

## GÜNEY MARMARA BÖLGESİN'DE BAL ARILARININ CHALKBROOD (*ASCOSPHAERA APIS*) İNFEKSİYONUNDA PREDISPOZİSYON FAKTÖRLERİ

Predisposing Factors for Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) Infection in Honey Bees in Northwest Turkey

A.Ebru BORUM<sup>1</sup>, Mihriban ÜLGEN<sup>2</sup>

(Extended Abstract in English can be found at the end of this article)

<sup>1</sup> Uludağ Üniversitesi Keles Melek Yüksekokulu 16740 Keles, BURSA

Uludağ Üniversitesi Arıcılık Geliştirme ve Araştırma Merkezi, BURSA

<sup>2</sup> Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. BURSA

E-posta: ebruo@uludag.edu.tr

**Anahtar Kelimeler:** *Ascosphaera apis*, Chalkbrood, Bal arısı, Predispozisyon Faktörleri

**Key Words:** *Ascosphaera apis*, Chalkbrood, honeybee, predisposing factors

**ÖZET:** Bu çalışma ile Bursa ve çevresindeki arıcılık işletmelerinde görülen mantar enfeksiyonlarının yaygınlığının ve etkili mantar türlerinin belirlenmesi ile birlikte bu enfeksiyonlarda önem taşıyan predispozisyon faktörlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Toplam 6 istasyonda 84 kovan incelenmiş, 84 kovanın 20'sinde (%23.8) klinik olarak mantar enfeksiyonu semptomları gözlenmiştir. Kireç hastalığı bulguları gösteren 20 kovandan larva ve işçi arı örnekleri alınarak klinik olarak mantar enfeksiyonu şüpheli 20 kovandan alınan her iki tür materyalin (larva ve işçi arı) tümünden (%100) her iki izolasyon yöntemi ile kireç hastalığı'nın etkeni *A. apis* izole edilmiştir. Ayrıca 20 kovanın dört (%20)'üne ait işçi arı örneklerinden aynı zamanda *Penicillium* spp. izole edilmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda taş hastalığı nedeni olan mantar türlerine rastlanmamış olup yapılan ölçümler sonucu izolatlar *Ascosphaera apis* (*A.apis*) olarak tanımlanmıştır. Örneklerin alındığı bölgelerde ve işletmelerde mantar enfeksiyonunun oluşmasında etkili olabilecek predispozisyon faktörlerinin varlığı belirlenerek iki aylık aralıklarla iki yıl boyunca kovanlardan etken üretmesi olup olmadığını incelemek için örnekler alınmıştır. Mantar enfeksiyon bulguları olan ve *A. apis* izolasyonu yapılan 20 kovanın 19'unda (%95) *Varroa* enfestasyonu, 17 kovanında (%85) ise koruma amaçlı antibiyotik (Apimisin-Eritromisin) kullanıldığı saptanmıştır. Yapılan Ki-Kare testine göre kireç hastalığı enfeksiyonu bulunan kovanlarda *Varroa* enfestasyonu tek olarak diğer predispozisyon faktörlerine göre istatistiksel olarak daha önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). *Varroa* enfestasyonu, eski petek kullanımı ve antibiyotik uygulaması gibi predispozisyon faktörlerinin aynı anda bulunduğu kireç hastalığı enfeksiyonlu kovanlar ile diğer kovanlar arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

### GİRİŞ

Arıcıların büyük çoğunluğunun arı hastalık ve zararlıları konusunda yeterli bilgiye sahip olmaması nedeniyle hastalıklara karşı koruma ve kontrol yöntemleri yeterince uygulanamamaktadır. Ayrıca

bilinçsiz ve gereksiz olarak aşırı ilaç kullanılması kolonilerin dengesini bozup özellikle mantar enfeksiyonlarına karşı kolonideki arıların duyarlı duruma gelmesine neden olmakta hastalık etkenleri ilaçlara karşı direnç kazanmakta ve ilaçlar bal ve balmumu gibi arı ürünlerinde kalıntı bırakarak insan

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

sağlığını da tehdit etmektedir (Gilliam ve Vandenberg,1990, Tutkun ve Boşgelmez, 2003, Zeybek,1991).

Bal arılarında hastalık ve zarar meydana getiren çok sayıda etken bulunmaktadır. Bunlar viruslar, bakteriler, parazitler, mantarlar ve diğer zararlılar (güveler, karıncalar, ayılar) olmak üzere 5 grupta incelenebilir (Zeybek,1991, Tınar, 1994, Tutkun, 2000, Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Bal arılarında en önemli mantar enfeksiyonu, Ascospheeriosis ya da chalkbrood (Kireç Hastalığı-Tebeşir Hastalığı)'dır. Stonebrood (Taş Hastalığı) ise daha az yaygındır ve arıcalar tarafından kireç hastalığı ile karıştırılabilmektedir (Yakobson ve ark.,1987, Zeybek,1991, Özkırım ve Keskin, 2002, Calderon ve ark., 2004)

Kireç hastalığı başta *Ascospheera apis* (*A. apis*) olmak üzere *Ascospheera major* (*A. major*), *Ascospheera proliperda* (*A. proliperda*), *Ascospheera atra* (*A. atra*), *Ascospheera aggregata* (*A. aggregata*), *Ascospheera fimicola* (*A. fimicola*) ve *Arrhenosphaera cranei* (*A. cranei*) türleri tarafından oluşturulur. *A. apis*, Türkiye'de en yaygın bulunan etkenidir. Diğer etkenlerin konakçıları farklıdır ve sadece belirli ülkelerde saptanmıştır. Bulaşma etkenin askosporlarının bulaşık gıdalar aracılığı ile sindirim sistemine alınmasıyla olur, sonuçta larvanın mumyalaşarak ölümü şekillenir. İlk olarak ölü larva kapalı hücre gözleri içerisinde kabarık beyaz bir küf tarafından kaplanır, daha sonra kurur ve beyaz veya siyah mumyalara dönüşür. Larvaların rengi enfekte olduğu miselyum tipine göre değişmektedir. Tek tip miselyumla yani aseksüel olarak (sadece + ya da - miselyumla) enfekte olan beyaz, seksüel olarak (hem + hem de - miselyumla) enfekte olan larvaların rengi ise siyah, siyah-gridir. Mumya larvalar işçi arılar tarafından kolaylıkla belirlenir ve hücrelerinden uzaklaştırılarak kovan dışına atılır (Anderson ve diğ., 1997, Puerta ve diğ., 1999).

Kireç hastalığı nedeniyle arı popülasyonu azalır, bal üretimi düşer, larvaların %80'inden fazlası etkilenebilir ve sonuçta enfekte olan koloni söner. Enfeksiyon nedeniyle zayıflayan koloni etkili bir tozlaşma sağlayamaz. Arılıklar arasında arı ürünlerinin, ergin arılar ve kraliçe arınının, kullanılmış kovanların ve arıcılık ekipmanlarının hareketlerinin kontrol altına alınması gerekliliği ortaya çıkar (Herbert ve ark., 1977, Gilliam ve ark., 1993, Witte, 2000).

*A. apis* toprakta, bitkilerde, bal arılarının gıda zinciri içinde, kovanda depo edilmiş balda ve polende, petek yüzeylerinde, su kaynaklarında, erişkin arıların sindirim sistemi ve vücut yüzeylerinde bulunabilmektedir (Gilliam ve Vandenberg,1990, Puerta ve diğ.,1999, Hornitzky, 2001.).

*A. apis* etkeninin sporları çevre şartlarına oldukça dirençlidir ve en az 15 yıl infektif kalabilmektedir. Sporlar depolanmış bal, polen, polen kapsül ve tabletleri, kovan ekipmanlarında, arıcılıkta kullanılan alet ve ekipmanlar ile özellikle enfekte arılıktaki toprakta uzun yıllar canlı kalabilmektedir (Toumanoff, 1951, Bailey, 1967, Hale ve Menapece, 1980, Gilliam ve Vandenberg, 1990). *A. apis*'in 27°C' den daha düşük sıcaklıkta en az bir yıl ve polenlerde ise en az 12 ay canlı kalabildiği bildirilmiştir. *A. apis*'in-16°C'de beş gün ya da 12°C'de bir yıl tutulduktan sonra optimum şartlar sağlandığında gelişmesine normal olarak devam ettiği bildirilmiştir (Hale ve Menapece, 1980).

