sonunda  $1,0 \times 10^9$  kob/ml ye çıkmış, 24 saat sonunda ise  $5,0 \times 10^8$  e düşmüştür. Optimum inkübasyon süresi Toplam koloni sayımı ile belirlenmek istendiğinde optimum süre 20 saat olarak saptanmıştır.

#### 4.2.2.2 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin Spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmesi

*Lactobacillus* türlerinin optimum büyüme süresini belirlemek amacıyla yapılan denemede hazırlanan erlenlerden her iki saatte bir örnek alınmış, spektrofotometre cihazı kullanılarak 600nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin 16-18 saat olduğu anlaşılmıştır.



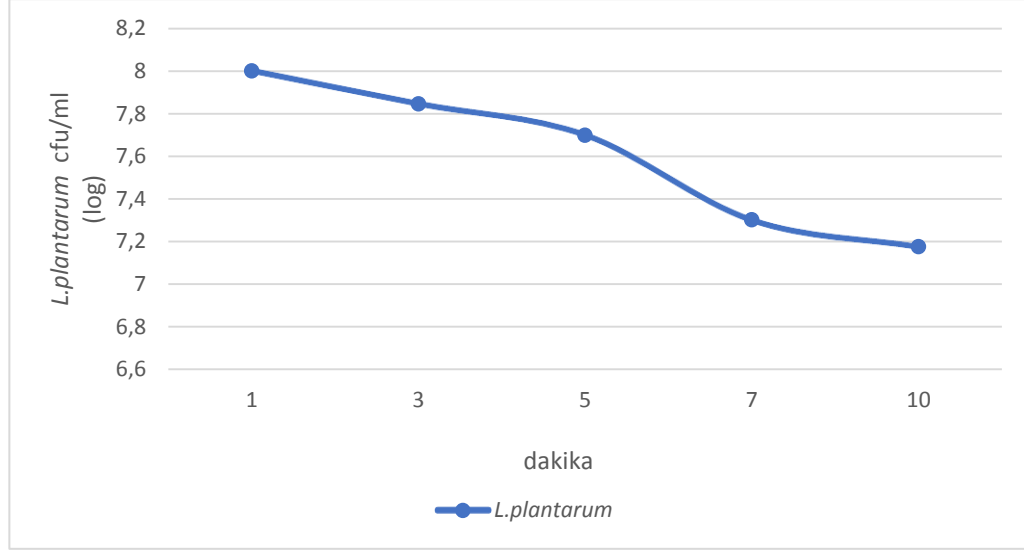
Grafik 4.4 *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon süresinin spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmesi grafiği

### 4.3 *Lactobacillus plantarum*'un Arı Keki'ne mikrokürecik metoduyla eklenmesi için yapılan denemelerin sonuçları

*Lactobacillus* türlerinin Arı Keki'ne mikrokürecik metoduyla eklenmesi için yapılan denemelerde *L.plantarum* referans organizma olarak seçilmiş ve kullanılmıştır. *L.plantarum* arı kekine mikrokürecik olmadan eklendiğinde canlılık  $1,0 \times 10^4$  kob/gr'dır.

#### 4.3.1 *L. plantarum*'un mikrokürecik ile arı kekine eklenmesinden sonra çapraz bağların koparılması

*L. plantarum*, Arı Keki'ne mikrokürecik yöntemiyle eklendikten sonra Toplam Canlı Sayımı yapılması gerekmektedir. Mikroküreciklerde oluşan çapraz bağların koparılması için vorteks yapılmıştır. Optimum vorteks süresinin belirlenmesi için 1dk,3dk,5dk,7dk ve 10 dk vorteks yapılmış ardından seri seyreltme yapılarak canlılık kob/ml cinsinden hesaplanmıştır.



Grafik 4.5 Vorteks işlemi sonrası canlılık grafiği

Sayım sonuçları; 1dakika vorteks yapılması durumunda  $1,0 \times 10^8$  kob/ml, 3 dakika vorteks yapılması durumunda  $7,0 \times 10^7$  kob/ml, 5 dakika vorteks yapılması durumunda  $5,0 \times 10^7$  kob/ml, 7 dakika vorteks yapılması durumunda  $2,0 \times 10^7$  kob/ml, 10 dakika vorteks yapılması durumunda ise  $1,5 \times 10^7$  kob/ml'dir. Bu denemenin sonucunda Mikroküreciklerde oluşan çapraz bağların koparılması için 1 vorteks yapılmasının yeterli olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.3.2 Mikrokürecik metodunda karıştırma süresinin belirlenmesi için yapılan denemenin sonuçları

Mikrokürecik metodu yapılırken aşağıda sıralanan maddelere uygun olarak örnek alınmış, seri seyreltme yapılarak sonuçlar kob/ml cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 1 saat karıştırma süresinin yeterli olduğu anlaşılmıştır.

