

**KOVANLARDAN VE TÜKETİME SUNULAN BAL
ÖRNEKLERİNDEN PAENIBACILLUS LARVAE'NİN
İZOLASYONU**

**ISOLATION OF PAENIBACILLUS LARVAE FROM THE
HONEY SAMPLES TAKEN FROM THE BEEHIVES AND
HONEY INTRODUCED FOR CONSUMPTION**

Nedret AYDIN*
Gülay BIYIKLIOĞLU*

Hürriyet BÜLBÜL*
Cevdet YARALI*

M. Kadri YAVUZ*

Kabul Tarihi: 02.10.1998

Özet: Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerindeki sağlıklı kovanlardan ve tüketime sunulmuş ballardan alınan örneklerde, Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı etkeni olan *Paenibacillus larvae*'nin yaygınlığı tespit edilmiştir. Bu amaçla Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Antibiyotik Disk Üretim Laboratuvarına getirilen 327 bal numunesi incelenmiştir. Materyal öncelikli olarak nutrient agar'da üretilmiş ve oluşturulan vegetatif formlar aynı mediyumun agarına transfer edilmiştir. Daha sonra bal örnekleri dialize edilerek brain hearth infussion agar'a ve 6 µg/ml nalidixic asit eklenmiş kanlı agar'a ekilmiştir. *P. larvae* için önerilen tüm testler uygulanarak sonuca gidilmiştir. Kovanlardan toplanan 297 bal örneğinin %14.14'ünden, piyasadan satın alınan 30 bal örneğinin de %10'undan etken izole edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Paenibacillus (Bacillus) larvae*, Amerikan yavru çürüklüğü, bal.

Abstract: This study was performed for the detection of the prevalence of *Paenibacillus larvae* the causative agent of American Foulbrood Disease in the specimens collected from honey submitted to human consumption and also from healthy hives in the various regions of Turkey.

* Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE.

For this purpose, totally 327 honey specimens brought to The Antibiotic Disc Production Laboratory of the Central Veterinary Control and Research Institute were examined.

The material were propagated initially in the nutrient agar and the vegetative forms were transferred to the broth of the same medium. Then, the honey specimens were dialized and cultivated in the brain hearth infussion agar and cultivated in to the blood agar containing 6 mg/ml nalidixic acid. All the tests suggested for *P. larvae* were performed for obtaining the results. The agents were isolated from 14.14 % of the 297 honey specimens that were collected from hives and 10 % of the 30 honey specimens brought from the market.

Key Words: *Paenibacillus (Bacillus) larvae*, American foulbrood, honey.

Giriş

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de arıların infeksiyon hastalıkları içinde en tehlikeli ve bulaşıcı olanı Amerikan yavru çürüklüğü (AYÇ) hastalığıdır. Bu hastalık *Apis mellifera* ve diğer *Apis* türlerinin larvalarında spor formunda bir bakteri olan *Paenibacillus larvae* tarafından meydana getirilmektedir. Sporları ısıya ve kimyasal maddelere oldukça dirençlidir. Bunlar kontamine arılar, kovanlar, arıcılıkta kullanılan malzemeler, polen ve bal ile nakledilmektedir (5,7,13,18,19). Bal ile bulaşım bunların içinde en önemlisi kabul edilmektedir. Çünkü kontamine bal ile beslenen arılar larvalara infeksiyonu kolayca taşımaktadırlar. Bir günlük larvayı enfekte etmek için gerekli LD₅₀ 35 spor iken 4 günlüklerde bu sayı 1 milyonun üzerindedir (4). *Paenibacillus larvae* sporlarının dış şartlara oldukça dayanıklı olduğu, 35 yıl süre ile canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir (4,5,8).

AYÇ hastalığı dünyanın her bölgesinde yaygın olarak seyretmektedir (2,6,15). Hastalık ülkemizde de sık olarak görülmektedir. Tutkun (18) Oytun ve Aktun'a atfen 1947 yılında Kırklareli'nin Pınarhisar ilçesinde hastalığın görüldüğünü kaydetmiştir. Yine aynı araştırmacı (18) Leloğlu ve Balcı'ya atfen 1960-1961 yıllarında Kars'ın Posof ilçesindeki kovanlardan AYÇ etkeninin izole edildiğini bildirmektedir. Kaftanoğlu ve ark. (13) ise 1995 yılında 47 ilde yaptıkları anketlerde AYÇ hastalığının ortalama %24.1 oranında yayılış gösterdiğini belirtmektedirler.