Etkenin sporları özellikle soğuk ve nem oranı yüksek bölgelerde daha kolay gelişir. Bu nedenle özellikle yağış oranı yüksek olan ilkbahar ve sonbahar aylarında enfeksiyona daha sık rastlanır. Özellikle ilkbahar aylarında, kolonilerin hızla genişlemesi ve erişkin arıların bakmakla yükümlü olduğu yavru sayısı fazla olmasından dolayı kireç hastalığına oldukça sık rastlanır. Hastalık Nisan'dan Ekim ayına kadar görülebilir. En yoğun görüldüğü aylar ise Mayıs-Haziran aylarıdır (Gilliam ve Vandenberg,1990, Zeybek,1991, Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Ankara ve çevresinde taraması yapılan 156 kovanın altı (%3.84) tanesinden kireç hastalığı etkeni *A. apis*'in izole edildiği bildirilmiştir (Özkırım ve Keskin, 2002).

Çakmak ve arkadaşları (2003), Bursa ve çevresindeki balarısı zararlılarını tespit etmek için 22 bölgeden 217 kovanı incelemişler ve klinik olarak kireç hastalığının oranını %26 olarak bildirmişlerdir.

Bursa ve Yalova yörelerinde yavru çürüklüğü şüpheli 24 farklı arılıktan elde edilen eski peteklerde ve ticari firmalar tarafından üretilen 11 hazır petekte insan ve arı sağlığına zararlı bakteriyel ve fungal etkenler incelenmiş, temel ticari peteklerin bir (%16.7) tanesinde *Candida* spp., eski peteklerin tamamında ise bakteriyel ve fungal etkenler (*A. fumigatus*, *Candida* spp., *Cladosporium corroni*,

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

*Penicillium* spp.) bulunduğu rapor edilmiştir (Özakın ve diğ., 2003).

İnfeksiyonun gelişmesinde etkili olan birçok faktör vardır. Bunlar:

**1-İklim şartları:** Kireç hastalığına neden olan etkenin sporları özellikle, soğuk ve rutubet oranı yüksek bölgelerde daha kolay ürerler. Bu nedenle hastalık çoğunlukla yağışın bol olduğu serin ilkbahar ve sonbahar aylarında yoğunluk gösterir. Serin ve rutubetli bölgelerde yerleşmiş bulunan arılıklarda gece sıcaklığının azaldığı, yağışlı geçen yaz aylarında da hastalık ortaya çıkabilmektedir (Bailey ve Ball, 1991, Dallman, 1966, Gilliam ve Vandenberg,1990, Tutkun ve Boşgelmez, 2003, Zeybek,1991).

**2-Stres faktörleri:** *A. apis* fırsatçı bir patojendir. Özellikle arı kolonilerinde olumsuz koşulların ortaya çıktığı durumlarda etken aktif duruma geçer. Arı ailelerinin yetersiz beslenmesi, nektar akışının az olması ve açlık larvaların direncini düşürür ve fırsatçı patojenlerin etkili hale gelmesine neden olur. Ayrıca arı kolonilerinin birleştirilmesi, kovanların nakli, yağmacılık gibi stres faktörleri de oldukça etkili olur (Gilliam ve Vandenberg,1990, Bailey ve Ball, 1991, Zeybek,1991, Puerta ve diğ.,1999, Hornitzky, 2001, Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

**3-Diğer hastalıklar ve zararlılar:** Avrupa ve Amerikan yavru çürüklüğü, *Varroa*, kovandaki diğer parazitler ve viral enfeksiyonlar arı ailesinin dirençlerinin azalmasına neden olarak *A. apis*'in üremesini kolaylaştırmaktadır (Gilliam ve Vandenberg,1990, Bailey ve Ball, 1991, Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Kovana gıda sağlayan işçi arıların yüksek oranda trake akarı ile infeste oldukları durumda koloni zayıflar, işçi arılar kireç hastalığı bulunan hücreleri temizleyemezler. Bunun sonucu olarak enfeksiyonun kontrol ve eradike edilememesi nedeniyle, kireç hastalığı daha yoğun görülür (Deans, 1940). Maurizio (1935). Avrupa yavru çürüklüğüyle infekte kadavraların bulunduğu peteklerde sekonder olarak kireç hastalığına rastladığını rapor etmiştir. Kireç hastalığının nosema, bakteriyel septisemi, rickettsia ve sacbrood enfeksiyonu ile birlikte görüldüğüne dair çok sayıda rapor bulunmaktadır (Wille, 1964, Mehr ve diğ., 1976, Moeller ve Williams, 1976).

Ayrıca, yapılan birçok araştırmada *Varroa* ve kireç hastalığının birlikte görüldüğü, *Varroa*'nın kireç

hastalığı etkeni *A. apis*'in taşıyıcısı olabileceği bildirilmiştir. *Varroa* ve diğer bakteriyel yavru çürüklüğü enfeksiyonları kovanda mevcut ise en kısa sürede enfeksiyon mücadelesi gerçekleştirilmelidir (Liu, 1996, Medina ve Mejia, 1999, Sammataro ve Finley, 2004). Liu (1996) tarafından yapılan bir çalışmada *Varroa* ile infeste kolonilerde kireç hastalığı insidensinin %3.5-52.3, *Varroa* enfestasyonu bulunmayan kolonilerde ise insidensin %10-18.8 olduğu bildirilmiştir. *Varroa* akarında da *A. apis* sporlarının izole edildiği, elektron mikroskobu ile *Varroa* akarının kütikulası incelendiğinde ise *A. apis* sporlarının kütikulaya yapışmış durumda olduğu belirlenmiş, bu sonuçlara göre de *Varroa* akarının kireç hastalığının potansiyel vektörü olabileceği bildirilmiştir (Liu, 1996).

**4-Eski peteklerin kullanımı:** Eski peteklerdeki yavru gözlerinde arı larvalarına ait dışkı ve pupa kalıntıları mantar sporlarının gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Koenig ve ark.1986).

Yapılan birçok araştırma sonucunda *A. apis* sporlarının infekte kolonilerin peteklerindeki hücrelerde, larva artıklarında, dışkılarda ve balmumunda uzun süre canlı kaldığı, ve uygun ortam bulduğunda enfeksiyonun tekrar ortaya çıktığı belirlenmiştir (Bailey 1967, Gochnauer ve diğ., 1975, Flores ve diğ., 2005).

**5-Hava ve çevre kirliliği:** Hava kirliliği ve tarımda aşırı gübre kullanımı sonucu oluşan çevre kirliliği mantar sporlarının gelişmesi için uygun bir ortam oluşturur. Gübrelerden suya geçen üre, nitrat ve nitrit gibi azotlu maddeler arıların midesinde amonyağa dönüşerek arıların mide florasını bozar ve hastalıklar için uygun ortam oluşturur (Zeybek,1991, Kayral, 2004).

**6-Aşırı antibiyotik kullanımı:** Arılarda görülen bakteriyel hastalıkları önlemek amacıyla kullanılan çeşitli antibiyotikler, aşırı derecede kullanılırlarsa arıların intestinal florasını bozarak aktif olmayan mantar sporlarının aktif hale geçip üremesi için uygun ortam oluştururlar (Giauffrett ve Talierto, 1967, Zeybek,1991, Flores ve diğ., 2004, Kayral, 2004). Bazı araştırmacılar ise yavruların üşmesi, rutubet oranının yüksek olması gibi durumlarda antibiyotiklerin özellikle de oksitetrasiklinin kireç hastalığının ortaya çıkışını artırdığını bildirmişlerdir (Samsinakova ve ark.1977, Menapace ve ark. 1979, Flores ve ark., 2004,).