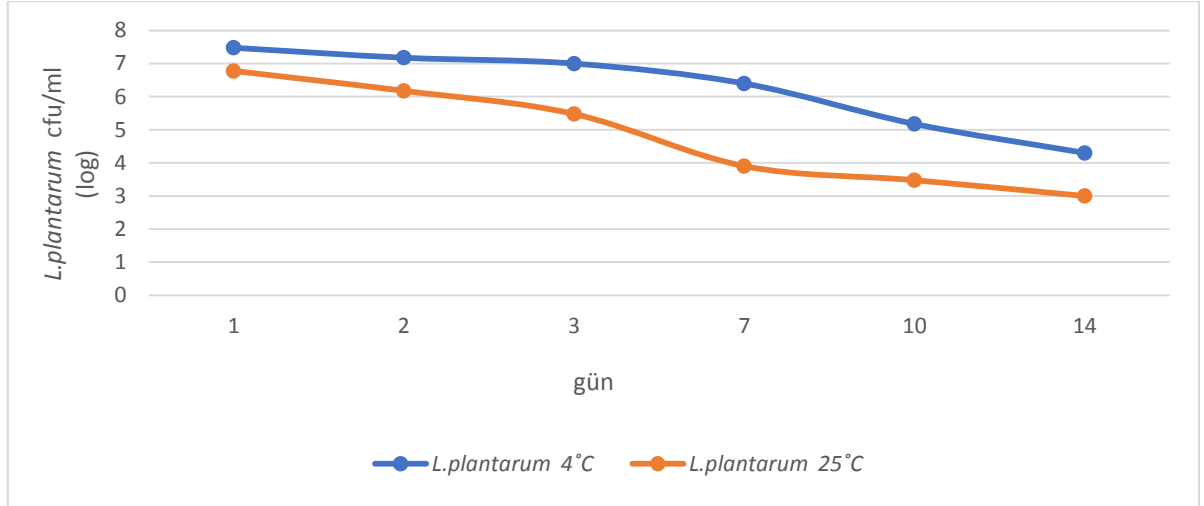
- A-Organizmanın sayısının belirlenmesi amacıyla yapılan seyreltme
- B-Mikrokürecik başlatıldı organizma koyulduktan sonra hemen örnek alındı
- C-1 saat sonra örnek alındı
- D-1 saat sonra örnek alındı, 0,5 gr arı kekine eklendi
- E-3 saat sonra örnek alındı
- F-3 saat sonra örnek alındı, 0,5 gr arı kekine eklendi

Madde	Sonuç (Kob/ml)
A	$3,0 \times 10^8$
B	$2,0 \times 10^8$
C	$5,2 \times 10^8$
D	$1,0 \times 10^8$
E	$2,0 \times 10^8$
F	$2,0 \times 10^8$

Çizelge 4.1 Karıştırma süresinin belirlenmesi için yapılan deneme sonuçları

### 4.3.3 Mikrokürecik içeren Arı Keki'nin saklama koşullarının belirlenmesi

Saklama koşullarının belirlenmesi amacıyla *L.plantarum* içeren mikrokürecikler arı kekine eklendikten sonra 4°C ve 25°C de 14 gün boyunca saklanmıştır. 1.gün, 2.gün, 3.gün, 7.gün, 10.gün ve 14.gün de örnek alınmıştır. Alınan örneklerden seri seyreltme yapılmış ve sonuçlar kob/ml cinsinden hesaplanmıştır.