Amerikan yavru çürüklüğünün tipik hastalık belirtilerinden dolayı semptomatik teşhisi kolayca yapılabilir. İnfeksiyonun çıktığı kovanların ısıtılmış zank gibi kokması tipiktir. Larvalı çerçevede boş, çökmüş veya delinmiş petekgözleri dikkati çeker. Bir kibrit çöpü ile larvaya dokunulduğunda uzama meydana geliş karakteristiktir. Klinik bulgular hastalığın teşhisinde önem taşırsa da kesin teşhis için marazi madde alınarak laboratuvar muayenelerinin yapılması gereklidir. Laboratuvarda bakteriyoskopi, kültürel ve biyosimik testler, ayrıca Holst süt testi ve immunfloresans yöntemleri uygulanarak kesin teşhise gidilir. Fakat immunfloresanda *Paenibacillus alvei* ile kros reaksiyonlar alınabilmektedir (4,5,8,14,19).

Bu çalışmada ülkemiz arıcılığını tehdit eden önemli bakteriyel infeksiyonlardan AYÇ hastalığının etkeni *P. larvae*'nin izolasyonu ve ballarda bulunma oranının tespiti başlıca amaç olarak ele alınmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklerin toplanması ve laboratuvara getirilmesi

Bu araştırma 1995-1996 yıllarında, Giresun, İzmir, Kırşehir, Sivas, Yozgat, Eskişehir, Ankara, Adana ve Kırıkkale illerinde bulunan kovanlardan ve Ankara piyasasında satılan ballardan alınan örnekler üzerinde yürütülmüştür. Toplam 297 adet kovan balı ve 30 adet tüketime sunulan bal örneği işlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: İllere göre gelen numune sayısı

Numunenin Alındığı İl	Adana	Ankara	Eskişehir	Giresun	İzmir	Kırıkkale	Kırşehir	Sivas	Yozgat	Ankara Market	Toplam
Numune Sayısı	46	48	11	81	36	15	8	21	31	30	327

Kovandaki larvalı peteklerden 8x10 cm. boyutlarında bir parça mukavva kutu içinde, piyasada tüketime sunulan süzme ve petek ballardan satın alınarak laboratuvara getirilmiştir.

Bal örneklerinin işlenmesi ve *Paenibacillus larvae* izolasyonu

Laboratuvara getirilen örnekler vidalı kapaklı tüplerde bulunan yarı katı ağara inokule edilerek 37 °C'de 2-3 gün inkübe edilmiştir. Yüzeğe doğru üreyen vegetatif formdan alınarak aynı vasatın glikozsuz haline petrilere ekilerek bir kaç gün sporulasyon için beklenmiştir. Klasik kitaplarda (3,4) belirtildiği şekilde Gram boyama, nigrosinle boyama ve Holst süt testi denenmiştir.

Bal örneklerinden 25 ml. alınarak 25 ml. su ile karıştırılmış ve 44 µm. lik dializ membrana konulmuştur. Distile suya karşı 18 saat dializ edilmiştir. Dializden sonra içerik 2000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant atılarak geri kalan kısım 9 ml su ile sulandırılarak karışım 80 °C'lik ben maride 15 dakika bırakılmıştır. Dializ sonunda brain hearth infussi on (BHI) ve kanlı ağara (6 µg/ml nalidiksik asit ve %7 sitratlı koyun kanı içerir) ekim yapılarak *Paenibacillus larvae* saf olarak üretilmiştir.

Daha sonra Voges-Prokauer, metil red, indol, katalaz ve nitrat redüksiyonu testleri yapılmıştır.