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

**7-Aşırı şurup kullanılması:** İlbahar ve sonbaharda arılara fazla miktarda şurup verilmesi sonucu kovan içindeki nem miktarı artar ve havalandırmanın yetersiz olduğu kovalarda mantar enfeksiyonlarına neden olur (Gilliam ve Vandenberg,1990, Zeybek,1991, Tutkun ve Boşgelmez, 2003)

**8-Hijyenik davranışlarda bozulma:** Bazı arı kolonilerinde temizliğe dikkat etmeyen işçi arılar bulunabilir. Petek gözlerindeki hastalıklı mumya larvaların kuruduktan sonra kovandan uzaklaştırılmasında görevlerini yerine getirmeyen bireyler, hastalığın artması ve devam etmesine neden olur (Gilliam ve diğ., 1983, Spivak ve Downey, 1998, Palacio ve diğ., 2000, Stanimirovic ve diğ., 2002).

**9-Hassas koloniler:** Kireç hastalığına genetik olarak duyarlı kolonilerde etkili tedavi yöntemleri uygulansa bile başarı sağlanamayabilir. Bu gibi kolonilerde ana arıların değiştirilmesi etkili olabilmektedir (Taber,1986, Spivak ve Gilliam, 1993, Olroyd, 1996).

Taş hastalığı oldukça nadir görülen ve arıcılar için de kireç hastalığına göre daha az önem taşıyan fungal bir enfeksiyondur. Hastalık hem larvaları hem de ergin arıları etkiler. Etken *Aspergillus flavus* Link (*A. flavus*) başta olmak üzere *Aspergillus fumigatus* Fresenius (*A. fumigatus*) ile *Aspergillus niger* (*A. niger*)'dir. Etkenler diğer böcekler, memeliler, kuşlar ve insanlar için patojendir (Batra ve diğ., 1973, Gilliam ve Vandenberg,1990, Alizadeh ve Mossadegh, 1994).

Taş hastalığında bulaşık olan arı larvaları ve erişkin arıların üzerlerinde yeşilimsi toz şeklinde bir küf tabakası oluşur. Etken dokulara girdiğinde larvanın vücudu ve ergin arıların abdomenleri oldukça sertleşir ve ezilmesi oldukça zordur. Erişkin arılar, ölen larvaların taşlaşması nedeniyle bu mumyaları kovandan uzaklaştırılmazlar. Taş hastalığı etkenleri bala geçer, bu nedenle enfeksiyon görülen kolonilerden elde edilen bal hasat edilmemelidir (Yakobson ve diğ., 1987, Gilliam ve Vandenberg,1990, Bailey ve Ball, 1991, Zeybek,1991, Tutkun ve Boşgelmez, 2003). İnfekte kolonilerden hasat edilen balların tüketimi, insanlarda ağız ve dişeti iltihaplarına, göz ve karın ağrılarına hatta dizanteriye sebep olabilir (Gilliam ve Vandenberg,1990, Tutkun ve Boşgelmez, 2003).

Arılarda mantar enfeksiyonlarının teşhisi, larvaların klinik görünüşleri (Gilliam ve Vandenberg,1990, Bailey ve Ball, 1991, Puerta ve diğ., 1999, Calderon ve diğ., 2004,) mantar etkenlerinin koloni görünümü (Gilliam ve Vandenberg,1990, Alizadeh ve Mossadegh, 1994, Anderson ve diğ., 1997, Puerta ve diğ., 1999, Tutkun ve Boşgelmez, 2003, Calderon, 2004), spor kistlerinin çaplarının ölçümü (Yakobson ve diğ., 1987, Gilliam ve Vandenberg,1990, Bailey ve Ball, 1991, Zeybek,1991, Puerta ve diğ., 1999) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) (Maghrabi ve Kish, 1987, Anderson ve Gibson, 1998, Summerbell, 2003, James ve Skinner, 2005) ile yapılabilir.

Mikotik enfeksiyonlar yurdumuzda arıcılar tarafından görsel olarak değerlendirilmekte ve mücadele yöntemleri yeterince bilinmemektedir. Ülkemizde bu konuda yapılan bilimsel çalışmalar yeterli değildir.

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### Saha Örnekleri:

Ağustos 2003-Ağustos 2005 tarihleri arasında Bursa ve çevresindeki çeşitli arıcılık işletmelerinde toplam 1850 kovan tarandı, 84 kovanın bulunduğu 6 istasyondaki mantar hastalığının klinik bulgularını gösteren 20 kovan incelendi. Mikotik enfeksiyonlar yönünden şüpheli bulunan ve klinik septomlar gözlenen 20 kovandan larva ve işçi arı olmak üzere iki çeşit materyal alındı (Tablo-1). Örneklerin alındığı bölge, işletmedeki kovan sayısı, örneklerin alındığı kovanlar ve örnek çeşidi kaydedildi. Alınan materyaller soğuk zincire dikkat edilerek en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

İnfeksiyon çıkan kovanların periyodik olarak 2 yıl boyunca takipleri yapıldı.

**Tablo-1.** İncelenen kovanların ilçelere göre dağılımı

İlçe	İncelenen Kovan sayısı	Örnek alınan kovan sayısı	Örnek çeşidi
Merkez	10	1	Larva
Nilüfer	10	5	Larva
Karacabey	22	1	Larva İşçi arı
Orhaneli	21	7	Larva İşçi arı
Mustafakemalpaşa	10	2	Larva İşçi arı
Yıldırım	11	4	Larva İşçi arı
<b>TOPLAM</b>	<b>84</b>	<b>20</b>	-

Mantar etkenlerinin izolasyonunda;

PDA (CM139-Oxoid) +%4 yeast extract (L21-Oxoid) +%10 lactic acide (SR21K-Oxoid),

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

MY20 agar: Malt agar (CM59-Oxoid) +%4 yeast extract +%20 dextrose (0155-17-Difco),

SDA (CM41-Oxoid)+%4 yeast extract+%10 lactic acide,

Patojen mantar besiyeri (1.05467-Merck),

Czapeks dox agar (CM97-Oxoid) kullanıldı.

### Predispozisyon Faktörlerinin İncelenmesi:

Örneklerin alındığı bölgelerde ve işletmelerde mantar enfeksiyonunun oluşmasında etkili olabilecek predispozisyon faktörlerinin varlığı belirlendi. İki aylık aralıklarla iki yıl boyunca kovanlardan etken üremesi olup olmadığını incelemek için örnekler alındı. Bu faktörler;

- 1.Kullanılan peteklerin eski ya da yeni olması
- 2.Kovanlar arası petek aktarımı yapıp yapılmadığı
- 3.Kovanların yerden yüksekliği
- 4.Kovanların çevresinde uzun boylu bitkilerin varlığı
- 5.Paraziter hastalıklar
- 6.Antibiyotik uygulamaları ve kullanılan antibiyotikler
- 7.Bölgede zirai ilaç kullanımı

İnfeksiyon bulguları görülen ve izolasyon yapılan kovanların sahiplerine enfeksiyonla mücadele için önerilerde bulunuldu. Mantar enfeksiyonlarıyla mücadele için önerilerde bulunulan konular;

- 1.Kraliçe Arının Değiştirilmesi
- 2.Kovanların Yerden Yüksekliğinin 40-45 cm'ye Çıkarılması
- 3.Kovan Çevresindeki Otların Kesilmesi
- 4.Eski Peteklerin Uzaklaştırılması
- 5.Kovanların Değiştirilip Dezenfekte Edilmesi
- 6.Kovanların Bulunduğu Alana Temiz Su Konulması

**Meteorolojik Veriler:** 2003-2005 yılları arasında aylara göre nem oranı bilgileri Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü'nün internet sayfasından elde edildi (T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü).

**İstatistik Analiz:** İnfeksiyonda etkili olan predispozisyon faktörlerinin önemi tek tek ve kombineli olarak Ki-Kare testi ile incelendi.