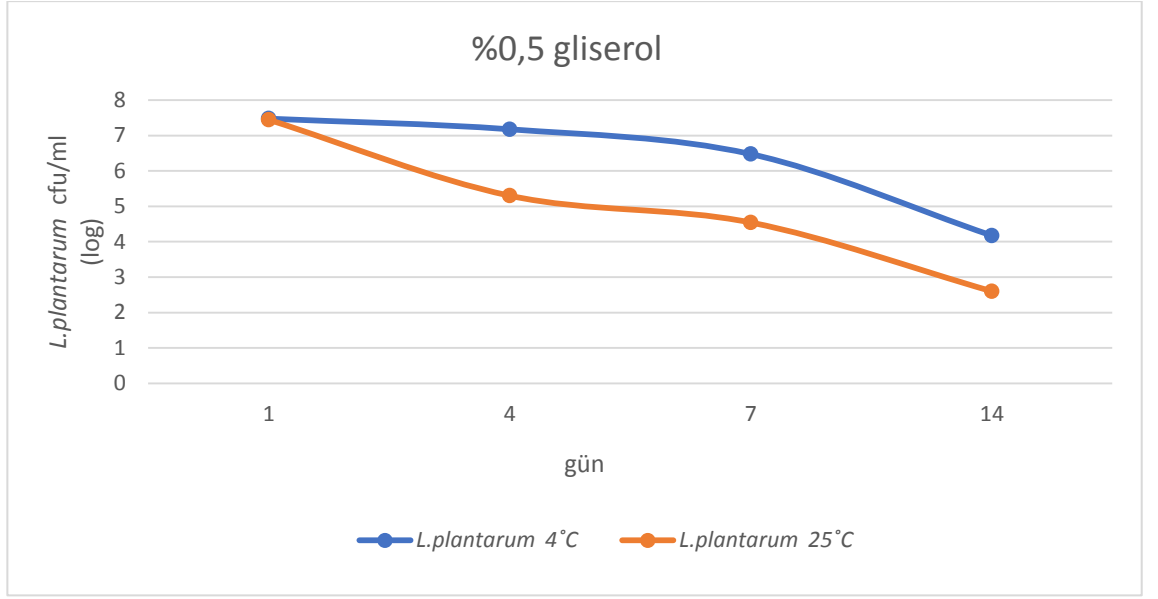


Grafik 4.6 Saklama koşullarının belirlenmesi için yapılan denemenin sonuç grafiği

Sayım sonuçları; +4°C saklama koşulunda ve 1. Gün  $3,0 \times 10^7$  kob/ml, 2.gün  $1,5 \times 10^7$  kob/ml, 3.gün  $1,0 \times 10^7$  kob/ml, 7.gün  $2,5 \times 10^6$  kob/ml, 10.gün  $1,0 \times 10^5$ , 14.gün ise  $2,0 \times 10^4$  kob/ml'dir. 25°C saklama koşulunda ve 1. Gün  $6,0 \times 10^6$  kob/ml, 2.gün  $1,5 \times 10^6$  kob/ml, 3.gün  $3,0 \times 10^5$  kob/ml, 7.gün  $8,0 \times 10^3$  kob/ml, 10.gün  $3,0 \times 10^3$  kob/ml, 14.gün ise  $1,0 \times 10^3$  kob/ml'dir. Sonuçlar incelendiğinde canlılık miktarının daha iyi korunduğundan dolayı mikroküreciklerin 4°C de saklanması gerektiği anlaşılmıştır.