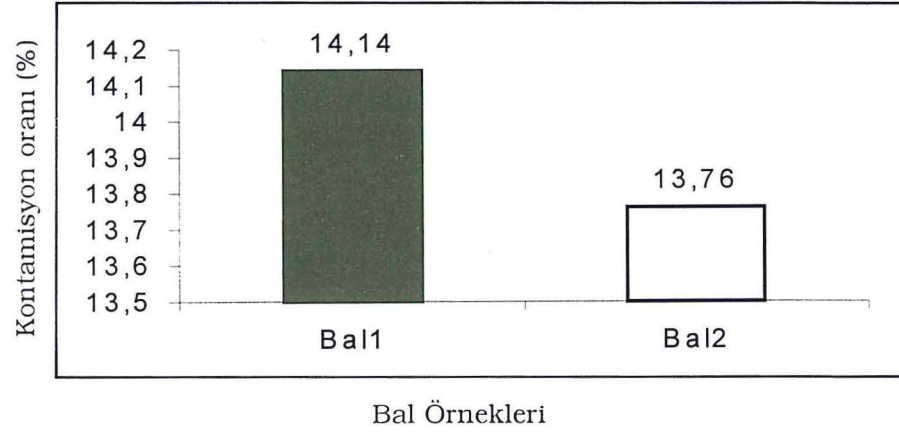
Bulgular

1995 ve 1996 yıllarında Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan 327 adet balın muayenesi sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

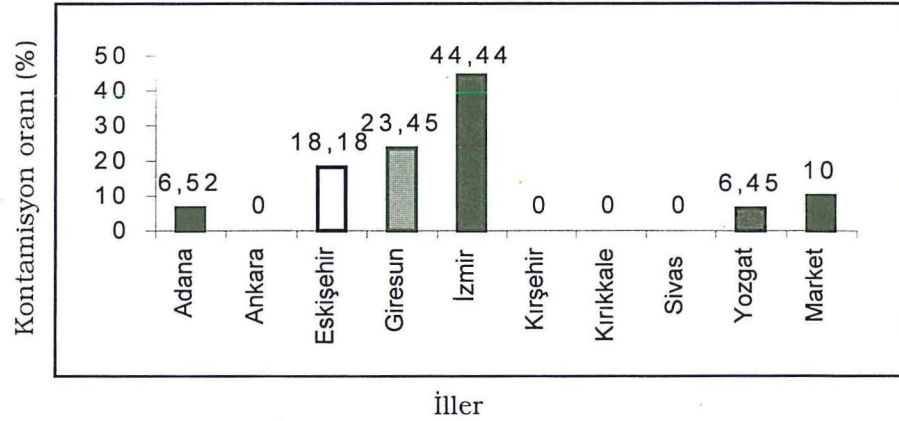
Farklı bölgelerde bulunan 9 ilden 297 adet kovan balı ve Ankara'da piyasada satılan 30 adet bal numunesi muayene edilmiştir. Kovan ballarının (Bal 1) 42'si (%14.14), piyasa ballarının da (Bal 2) 3'ünden (%10) *Paenibacillus larvae* izole edilmiştir. Toplam 327 numunenin 45 (%13.76)'i bu bakteri ile kontamine bulunmuştur (Grafik 1).

En yüksek bulaşım %44.44' lük oran ile İzmir'den gelen ballarda, en düşük bulaşım ise %6.45' lik oran ile Yozgat'tan gelen ballarda tespit edilmiştir. Kırşehir, Sivas, Ankara ve Kırıkkale'den gelen numunelerde *P. larvae* izole edilmemiştir (Grafik 2).

Grafik 1: Kovanlardan ve marketlerden alınan bal örneklerinde *P.larvae* ile kontaminasyon oranı



Grafik 2: İllere göre kontaminasyon oranı.



Tartışma ve Sonuç

Kovanlarda AYÇ hastalığı belirtisi olmadan da bal örneklerinde *P. larvae* sporları bulunabilmektedir. Çünkü etkenin sporları yağmacı arılar ve kontamine malzemelerle de kovana bulaşabilmektedir. Böyle kolonilerde hastalık oluşmayıp, semptom görülme dahi balalarda sporlar bulunabilmektedir. Ayrıca hastalığa karşı oksitetrasiklin kullanımında semptomların baskılandığı, ancak yine de bu kovanlarda etkenin bulunabileceği belirtilmektedir (16).

Avustralya'da 505 bal örneğinde yaptıkları çalışmalarında Hor-nitzky ve Clarck (9) *P.larvae* sporlarının bulunuşunu %12.5-16.5 olarak belirlemişlerdir. Deraksifar (6), 1993-94 yıllarında Avusturya'da yapmış olduğu çalışmasında toplanan 149 balın, yıllara göre sırasıyla %58, %71 oranında *P. larvae* ile bulaşık olduğunu kaydetmektedir. Batı Avustralya'da benzer çalışma yapan Kabay (12) ise bal örneklerinde 1991-92'de %25.5, 1992-93'de %32 oranında *P. larvae* izole ettiğini bildirmektedir.