### BULGULAR

#### İncelenen Kovanlarda ve Peteklerdeki Klinik Görünüm:

İncelenen 84 kovanın 20'sinde (%23.8) klinik olarak mantar enfeksiyonu semptomları gözlemlendi. Bu

kovanlarda peteklerin üzerinde beyaz pamuk benzeri tabakalar olduğu ve bu peteklerin üzerindeki gözlerin büyük çoğunluğunun kapalı olduğu gözlemlendi. Bu kovanların girişi, kovanların 2-3 metre çevresi ve polen çekmeceli kovanların çekmeceleri incelendiğinde işçi arılar tarafından kovan dışına atılmış mumyalaşmış larvalar saptandı. Mumya larvaların renklerinin beyazdan, gri-siyah benekli ve siyah renge kadar farklılık gösterdiği, kıvamlarının yumuşak olduğu ve parmaklar arasında parçalanabildiği belirlendi.

#### İzolasyon Çalışmaları:

Klinik olarak mantar enfeksiyonu şüpheli 20 kovandan alınan her iki tür materyalin (larva ve işçi arı) tümünden (%100) her iki izolasyon yöntemi ile kireç hastalığının etkeni *A. apis* izole edildi. Ayrıca 20 kovanın dört (%20)'üne ait işçi arı örneklerinden aynı zamanda *Penicillium* spp. izole edildi.

İzolasyon çalışmaları sonucunda taş hastalığı nedeni olan mantar türlerine rastlanmadı.

#### İdentifikasyon Çalışmaları:

##### Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi:

Farklı yöntemlerle ekilen tüm larva ve işçi arı örneklerinden izole edilen *A. apis* kolonileri makroskobik olarak incelendiğinde tüm besiyerlerinde pamuk benzeri beyaz renkli, 5-7 cm çapında koloniler oluşturduğu gözlemlendi.

##### Mikroskobik İncelemeler:

Hem tek miselyumla (aseksüel) hem de iki miselyumla (seksüel) infekte örneklerden izole edilen *A. apis* şüpheli koloniler mikroskobik olarak incelendi. Aseksüel sporlarla infekte olan örneklerde askosporlar, seksüel sporlarla infekte olan örneklerde ise spor keseleri, spor topları ve askosporlar görüldü. Seksüel sporlarla infekte olan örneklerde ise aynı zamanda zigosporeler de belirlendi.

Yapılan ölçümler sonucu spor keselerinin çapları 37-121 µm, spor toplarının çapları 7-18.5 µm, askosporların çapı 1-1.8 µm, askosporların uzunluğu ise 1-3.8 µm, uzunluk/genişlik oranı ise 1-2.1 µm sınırları arasında bulundu. Bu ölçümlere göre izolatlar *A. apis* olarak tanımlandı.

##### İnfekte Kovanlarda Predispozisyon Faktörlerinin İncelenmesi:

Mantar enfeksiyon bulguları olan ve *A. apis* izolasyonu yapılan 20 kovanın 19'unda (%95) *Varroa* bulaşıklığı saptandı 17 kovanda (%85) ise

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

koruma amaçlı antibiyotik (Apimisin-Eritromisin) kullanıldığı saptandı.

Kovan sahiplerinden alınan bilgiye göre 17 kovanda (%85) eski peteklerin kullanıldığı, 14 kovanda (%70) ise kovanlar arası petek değişimi yapıldığı bildirilmiştir.

Kovanların yerleşim durumları incelendiğinde 15 kovanın (%75) uçuş deliğine yakın çevresinde uzun

boy lu bitkilerin olduğu, 14 kovanın ise (%70) yerden yüksekliğinin 30 cm'den az olduğu belirlendi.

Yedi kovan sahibinden (%35) hastalık çıkan dönemlerde bölgelerinde zirai ilaç uygulaması yapıldığı öğrenildi.

Mantar infeksiyonu görülen ve etken izolasyonu yapılan 20 kovanda saptanan predispozisyon faktörleri Tablo-2'de gösterilmiştir.

**Tablo-2** A. apis izolasyonu yapılan kovanlarda belirlenen predispozisyon faktörleri.

Kovan No	Mevcut hastalık durumu	Kovan yakın çevresinde uzun boy lu bitki varlığı	Kovan yüksekliği (Yerden yüksekliği 30 cm'den düşük)	Eski petek kullanımı	Petek değişimi	Antibiyotik kullanımı	Zirai ilaç uygulaması
	Varroa						
Kovan 1	+	-	+	+	-	+	-
Kovan 2	+	+	+	+	+	+	-
Kovan 3	+	+	+	+	+	+	-
Kovan 4	+	-	-	+	-	+	-
Kovan 5	+	+	+	+	+	+	-
Kovan 6	+	+	+	+	+	+	-
Kovan 7	+	-	-	+	-	+	-
Kovan 8	+	-	-	+	+	+	-
Kovan 9 <sup>a</sup>	+	-	-	+	+	+	-
Kovan 9 <sup>b</sup>	+	-	-	+	+	+	-
Kovan 10 <sup>a</sup>	+	+	+	-	+	-	+
Kovan 10 <sup>b</sup>	-	+	+	-	+	-	+
Kovan 11 <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Kovan 11 <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Kovan 12	+	+	+	+	+	+	+
Kovan 13	+	+	+	-	+	-	+
Kovan 14	+	+	+	-	+	-	+
Kovan 15	+	+	+	+	-	+	-
Kovan 16 <sup>a</sup>	+	+	+	+	-	+	-
Kovan 16 <sup>b</sup>	+	+	+	-	-	-	-
Kovan 17 <sup>a</sup>	+	+	-	+	-	+	+
Kovan 17 <sup>b</sup>	+	+	-	+	-	+	+
Kovan 18	+	+	-	+	+	+	+
Kovan 19	+	+	+	+	+	+	-
Kovan 20	+	+	+	+	+	+	-

<sup>a,b</sup> Numuneler farklı tarihlerde iki kez gelmiştir.

+ Belirtilen predispozisyon faktörleri mevcuttur.

- Belirtilen predispozisyon faktörleri mevcut değildir.

Periyodik kontroller sırasında, mantar infeksiyonlarına karşı kraliçe arının değiştirilmesi, kovanların yerden yüksekliğinin 40-45 cm'ye çıkarılması, kovan çevresindeki otların kesilmesi, eski peteklerin uzaklaştırılması, kovanların değiştirilip dezenfekte edilmesi, gereksiz antibiyotik

kullanılmaması, kovanların bulunduğu alana temiz su konulması gibi koruyucu önlemlerin uygulandığı hastalıklı kovanlarda kireç hastalığı infeksiyonunun herhangi bir ilaç tedavisine gerek kalmadan klinik semptomların kaybolduğu görüldü. Bu önlemleri alan 15 kovandan ikinci kez alınan materyallerde

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

etken üremesi olmadı. Önlemleri uygulamayan 5 kovanda ise enfeksiyonun klinik bulgular devam etti ve ikinci kez etken izolasyonu yapıldı (Tablo 3). Bu kovanlarda da gerekli önlemler alındıktan sonra enfeksiyon bulguları kayboldu. Üçüncü kez alınan örneklerde etken üremesine rastlanmadı.

### Meteoroloji Sonuçları:

2003-2005 yılları arasında kireç hastalığı enfeksiyonunun yaygınlığı incelendiğinde enfeksiyonun en yoğun olarak 2004 Mart-Mayıs döneminde görüldüğü belirlendi. 2004 yılındaki nem oranı %73 iken 2003 ve 2005 yıllarındaki nem oranının %60 olduğu belirlendi. Aynı zamanda

enfeksiyonun en yaygın olduğu 2004 yılının Mayıs ayında ortalama nemin %94-96 olduğu tespit edildi.

### İstatistiksel Analiz Bulguları:

Yapılan Ki-Kare testine göre kireç hastalığı enfeksiyonu bulunan kovanlarda *Varroa* enfestasyonu tek olarak diğer predispozisyon faktörlerine göre istatistiksel olarak daha önemli bulundu ( $p<0.05$ ).