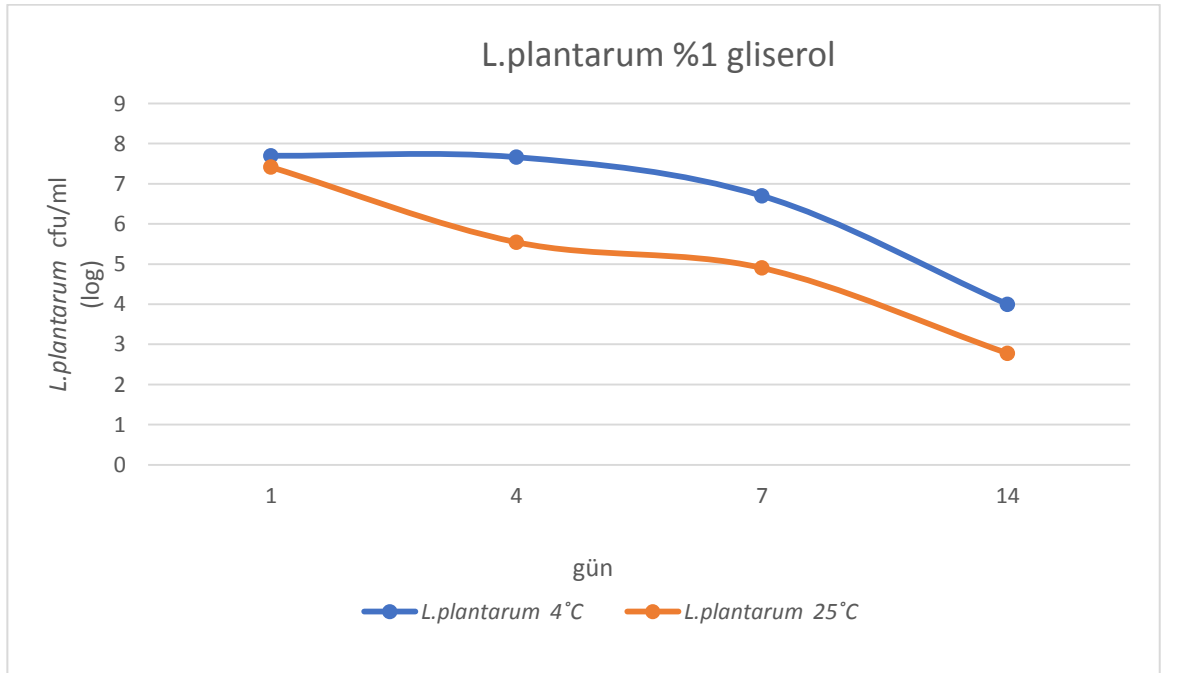
### 4.3.4 *L.plantarum* içeren mikroküreciklerin arı kekinde stabilizasyonunun sağlanması için yapılan denemenin sonuçları

*L.plantarum* içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde stabilizasyonunun sağlanması amacıyla mikrokürecik metodunun karıştırma süresi başında %0,5, %1 ve %2 oranında gliserol eklenmiştir. 4°C de muhafaza edilen örneklerden 1.gün, 4.gün,7.gün ve 14.gün seri seyreltme yapılarak kob/ml cinsinden sonuç hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde en uygun gliserol yüzdesinin %2 olduğu belirlenmiştir.



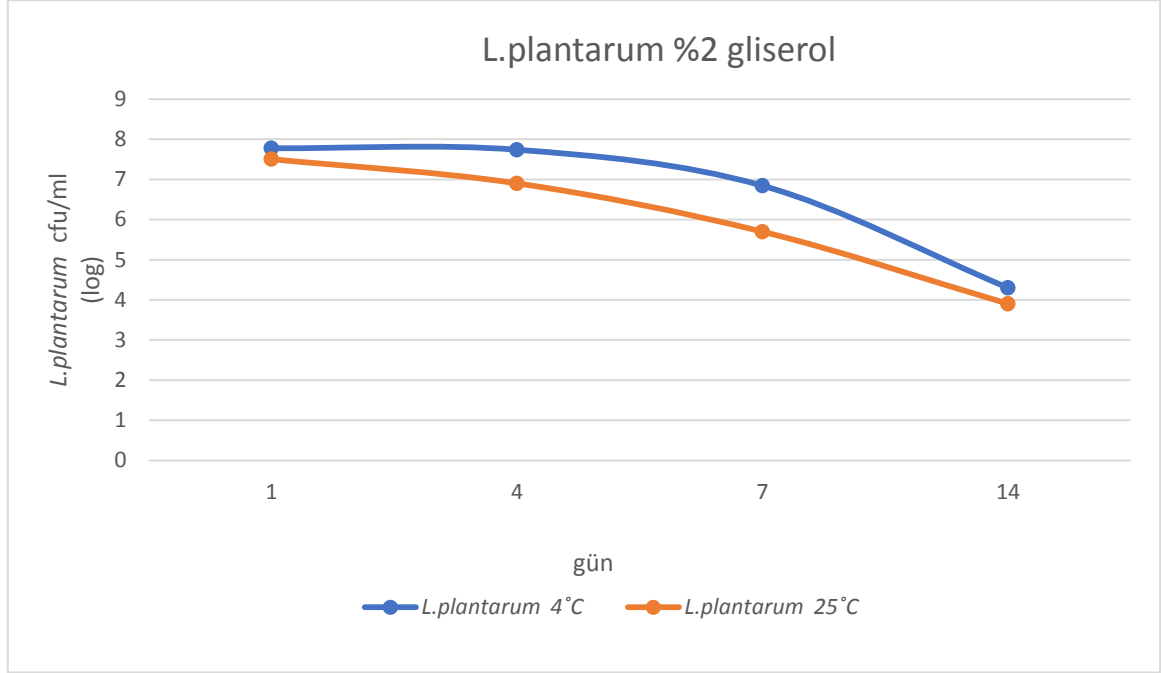
Grafik 4.7 *L.plantarum* içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %0,5 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği

% 0,5 gliserol ilavesi ile yapılan denemenin sonuçları; +4°C saklama koşulunda ve 1. Gün  $3,0 \times 10^7$  kob/ml, 4.gün  $1,5 \times 10^7$  kob/ml, 7.gün  $3,0 \times 10^6$  kob/ml, 15.gün ise  $1,5 \times 10^4$  kob/ml'dir. 25°C saklama koşulunda 1. Gün  $2,8 \times 10^7$  kob/ml, 4.gün  $2,0 \times 10^5$  kob/ml, 7.gün  $3,5 \times 10^4$  kob/ml, 15.gün ise  $4,0 \times 10^2$  kob/ml'dir.



Grafik 4.8 *L.plantarum* içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %1 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği

% 1 gliserol ilavesi ile yapılan denemenin sonuçları; +4<sup>0</sup>C saklama koşulunda ve 1. Gün 5,0x10<sup>7</sup> kob/ml, 4.gün 4,6x10<sup>7</sup>kob/ml, 7.gün 8,0x10<sup>4</sup> kob/ml, 15.gün ise 1,0x10<sup>4</sup> kob/ml'dir. 25<sup>0</sup>C saklama koşulunda 1. Gün 2,6 x10<sup>7</sup> kob/ml, 4.gün 3,5x10<sup>5</sup> kob/ml, 7.gün 8,0x10<sup>4</sup> kob/ml, 15.gün ise 6,0x10<sup>2</sup> kob/ml'dir.



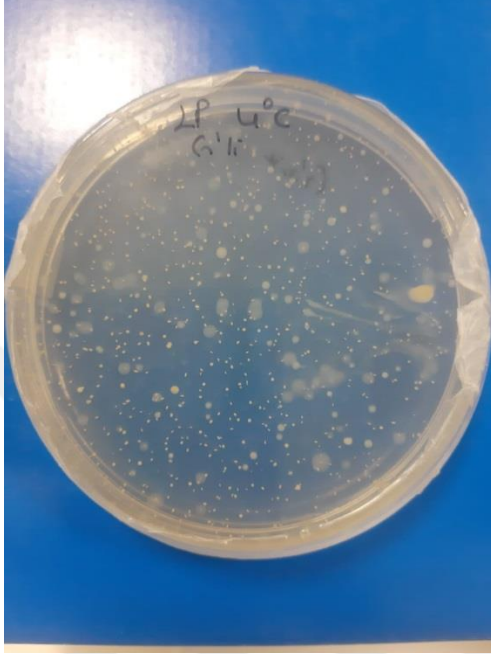
Grafik 4.9 *L.plantarum* içeren mikroküreciklerin Arı Kekinde %2 gliserol ile stabilizasyonunun sağlanması grafiği

% 2 gliserol ilavesi ile yapılan denemenin sonuçları; +4<sup>0</sup>C saklama koşulunda ve 1. Gün 5,5 x10<sup>7</sup> kob/ml, 4.gün 6,0 x10<sup>7</sup>kob/ml, 7.gün 7,0x10<sup>6</sup> kob/ml, 15.gün ise 2,0x10<sup>4</sup> kob/ml'dir. 25<sup>0</sup>C saklama koşulunda 1. Gün 3,2 x10<sup>7</sup> kob/ml, 4.gün 8,0x10<sup>6</sup>kob/ml, 7.gün 5,0x10<sup>5</sup>kob/ml, 15.gün ise 8,0x10<sup>2</sup>kob/ml'dir.

Sonuçlar incelendiğinde stabilizasyon amacıyla kullanılan en iyi gliserol yüzdesinin %2 olduğu belirlenmiştir.

#### 4.4 Raf Ömrü Çalışması ve Sonuçları

Raf ömrü çalışması için 14,30,45,60 ve 90.günlerde örnek alınması planlanmıştır ancak 30.günde yapılan sayım sonuçlarında kontaminasyon sorununun olduğu ortaya çıkmıştır.