Bu çalışmada değişik illerden temin edilen 327 kovan ve piyasa balının 45 adedi (%13.76) *P. larvae* ile kontamine bulunmuştur.

Shimanuki ve Knox (17) ballardan *P. larvae*'nin izolasyonunda dializ, sentrifugasyon, ısı şoku ve BHI agar kullandıklarını bildirmektedirler. Bu tür ekimlerde aynı ortamda ve *P. larvae*'den daha hızlı olarak AYYÇ etkeni olan *P. alvei* de üremektedir. Bunu inhibe etmek için değişik araştırmacılar (1,10,11,14) tarafından kanlı agara bir miktar nalidiksik asit eklenmesi gerekli görölmektedir. Bu çalışmada bu yöntemler kullanılarak biyokimyasal testlerle desteklenmiştir.

Sonuç olarak muayenesi yapılan ballarda *P. larvae* sporlarının küçümsenmeyecek oranda olduğu ve hastalığın bu tip kontamine ballarla daha hızlı bir şekilde yayılabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Alippi A M**, 1991. *A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, Apis mellifera, in Argentina.* Journal of Apicultural Research, 30 (2): 75-80.
- 2- **Alippi A M**, 1992. *Characterization of Bacillus larvae White, the causative agent of american foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina.* Revista Argentina de Microbiologia, 24:67-72.
- 3- **Arda M**, 1981. *Genel Bakteriyoloji*, 2. baskı, A Ü Basımevi, Ankara.
- 4- **Bailey L**, 1981. *Honey Bee Pathology*, Academic Press, ISBN 0-12-073480.
- 5- **Coşkun Ş Z**, 1994. *Arıların bakteriyel hastalıkları*, T. Parazit. Derg., 18 (2):204-208.
- 6- **Derakhsifar I**, 1995. *The appearance of American foulbrood spores in Austrian honeys as a diagnostic method for the early recognition of foulbrood populations.* Bienenvater, 116 (11): 464-469, (Ref: VETCD 89-97).
- 7- **Doğanay A**, 1993. *Arı Hastalıkları1. Balarısı hakkında genel bilgi.* Türk. Vet. Hek. Dern. Derg., 5 (2): 29-35.
- 8- **Faucon, J.P.**, 1989. *Pre'cis de pathologie. Connaitre et traiter les maladies des abeilles.* Cneva, Fnosad, 450.
- 9- **Hornitzky M A Z and Clark S**, 1991. *Culture of Bacillus larvae from bulk honey samples for the detection of American foulbrood.* Journal of Apicultural Research, 30 (1): 13-16.
- 10- **Hornitzky M A Z and Karlovskis S**, 1989. *A culture tecni-que for the detection of B. larvae in honeybees.* Journal of Apicultural Research, 28 (2): 118-120.
- 11- **Hornitzky M A Z and Wilson S C**, 1989. *A system foe the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees.* Journal of Apicultural Research, 28(4): 191-195.
- 12- **Kabay M J**, 1995. *Evaluation of the culture oh honey to de-tect American foulbrood.* Australian Veterinarı Journal, 72 (1): 33-34.

13- Kaftanoğlu O, Kumova U, Yeninar H ve Özkök D, 1995. *Türkiye'de balarısı hastalıklarının dağılımı, koloniler üzerindeki etkileri ve entegre kontrol yöntemlerinin uygulanması.* TÜBİTAK, VHAG-925.

14- Morse R A and Nowogrodzki R, 1990. *Honey Bee Pests Predators and Diseases.* 2nd ed., Comstock Publishing Associates, LONDON.

15- O I E Manuel, *American foulbrood,* November,1994.

16- Oldroyd B P, Goodman R D and Hornitzky M A Z, 1989. *The effect on American foulbrood of standart oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of European foulbrood on honeybees (Apis mellifera).* Australian Journal of Agricultural Research, 40:691-697.

17- Shimanuki H and Knox D. 1988. *Improved method for the detection of Bacillus larvae spores in honey.* American Bee Journal, 128 (5): 353-354.

18- Tutkun E ve İnci A, 1992. *Balarısı Zararlıları ve Tedavi Yöntemleri.* Demirciođlu Matbaacılık., ANKARA.

19- Zeybek H, 1991. *Arı Hastalıkları ve Zararlıları.* TKİB Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, Ankara.