*Varroa* bulaşıklığı, eski petek kullanımı ve antibiyotik uygulaması gibi predispozisyon faktörlerinin aynı anda bulunduğu kireç hastalığı enfeksiyonlu kovanlar ile diğer kovanlar arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.-**Periyodik kontroller sırasında enfeksiyon çıkan kovanlarda önerilen ve uygulanan koruyucu önlemler

Kovan No	Kraliçe arı değişimi	Kovanların yerden yüksekliğinin artırılması	Kovan çevresi uzun boylu otların temizlenmesi	Kovan değişim ve dezenfeksiyonu	Eski peteklerin uzaklaştırılması	Temiz su konulması	Predispoze faktörlerin düzenlenmesinden sonra <i>A. apis</i> üremesi
1	-	+	Ø	-	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	-
4	-	Ø	Ø	+	+	+	-
5	-	+	+	-	+	-	-
6	-	+	+	-	+	-	-
7	+	Ø	Ø	+	+	+	-
8	+	Ø	Ø	-	+	-	-
9 <sup>a</sup>	-	Ø	Ø	-	-	-	+
9 <sup>b</sup>	+	Ø	Ø	+	+	-	-
10 <sup>a</sup>	-	-	-	Ø	-	+	+
10 <sup>b</sup>	+	+	+	Ø	-	+	-
11 <sup>a</sup>	-	-	-	+	-	+	+
11 <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	-
12	-	+	+	+	+	+	-
13	-	+	+	Ø	-	+	-
14	-	+	+	Ø	-	+	-
15	-	+	+	+	+	+	-
16 <sup>a</sup>	-	+	-	+	+	+	+
16 <sup>b</sup>	+	+	+	-	+	+	-
17 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	+	+
17 <sup>b</sup>	+	-	-	+	+	+	-
18	+	-	+	+	+	+	-
19	-	+	+	+	+	+	-
20	-	+	+	+	+	+	-

<sup>a,b</sup> Numuneler üç kez gelmiştir.

+: Öneri yapılan ve uygulanan durumlar

-: Öneri yapılan ve uygulanmayan durumlar

Ø: Öneri yapılmayan durumlar

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma ile Bursa'nın farklı ilçelerindeki arıcılık işletmelerinde mantar infeksiyonlarının yaygınlığı incelenmiş, etkenler belirlenmiş ve infeksiyonun oluşumunda etkili olan predispozisyon faktörlerinin önemi araştırılmıştır. Ayrıca taraması yapılan kovanların 2 yıl boyunca periyodik kontrolleri yapılmıştır. Mantar infeksiyonlarına karşı koruyucu önlemler tavsiye edilmiştir. Periyodik kontroller sırasında bu önlemlerin alındığı kovanlarda iyileşme olup olmadığı incelenmiştir.

Yirmi kovandan alınan mantar infeksiyonu şüpheli her iki tür materyalden de kireç hastalığının etkeni *A.apis* %100 oranında izole edilmiştir. Ayrıca dört (%20) kovana ait işçi arı örneklerinde aynı zamanda *Penicillium* spp. ürettiği tespit edilmiştir. Bu bulgular Bursa ve çevresindeki arıcılık işletmelerindeki mantar infeksiyonlarına *A. apis*'in neden olduğunu ve kireç hastalığının arılar için önemli bir sorun teşkil ettiğini göstermiştir. Türkiye'de 1992 yılından beri kireç hastalığı konusunda yapılan az sayıdaki çalışmalarda (Kaftanoğlu ve ark.1995, Çakmak ve ark., 2003) belirlenen prevalans oranlarına (%73, %26) göre bu çalışmada saptanan %23.8'lik oranın düşük olması diğer çalışmaların anket çalışması niteliğinde olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada, klinik olarak şüpheli kovanlardan alınan larva ve işçi arı örneklerinin hepsinden *A. apis* izole edilmiştir. İşçi arıların tümünde kireç hastalığı etkeninin izole edilmesi infeksiyonun larvalara bulaştırılmasında işçi arıların etkili olduğunu, ayrıca kovandan kovana infeksiyonun taşınmasına neden olabildiklerini göstermiştir. Bu bulgu hastalığın bulaşmasında işçi arıların önemli rolü olduğunu belirten kaynaklar (Nelson ve Gochbauer, 1982, Koenig ve diğ., 1987, Jakobson ve diğ., 1987, Faucon ve ark., 2002, Lee ve diğ., 2003, Calderon ve diğ., 2004) ile uyumlu bulunmuştur. İşçi arıların infeksiyonun bulaşmasında etkili olduğu bilinmekle birlikte Türkiye'de işçi arılardan etkenin izole edilmesine yönelik başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Arılarda mantar infeksiyonlarında, predispozisyon faktörleri oldukça önem taşımakta, infeksiyonun oluşumunda ve infeksiyonla mücadelede de etkili olmaktadır. Bu çalışmada, kovanlarda fungal

infeksiyon taraması yapılırken infeksiyona neden olabilecek predispozisyon faktörleri de incelenmiştir.

Bal arılarında kireç hastalığı ve *Varroa* arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan bir çalışmada *Varroa* ile infeste kolonilerde kireç hastalığı insidensinin %13.5-52.3 olduğu, *Varroa* enfestasyonu bulunmayan kolonilerde ise insidensin %10-18.8 olduğu belirlenmiş ve *Varroa* türlerinden *A. apis* sporlarının izole edildiği, elektron mikroskobu ile *Varroa* türlerinin kütikulası incelendiğinde *A. apis* sporlarının kütikulaya yapışmış durumda olduğu saptanmış, bu sonuçlara göre de *Varroa* türlerinin kireç hastalığının potansiyel vektörü olabileceği bildirilmiştir (Liu, 1996). Bir başka çalışmada ise yoğun *Varroa* enfestasyonu görülen kolonilerde kireç hastalığının daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Medina ve Mejia, 1999). Sammataro ve Finley (2004), kireç hastalığı mummyaları bulunan peteklerin, *Varroa* enfestasyonu bulunmayan kolonilere transferi durumunda ya da çekirdek koloni olarak kullanıldıklarında kolonilere *Varroa* akarını bulaştırdıklarını saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *A. apis* izolasyonu yapılan 20 kovanın 19'unda (% 95) *Varroa* enfestasyonu saptanmıştır. Bu da *Varroa* enfestasyonunun bulunmasının kireç hastalığına duyarlılığı arttırdığını belirten araştırmalarla paralellik göstermiştir. Kireç hastalığı semptomu gösteren kolonilerde %95 oranında *Varroa* enfestasyonu belirlenmesi ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı bulunması ( $p<0.05$ ) *Varroa* enfestasyonunun kireç hastalığında en etkili predispozisyon faktörü olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, *Varroa* türlerinin taşıyıcılığının yanısıra arılarda stres faktörü olarak da etkili olabildiğini vurgulamaktadır (Bienkowska ve diğ., 1996, Liu, 1996, Medina ve Mejia, 1999). Bu çalışmada *Varroa* türlerinden etken izolasyonu yapılmadığı için hastalığın oluşumunda *Varroa* türlerinin ne şekilde etki gösterdiği yorumlanamamıştır.

Gereksiz antibiyotik uygulamalarının bal arılarında intestinal mikrofloranın dengesini bozması nedeniyle *A. apis* gibi mantar etkenlerinin gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir. (Bienkowska ve diğ., 1996, Menapace ve Wilson, 1979). Flores ve arkadaşları (2004) oksitetrasiklin uygulamasının tek başına değil de rutubet, ani sıcaklık düşmesi durumunda, kovanlarda kireç hastalığını tetikleyici etki yaptığını bildirmişlerdir.