Resim 4.1 Arı Kekine Mikrokürecik metodu ile kaplanarak eklenen *L.plantarum*'un görüntüsü



Resim 4.2 Arı Kekine Mikrokürecik metodu ile kaplanarak eklenen *L.plantarum*'un 30.gün görüntüsü

## 5.Sonuçlar ve Tartışma

Arılar ve sağladıkları tozlaşma olayları; habitat kaybı, iklim değişikliği, pestisitler, parazitler ve patojen organizmalar vb. bir dizi faktör tarafından tehdit edilmektedir. Özellikle parazit ve patojenlerin sebep olduğu hastalıkların etkisi diğer stres faktörlerinin etkileşimi sonucunda artış göstermektedir. Öte yandan pestisitler ve habitat kaybı sonucu azalan çiçek gibi polen ve nektar kaynakları arıları hastalıklara karşı duyarlı ve daha az toleranslı hale getirmektedir. (Koucke ve ark., 2017)

Gram pozitif, spor oluşturan ve *P. larvae* adı verilen bir bakterinin neden olduğu ölümcül bir kuluçka enfeksiyonu olan Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı, hala küresel olarak dağılmış en zararlı arı hastalıkları arasında yer almaktadır. AFB'den etkilenen arı larvalarının kalıntıları, bakterinin sporlu vejetatif aşamasını içeren kahverengimsi, yarı sıvı, tutkal benzeri bir kolloid ('ropy' aşaması) yapı olarak görülmektedir. Bir sonraki aşama ise iplik aşamasıdır ve oldukça kuru ve serttir.

Bu aşamalar koloni içinde ve koloniler arasında hastalık ulaşmasına neden olacak minyonlarca spor içermektedir. Sporlar 35 yıldan fazla bulaşıcı bir şekilde kalabilmektedir ve aşırı sıcaklık, nem, soğuk gibi olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır. (Mutinelli, 2011)

Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı'nın ilk akla gelen tedavi yöntemi, çoğu durumda sürekli ve aşırı kullanılmış olan geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımına dayanmaktadır. Sülfatiazol ve oksitetrasiklin hidroklorür (OTC) gibi farklı antibiyotikler, *P.larvae* büyümesini engelleyebilir fakat uzun süreli ve bilinçsiz kullanılması, dirençli suşların ve arı kovanı ürünlerini kirleten kalıntıların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu sebeple AFB tedavisi ve önlenmesi için antibiyotik kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır ve etkilenen kolonilerin kovanlar yakılarak yok edilmektedir. Kovanların yakılarak yok edilmesi arıcılar için yüksek maliyetli bir çözümdür ve yeterince önleyici etkisi bulunmamaktadır. Bu bağlamda AFB hastalığının kontrolü ve önlenmesi için alternatif ve etkili yöntemlerin geliştirilmesi çok önemlidir. Geliştirilecek olan yöntemler arıların sağlığına zarar vermemeli, dirençli patojen suşlar oluşturmamalı, kolay kullanılabilmesi ve uygun maliyetli olmalıdır. Bu yöntemler arasında uçucu yağlar, bitki özleri, propolis, arı sütü ve bakteriler bulunmaktadır. (Alonso-Salces ve ark, 2017)

Arı Keki; arıcılıkta arıların besin eksikliğini gidermek için kullanılan içeriğinde bal, pudra şekeri ve/veya polen bulunan bir yemdir. Yapılmış olan çalışmada, arıların besin eksikliği giderilirken aynı zamanda içeriğindeki probiyotik mikroorganizmalar ile AFB yi tedavi edecek bir besin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Probiyotikler mikrokürecikler içine hapsedilerek Arı Keki nin aşırı şekerli ortamında ortaya çıkacak olan osmotik basınca karşı korunması sağlanmaya çalışılmış ve bununla ilgili denemeler yapılmıştır.

Ticari boyutlarda kullanılması amacıyla Modifiye MRS Broth içeriği üzerinde çalışılmış olup, alternatif karbon kaynağı olarak %2 oranında Melas ve F55 denenmiştir. Karbon kaynağı olarak Melas kullanıldığında canlılığın F55 e göre daha fazla olduğu saptanmıştır ve karbon kaynağı olarak Glikoz yerine Melasın kullanılmasına karar verilmiştir. Ardından *Lactobacillus* türlerinin optimum inkübasyon sıcaklığını belirlemek amacıyla kültürler 27°C ve 37°C de bırakılmış olup, 37°C optimum büyüme gösterdiği anlaşılmıştır. Optimum inkübasyon süresi ise hem kültürel hem spektrofometrik yöntem ile çıkarılan büyüme grafiklerine göre ortalama 18-20 saat olarak belirlenmiştir.