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

Bu çalışmada görüşülen, arı yetiştiricileri 17 kovanda (%85) koruma amaçlı antibiyotik (Apimisin-Eritromisin) kullandıklarını belirtmişlerdir. İki yıl boyunca kovanlar periyodik olarak kontrol edilmiş ve gerekli uyarılar yapılmıştır. Bu kovanların tümünde kireç hastalığı görülmesi antibiyotiklerin infeksiyonun çıkışında etkili olduğu görüşlerini desteklemiştir. Ayrıca infeksiyonun en yaygın görüldüğü dönem olan 2004 yılı Mart-Mayıs döneminde nem oranının da meteorolojik verilere göre yüksek olması, Flores ve arkadaşlarının (2004) bulgularıyla paralel olarak nemin, antibiyotiğin olumsuz etkisini artırdığını düşündürmüştür. Diğer taraftan antibiyotik uygulaması ballarda da kalıntıya neden olmaktadır. Bu nedenle arı yetiştiricileri antibiyotik kullanımından kaçınılmalıdır (Bailey ve Ball, 1991, Puerta ve diğ., 1994, Hornitzky, 2001).

Hastalıklı ve eski petekler ile infeksiyon çıkan kovanlar da kireç hastalığı bulaşmasına neden olabilmektedir. Buralarda etkenin sporları uzun süre canlı kalarak sağlıklı kolonileri de infekte edebilir. Bu peteklerin yenileri ile değiştirilmesi sonucunda kireç hastalığı şiddetinin azaldığı, sonraki yıllarda daha az sorun yaşandığı yapılan bir araştırmayla bildirilmiştir (Koenig ve diğ., 1986). Arı kovanlarında kullanılan peteklerin süresi ve tipi de kireç hastalığı ortaya çıkmasında oldukça etkilidir. Koenig ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan bir çalışmada iki farklı yeni petek, etilen oksit fumigasyonu yapılmış eski petekler, 5-30 yıllık ve 30-45 yıllık petekler kullanılarak kolonilerde kireç hastalığının görülme oranı incelenmiş ve hastalıktan sonra mutlaka yeni petek kullanılmasının gerekli olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca petek yapımında kullanılan balmumunda bulunan *A. apis* sporlarının larvaları infekte edebileceği rapor edilmiştir (Zeybek, 1991, Flores ve diğ., 2005). Bu araştırmada kovan sahipleri ile görüşülmüş ve infeksiyon görülen 17 kovanda (%85) 2-3 yıl önceki peteklerin kullanıldığı belirlenmiştir. On dört kovanda (%70) ise kovanlar arası petek değişimi yapıldığı saptanmıştır.

Bu çalışmada, *Varroa* enfestasyonu, eski petek kullanımı ve antibiyotik uygulamasının kombinasyonunun istatistiksel olarak önemli olması ( $p < 0.05$ ) bu üç faktörün hastalığın ortaya çıkmasında oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Bu da yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Menapace ve diğ., 1979, Koenig ve diğ., 1986, Flores ve diğ., 2004, Flores ve diğ., 2005).

Etkenin sporlarının soğuk ve nemli havada daha fazla gelişme göstermesi nedeniyle kovan dip tahtasının nemli toprak üzerine yerleştirilmemesi, kovanların yerden 35-40 cm yükseklikte sehpa, birbirine paralel iki ağaç ya da briket üzerine yerleştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Stephen ve diğ., 1981, Gilliam, 1987, Gilliam ve ark., 1988, Gilliam ve Vandenberg, 1990, Zeybek, 1991, Shimanuki ve Knox, 2000). Bu çalışmada, infeksiyon semptomu görülen kovanların ıslak toprak zemin üzerinde bulunmasının hastalık oluşumunu hızlandırdığı düşünülmüştür. Nem, kireç hastalığını indükleyici bir predispozisyon faktörüdür. Bu nedenle kovanların yerden en az 30-40 cm yükseklikte olması ve rutubete maruz kalması engellenmelidir.

Ayrıca kovan çevresinde uzun boylu bitkilerin varlığı (Gilliam ve Vandenberg, 1990, Bailey ve Ball, 1991, Zeybek, 1991), kovanlar arası petek aktarımı (Flores ve diğ., 2004, Flores ve diğ., 2005), zirai ilaç uygulamaları (Doğan ve diğ., 1999) gibi faktörlerin de predispozisyonu artırdığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada da uzun boylu bitkilerin varlığı %75, kovanlar arası petek aktarımı %70, zirai ilaç uygulaması %35 oranında bulunmuştur. Bu faktörlerde hastalığa yakalanma olasılığını artırmaktadır.

İnfeksiyonla mücadele için kovanları temizlenmesi ve dezenfekte edilmesinin (Seal, 1957, Giaffuret ve diğ., 1969, Herbert ve diğ., 1977, Stephen ve diğ., 1981, Gilliam, 1987, Flores ve diğ., 2005), arılıklarda temiz su bulundurulmasının (Herbert ve diğ., 1977, Koenig ve diğ., 1986), kraliçe arının değiştirilmesinin (Herbert ve ark., 1977, Charles ve Milne, 1983, Moritz, 1988, Spivak ve Reuter, 1998) oldukça önemli olduğu bildirilmiştir.

Hastalık saptanan kovan sahiplerine predispozisyon faktörlerini engellemek için kovan dezenfeksiyonu yapılması, eski ve kontamine peteklerin kovanlardan uzaklaştırılması, arılıklarda temiz su bulundurulması, kovanların yerden yüksekliğinin artırılması, kovan çevresindeki uzun boylu bitkilerin kesilmesi genetik yatkınlığı engellemek için kraliçe arının değiştirilmesi gibi önerilerde bulunulmuştur. Kovanlara herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır. Önlemlerin alınması sonrasında kovanlarda infeksiyon belirtileri kaybolmuş ve tekrar alınan örneklerde herhangi bir etken üremesine rastlanmamıştır. Ayrıca, bu önlemler alınmayan 5 kovanda klinik olarak infeksiyon belirtileri devam etmiş ve tekrar alınan

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

örneklerde *A. apis* izole edilmiştir. Tekrar hastalık çıkan ve etken izolasyonu yapılan kovan sahiplerinin belirtilen önlemleri alması sonucu enfeksiyon belirtileri kaybolmuş ve herhangi bir etken izolasyonu olmamıştır. Bu durum predispozisyon faktörlerinin kireç hastalığının ortaya çıkmasında ne kadar etkili olduğunu ve alınan önlemler sonucu ilaç kullanımına gerek kalmaksızın hastalığın ortadan kaldırılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışma ile Bursa ve çevresindeki arıcılık işletmelerinde mantar enfeksiyonları yönünden kovan taramaları yapılmış, mantar enfeksiyonu semptomları gösteren kovanlardan örnekler alınmış ve izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Larva ve işçi arı örneklerinden %100 oranında *A. apis* izole edilmiştir. Bu sonuçlar Bursa ve çevresinde bal arılarında kireç hastalığının diğer mantar enfeksiyonlarına göre daha yaygın olduğunu göstermiştir. *Varroa* enfestasyonu, eski petek kullanımı ve antibiyotik uygulamasının en etkili predispozisyon faktörleri olduğu ve ilaç uygulamasına gerek kalmadan belirli korunma tedbirlerinin alınmasının enfeksiyonla mücadelede oldukça etkili olduğu saptanmıştır.

### KAYNAKLAR

- Alizadeh, A., Mossadegh, MS.1994. Stonebrood and some other fungi associated with *Apis florea* in Iran. *Journal of Apicultural Research*, 33: 213-218.
- Anderson, DL., Giaccon, H., Gibson, NL. 1997. Culture, detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 36: 163-168.
- Anderson, DL., Gibson, NL. 1998.New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Australian Systematic Botany*, 11: 53-72.
- Bailey, L. 1967. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Pathology and Microbial Control*, Wageningen, editor: P.A. van der Laan, North-Holland Publishing, Amsterdam, 162-167.