*Lactobacillus* türleri Arı Kekine direkt eklendiğinde yüksek şeker oranından dolayı oluşacak ozmotik basınçta canlılığını sürdüremeyeceği için bir kaplama metodu olarak mikrokürecik seçilmiştir. Mikrokürecik metodunda referans mikroorganizma olarak *L.plantarum* kullanılmış ve denemelere başlanmıştır. Yapılan ilk deneme canlılığın saptanmasının önemi açısından mikroküreciklerde oluşan çapraz bağların koparılması ve sayım yapılabilmesi için vorteks uygulanması olmuştur. 1dk,3dk,5dk,7dk ve 10 dk yapılan vorteks işleminin ardından canlılık en yüksek 1 dakikada ( $10^8$ ) görüldüğü ve giderek canlılıkta düşüş yaşandığı görülmüştür. Devam eden denemelerde vorteks süresi 1 dakika olarak uygulanmıştır.

Bir sonraki deneme mikrokürecik metodunda karıştırma süresi ile ilgilidir. Bu deneme çapraz bağların oluştuğu ve *L.plantarum*'un kitosan ile kaplandığı bu sürecin uzatılması daha yüksek sayıda mikrokürecik oluşup oluşmamasında katkı sağlayıp sağlamayacağına dair bilgi edinmek amacıyla yapılmıştır. Mikrokürecik olarak kullanılacak olan kültürden sayım yapılmış ve bu sayımın sonucu olan  $10^8$  kontrol olarak kullanılmıştır. Karıştırma süresi olarak 1 saat ve 3 saat seçilmiştir. Bu süreler sonunda hem arı kekine ekleyerek hem arı kekine eklenmeden yapılan sayımlarda sonuç  $10^8$  çıkmış olup, karıştırma süresinin uzatılmasına gerek olmadığı 1 saat karıştırma süresinin yeterli olduğu anlaşılmıştır.

Mikroküreciklerin saklama koşullarıyla ilgili yapılan denemede ise *L.plantarum*'a mikrokürecik metodu uygulandıktan sonra 4°C ve 25°C de saklanmış 1,2,3,7 ve 14.günlerde yapılan sayım sonuçlarında 4 de canlılığının daha yüksek olduğu oda sıcaklığında 1 logaritmik bir düşüş yaşandığı görülmüştür.

Stabilizasyon için mikrokürecik metodu esnasında %0,5, %1 ve %2 oranında gliserol eklenmiştir. 1,4,7 ve 14.günlerde yapılan sayımlara bakıldığında aralarında çok fark görülmemesine rağmen en uygun oranın %2 olduğu görülmüştür.

Ardından raf ömrü çalışmasına geçilmiştir. Raf ömrü çalışmasına geçildiğin deneme her 3 organizma için de kurulmuş olup ( *L.casei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus*) 14,30,45,60 ve 90.günlerde örnek alınması planlanmıştır ancak 30.günde yapılan sayım sonuçlarında kontaminasyon sorununun olduğu ortaya çıkmıştır. Tahminlerimize göre bu sorun arı kekinin zaman geçtikçe yapısının bozulmasından ve üremeye açık hale gelmesinden, yeterli sterilizasyon işleminin olmamasından kaynaklanmış olabilir. Bundan sonraki yapılacak olan çalışmalarda Arı kekinin sterilizasyon işlemine dikkat edilmesi, canlılığın daha fazla sürdürülmesi açısından farklı kitosan oranlarının denenmesi düşünülebilir.