- Bailey, L., Ball, BV. 1991. Fungi. *Honey bee pathology*. Second Edition, Academic Press, London, page: 53-62.
- Batra, LR., Batra, SWT., Bohart, GE. 1973. The mycoflora of domesticated and wild bees (Apiodea). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 49: 13-14.
- Bienkowska, M., Pohorecka K., Konopacka, Z. 1996. Preliminary investigations on the relationship between *Varroa* and chalkbrood infestations in honeybee colonies. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, XL(2):271-272.
- Calderon, RA., Rivera, G., Sanchez, LA., Zamora, LG. 2004. Chalkbrood (*A. apis*) and some other fungi associated with africanized honey bees (*apis mellifera*) in Costa rica. *Journal of Apicultural Research*, 43: 187-188.
- Charles, P., JR Milne. 1983.Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. *Annals of the Entomological Society of America*, 76: 384-387.
- Çakmak, İ, Aydın, L., Güleğen, E. 2003.Güney marmara bölgesinde bal arısı zararlıları ve hastalıkları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3: 33-35.
- Dallman, H. 1966. New methods for the control of chalkbrood in bee colonies. *Garten und Kleintierzucht, Ausgabe C, Imker*, 5: 10.
- Deans, ASC. 1940. Chalkbrood. *Bee World*, 21: 46.
- Doğan, A., Topçu, B., Bilgili, A.1999.Arılarda organik fosforlu insektisit (Kaumafos) zehirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5: 125-127.
- Faucon, JP., Mathieu, L., Ribiere, M., Martel, AC., Dranjnudel, P., Zeggane, S., Nelson, DL., Gochnauer, TA. 1982. Field and laboratory studies on chalkbrood disease of honey bees. *American Bee Journal*, 122: 29-34.(Metinde 2002)
- Flores, JM., Gutierrez, I., Puerta, F. 2004.Oxytetracycline as a predisposing condition for chalkbrood in honey bee. *Veterinary Microbiology*, 103: 195-199.
- Flores, JM., Spivak, M., Gutierrez, I. 2005. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

- foundation can infect honeybee brood. *Veterinary Microbiology*, 108: 141-144.
- Giauffrett, AM., Taliervo, YP. 1967. Fungal diseases of the honey bee (*Apis mellifera* L.): a study of some antimycotics. *Bulletin Apicole*, 9: 123-124.
- Giaffuret, A., Tostain-Caucat, MJ., Taliervo, Y. 1969. Possibilities of disinfection by ethylene oxide in bee pathology. *Bulletin Apicole*, 12: 45-52.
- Gilliam, M. 1987. Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *A. apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 17: 93-100.
- Gilliam, M, Lorenz, BJ., Prest, DB., Camazine, S. 1993. *Ascosphaera apis* from *Apis cerena* from South Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 111-112.
- Gilliam, M., Taber, S. III, Richardson, GV. 1983. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie*, 14: 29-39.
- Gilliam, M., Taber, III S., Lorenz, BJ., Prest, DB. 1988. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 314-325.
- Gilliam, M, Vandenberg, JD. 1990. Fungi. Editor: MORSE RA., NOWOGRODZKI R. *Honey bee pests, predators and diseases*. Cornell University Press, Ithaca and London, page 64-91.
- Gochnauer, TA., Furgula, B., Shimanuki, H. 1975. *Diseases and enemies of the honey bee*. Editors: Dadant and Sons. The hive and the honey bee. Hamilton, Illinois: Dadant and Sons, page: 615-662.
- Hale, PJ., Menapece, DM. 1980. Effect of time and temperature on the viability of *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 429-430.
- Herbert, EW. Jr., Shimanuki, H., Knox, DA. 1977. Transmission of chalkbrood disease of honeybees by infected queens, and worker brood and adults. *Journal of Apicultural Research*, 16: 204-208.
- Hornitzky, M. 2001. Literature review of chalkbrood a fungal disease of honey bees. *Rural Industries Research Development Corporation (RIRDC)*, 11, 1-14.
- James, RR., Skinner, JS. 2005. PCR diagnostic methods for *Ascosphaera* infections in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 98-10.
- Kaftanoğlu, O., Yeninar, H., Kumova, U., Özkök, D. 1995. Epidemiology and control of honeybee (*Apis mellifera* L.), diseases in Turkey. TUBİTAK Project No VHAG-925, TUBİTAK Publication No: 92-0054, Final Report. 93 pp. Ankara.
- Kayral, G. 2004. *Yeni teknik arıcılık*. 8. Baskı, Simgel Ofis Matbaacılık Ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul.
- Koenig, JP., Boush, GM., Erickson, EH. 1986. Old may contribute to chalkbrood disease. *American Bee Journal*, 126: 191-192.
- Koenig, JP., Boush, GM., Erickson, EH. 1986. Effect of type of brood comb on chalkbrood disease in honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research*, 25: 58-62.
- Koenig, JP., Boush, GM., Erickson, EH JR. 1987. Isolation of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, from honey bee (*Apis mellifera*) surfaces, pollen loads, and a water source. *American Bee Journal*, 127: 581-583.
- Lee, ML., Lee, MY., Chang, YD. 2003. Infection rates of three common diseases of *Apis mellifera* L. in Korea. *Apimondia*.
- Liu, TP. 1996. *Varroa* mites as carriers of honeybee chalkbrood. *American Bee Journal*, 136: 655.
- Maghrabi, HA., Kish, LP. 1987. Isozyme characterization of *Ascosphaerales* associated with bees. IV. Analyses. *Mycologia*, 79: 519-523.
- Martin, EC., 1975. The use of bees for pollination. Editor: Dadant and sons. *Hive and honey bee*.
- Maurizio, A. 1935. Fungi in bee colonies. I. Pericystis infection of bee larvae. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 44: 133-156.
- Medina, LM., Mejia, EV. 1999. The presence of *Varroa jacobsoni* mite and *Ascosphaera apis* fungi in collapsing and normal honey bee (*Apis*

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

- mellifera* L.) colonies in Yucatan, Mexico. *American Bee Journal*, 139:794-796.
- Mehr, Z., Menapace, DM., Wilson, WT., Sackett, RR. 1976. Studies on the initiation and spread of chalkbrood within an apiary. *American Bee Journal*, 116: 266-268.
- Menapace, DM., Wilson, WT. 1979. Feeding oxytetracyclines as terramycin does not aggravate chalkbrood infections. *Apidologie*, 10: 167-174.
- Moeller, FE., Williams, PH. 1976. Chalkbrood research at Madison, Wisconsin. *American Bee Journal*, 116: 484-486.
- Moritz, RFA. 1988. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *The Journal of Heredity*, 79: 257-262.
- Olroyd, BP. 1996. Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behaviour, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36: 625-629.
- Özakın, C., Aydın, L., Çakmak, İ., Güleğen, E. 2003. Hazır ve eski peteklerin bakteriyolojik ve mikolojik yönden incelenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3: 26-30.
- Özkırım, A., Keskin, N. 2002. Distribution of the major bacterial brood diseases diagnosed in apiaries in Ankara and its surroundings. *Mellifera*, 2-4: 40-44.
- Palacio, MA., Figini, EE., Ruffinengo, SR., Rodriguez, EM., Del Hoyo, ML., Bedaserraasbure, EL. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie*, 31: 471-478.
- Puerta, F., Flores, JM., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F. 1994. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie*.
- Puerta, F., Flores, JM., Ruiz, JA., Ruiz, JM., Campano, F. 1999. Fungal diseases of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Options Mediterraneennes Series: B*, 61-68.
- Sammataro, D., Finley, J. 2004. Observations of the ectoparasitic bee mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) cells infected with chalkbrood (*Ascosphaera apis*). *Journal of Apicultural Research*, 43: 28-30.
- Samsinakova, A., Kalalova, S., Haragsin, D. 1977. Effects of some antimycotics and disinfectants on the *Ascosphaera apis* Maassen fungus in vitro. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 84: 225-232.
- Seal, DWA. 1957. Chalkbrood disease of bees. *New Zealand Journal of Agriculture*, 95:
- Shimanuki, H., Knox, DA. 2000. Diagnosis of honey bee diseases. *Agriculture Handbook Number 690*, United States Department of Agriculture, 14-16.
- Spivak, M., Downey, DL. 1998. Field assays for hygienic behavior in honey bees. *Journal of Economic Entomology*, 91: 64-70.
- Spivak, M., Gilliam, M. 1993. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, 32: 147-157.
- Spivak, M., Reuter, GS. 1998. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, 29: 291-302.
- Stanimirovic, Z., Pejovic, D., Stevanovic, J. 2002. Hygienic behavior diseases resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera* Carnica) from Serbia. *Apiacta*, 37: 24-31.
- Stephen, VP., Vandenberg, JD., Fichter, BL. 1981. Etiology and epizootiology of chalkbrood in the leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fabricius), with notes on *Ascosphaera* species. *Australian Experiment Station*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, Station Bulletin number 653. 562.
- Summerbell, R. 2003. Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedria and Their relatives. Edit: Howard DH. *Pathogenic fungi in humans and animals*. 237-499, Second edition, New Orleans, Louisiana, Marcel Dekker Inc.
- Taber, S. 1986. Breeding bees resistant to chalkbrood disease. *American Bee Journal*, 126, 823-825. *T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü* <http://www.meteor.gov.tr/index.aspx>

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

- Tınar, R., 1994. Türkiye’de yetiştirilen bal arılarında görülen önemli hastalıklar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 18: 199-203.
- Toumanoff, C. 1951. The diseases of bees. *Revue Française d’Apiculture* numero special, 68.
- Tutkun, E. 2000. Teknik arıcılık el kitabı. *Türkiye Kalkınma Vakfı*, Yayın No: 6, Ankara.
- Tutkun, E, Boşgelmez, A. 2003. *Bal arısı zararlıları ve hastalıkları teşhis ve tedavi yöntemleri*. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Wille, H. 1964. Control of chalkbrood. *Schweizerische Bienen-Zeitung*, 87: 381.
- Witte, K DE. 2000. Chalkbrood disease of honeybees. *Agnote*, 578, No: K11, 1-3, February
- Yakobson, BA., Elad, D., Efrat, H. 1987. Chalkbrood (ascosphaeromycosis) in apiaries in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 43: 1, 28-33.
- Zeybek, H. 1991. *Arı hastalıkları ve zararlıları*. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik/Ankara.

### EXTENDED ABSTRACT

**Goal:** There are few reports on the presence of chalkbrood and other mycotic diseases in honey bees in north-west Turkey. The aims of the present study were to determine the fungal agents in apiaries with clinical symptoms of fungal infections and the predisposing factors in chalkbrood disease.

**Materials and Methods:** From August 2003 to August 2005, 84 colonies were clinically examined for chalkbrood symptoms. The effect of predisposing factors were noted for fungal infections. Use of old comb in hives, comb transfer, elevation of the colonies from the ground, antibiotic application, varroa mites infestation, foulbrood diseases and presence of tall plants surrounding the hives were analyzed. Humidity level was recorded according to the Turkish State Meteorological Service Data (Turkish State Meteorological Service Datas in the Republic of Turkey, 2000-2005).

### Clinical examination

The pollen traps, bottom boards, and any uncapped cells on all frames as well as colony entrance and

surrounding areas were examined for chalkbrood mummies. Mummies were removed from the colonies and counted. Predisposing factors were recorded for chalkbrood infection in hives with clinical symptoms.

### Mycological examination

Brood samples and adult worker bees were collected for mycological examination from 20 beehives showing clinical symptoms of chalkbrood disease. Brood samples and worker bee samples were cultured with different methods.

### Statistical analysis

The chi square test was used to detect the single and combined effects of predisposing factors on chalkbrood disease by using GraphPad InStat computer software V2.02 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). In this study, 84 beehives located in north-west Turkey were examined in a period between August 2003 and August 2005 for chalkbrood disease and predisposing factors. Mummified broods and healthy appearing worker honeybees from colonies with clinical symptoms of chalkbrood disease were collected and cultured for microbiological examination. *Ascosphaera apis* (*A. apis*) was isolated from all samples in 20 (100%) hives.

Predisposing factors for chalkbrood infection were examined and recorded. *Varroa destructor* (*V. destructor*) infestation was detected as the most important predisposing factor. Also, use of old combs and application of antibiotics were very effective predisposition factors. We observed clinical symptoms of chalkbrood in beehives especially during early spring since humidity was very effective on chalkbrood disease.

Examined beehives were periodically monitored for the following two years and preventive precautions were recommended against the fungal infections, which were examined in later visits. Removing old combs from hives and refreshment of water in apiaries were more important than other precautions. We also observed that clinical symptoms disappeared without any treatment when prophylactic measures were carefully applied.

**Results and Conclusion:** The results showed that *A. apis*, the causative agent of chalkbrood, was the most common fungi isolated in all the beehives showing clinical symptoms of chalkbrood disease in north-west Turkey. We diagnosed *V. destructor*

## ARI BİLİMİ / BEE SCIENCE

infestation in 19 (95%) of 20 hives. The infestation level of varroa mites in the colonies must be reported. According to our results, *V. destructor* infestation is the most important factor of chalkbrood disease. Varroa mites can be carrier of honey bee chalkbrood agent and stress factors for honey bee. We suggest that beekeepers should make a good control of *Varroa* infestation to prevent from chalkbrood disease. Some researchers reported that *Varroa* infestation is an important factor for chalkbrood disease.

Also, we observed antibiotics were applied in 17 (85%) of 20 hives. We observed that antibiotics use in beehives could be a predisposing factor in chalkbrood disease. Antibiotics break the microflora of honey bees and cause stress resulting in the increase of the development of fungal agents as *A. apis*. Unnecessary application of antibiotics increases the risk of chalkbrood. Some researchers have indicated that antibiotics could be a predisposing condition in chalkbrood disease

Use of old combs was reported in (80%) of 20 hives, transfer of comb between hives was determined in (70%) of 20 hives. Use of old combs was determined in hives that were 2 years old or older. When a colony becomes infected with chalkbrood, the agent spores may remain viable on the combs. Also foundation wax contaminated with *A. apis* spores may be a source of chalkbrood in honey bee colonies. *A. apis* spores in old combs may cause of chalkbrood infection in healthy colonies. Combs should not be used more than two years. The combs from infected colonies should not be used use in healthy colonies. Use of new combs reduce chalkbrood infection when compared to the use of old combs.

Tall plants were observed around the entrance of 15 (75%) of 20 hives. Many authors reported that height of beehives from ground and existence of tall

plants surrounding the hives, water source, and queen bees are important predisposing factors for chalkbrood disease of bees.

*V. destructor* infestation was found to be the most significant single predisposing factor ( $p<0.05$ ). The most important combined effect was seen when *V. destructor* infestation, usage of old combs and antibiotic treatment were encountered together ( $p<0.05$ ).

Chalkbrood was very common during the year 2004 March and May compared with in the year 2003-2005. Humidity level was very high during the year 2004 (Turkish State Meteorological Service Data in the Republic of Turkey, 2000-2005). The average humidity in 2004 was 73%, while it was 60% in both 2003 and 2005 according to the Turkish State Meteorological Data. Also, average humidity was 94-96% in May 2004. We observed that 14 (70%) of the hives showing clinical symptoms were placed on the ground. This result indicates that humidity is an important factor for chalkbrood disease.

The disinfection of infected hives, increasing the height of hives from the ground, removing old combs from infected hives, changing the queen bees of infected hives with a new and young one, and placing fresh water in the apiaries for the prophylaxis were suggested to the beekeepers. At the end of these arrangement clinical symptoms of chalkbrood disease were not observed in any beehives without treatment.

In conclusion, the most common fungal infection in honey bees is chalkbrood caused by *A. apis*. This is the first time isolation of the agent from worker honey bees in Turkey. Especially, use of old combs and antibiotic treatment together in the presence of *V. destructor* infestation are important for disease. Our results show that predisposing factors are very influential on chalkbrood disease.