Probiyotiklerin özellikle gıdalara eklenmesinde kullanılan yöntem mikrokapsülasyon yöntemidir. Mikrokapsülasyon yönteminde Ekstrüzyon, emülsifikasyon gibi birçok teknik kullanılmaktadır. Bu yöntemle meydana gelen küresel taneciklerin çapı 0.3-3mm arasında değişmektedir. (Manojlović, 2009) Bu boyutlar gıdalar için uygun olmamakla birlikte özellikle arılar ve arıların sindirim sistemi düşünüldüğünde oldukça büyük kalmaktadır. Ayrıca yöntemde kullanılan kitosan her ne kadar zararsız bir biyopolimer olsa da bu yöntemin diğer bir bileşeni olan sodyum aljinatın arılara zarar verme potansiyeli olabilir. Arılar için hem boyut hem de içerik olarak dezavantajlı olabileceğinden mikrokapsülasyon yerine mikrokürecik yöntemi denenmiştir. Mikrokürecik yöntemiyle hem boyut olarak daha küçük kürecikler elde edilmesi amaçlanmış hem de sodyum aljinat gibi arılara zarar verebilecek maddelerin kullanılmasından kaçınmak istenmiştir. Ancak mikrokürecik yöntemiyle uzun süreli olarak probiyotik bir üründe en az olması gereken  $10^7$  - $10^8$  kob/g mikroorganizma miktarı sabitlenememiştir. Gelecek çalışmalarda farklı olarak değişik kitosan miktarları denenerek veya farklı yöntemler kullanılarak gerekli canlılık miktarı korunmaya çalışılabilir.

## 6.Kaynakça

- Alonso-Salces ve ark., R. M. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*, 387-400.
- Alonso-Salces ve ark., R. M. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus* larvae ., *Apidologie*, 387-400.
- Bajaj, B. K., Claes, I. J., & Lebeer, S. (2015). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 321-327.
- Bastos ve ark., D. (2015). Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 35-39.
- Baudoux, D. (2000). Antiviral and antimicrobial properties of essential oils. *Positive Health*.
- Berthold, & ark., A. v. (1996). Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug. *Journal of Controlled Release*, 17-25.
- Binda, S., Hill, C., & Johansen, E. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary. *Frontiers in Microbiology*.
- Chang ve ark., J.-H. (2010). Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 220-230.
- Chung ve ark. (2021). Potential of macroalgae-based biorefinery for lactic acid production. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Daisley ve ark., B. (2019). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus* larvae infection. *The ISME Journal*, 476–491.
- Delikanlı, B., & Özcan, T. (2014). Edible Films and Coatings Containing Probiotic Bacteria. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 59-70.
- Dilika, F., Bremner, P., & Meyer, J. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 450-452.
- Dolezal, A., & Toth, A. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, 114-119.
- Endo ve ark., A. (2012). Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 500-504.

- Endo ve ark., A. (2018). Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 84 Issue 19.
- Endo, A., & ark. (2012). Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 500-504.
- Fuselli ve ark., S. (2018). *Control and prevention of American foulbrood in honey bees*. Mar del Plata: Nova Science Publishers.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, G., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 116-119.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 10-19.
- Graaf ve ark., D. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *The Society for Applied Microbiology*, 583-590.
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2001). Stomach-specific anti-*H. pylori* therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 87-94.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1-13.
- Kong ve ark., M. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197-202.
- Koucke ve ark., H. (2017). The role of disease in bee foraging ecology. *Current Opinion in Insect Science*, 60-67.
- Kuzyšinová ve ark., K. (2016). The use of probiotics, essential oils and fatty acids in the control of American foulbrood and other. *Journal of Apicultural Research*, 386-395.
- Manojlović, V. v. (2009). Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (s. 269–302). içinde
- Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 257-271.
- Novik ve ark., G. (2017). Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas. *Food Additives* (s. 105-146). içinde

- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions. *International Journal of Medical Microbiology*, 57-62.
- Oskay, d., & Sönmez, g. (2017). Bal Arısı Ek Beslemesinde Sorunlar Ve Çözüm Önerileri. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 1-8.
- Patel ve ark., v. (2021). Why bees are critical for achieving sustainable development. *Ambio*, 49-59.
- Rafiei, M., & Rajaei, H. (2007). Structural and Developmental Studies on Oil Producing Reproductive Organs in Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Journal of Biological Sciences*, 848-853.
- Rauch ve ark., S. (2009). Negative Correlation between Individual-Insect-Level Virulence and Colony-Level Virulence of *Paenibacillus* larvae, the Etiological Agent of American Foulbrood of Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 3344-3347.
- Royan , M. (2019). Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 95-103.
- Royan, m. (2019). Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 95-103.
- Rustan, A., & Drevon, C. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*.
- Sinha ve ark., V. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-33.
- Thuiller ve ark., W. (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 8245-8250.
- Yan Wang ve ark., L. (2005). Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*, 62-75.
- Zielińska, D., & Kolohyn, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic. *BioMed Research International*, 15.

## 7.Özgeçmiş

