



21. yıl 64.

ULUDAĞ ARICILIK DERGİSİ ULUDAG BEE JOURNAL

U. Arı D. - U. Bee J.

e-ISSN 2687-5594

Cilt: 21
Volume: 21

Sayı: 1
Number: 1

Mayıs 2021
May 2021

Uludağ Arıcılık Dergisi altı ayda bir Türkçe ve İngilizce olarak
Mayıs ve Kasım aylarında yayınlanan hakemli bir dergidir.

Uludag Bee Journal is peer reviewed and published
in Turkish and English in May - November



Bursa Uludağ Üniversitesi AGAM yayın organıdır.

This is a publication BDRC of Bursa Uludag University

E-Posta: agam@uludag.edu.tr
editoruad@gmail.com

Web Adresi: www.uludag.edu.tr/agam

İÇİNDEKİLER

CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALELERİ

RESEARCH ARTICLES

Bazı Etanolik Propolis Örneklerinin α -Glukosidaz ve α -Amilaz İnhibisyonu

1

A-Glucosidase and α -Amylase Inhibition of Some Ethanollic *Propolis Samples*
Nimet BALTAŞ

Nimet BALTAŞ

Güneybatı Ege Bölgesinde *Nosema* Türlerinin Mikroskopik ve Moleküler Olarak Belirlenmesi

8

Microscopic and Molecular Detection of *Nosema Sp.* in the Southwest Aegean Region

Serengül Kartal, Rahşan İvgin Tunca, Okan Özgül, Kemal Karabağ, Hasan Koç

Serengül Kartal, Rahşan İvgin Tunca, Okan Özgül, Kemal Karabağ, Hasan Koç

Akarisit Amitraz ve Fluvalinat'ın Bal Arısı *Apis mellifera*'nın Üreme ve Verimliliğine Etkisi

21

Effect of Miticides Amitraz and Fluvalinate on Reproduction and Productivity of Honey Bee *Apis Mellifera*

Rustem A. ILYASOV, Sooho LIM, Myeong Lyeol LEE, Hyung Wook KWON, Alexey G. NIKOLENKO

Rustem A. ILYASOV^{1,2*}, Sooho LIM¹ Myeong Lyeol LEE¹, Hyung Wook KWON^{1*}, Alexey G. NIKOLENKO

Tunus'ta Toplanan *Thymbra capitata* L. ve *Mentha pulegium* L. Esansiyel Yağlarının *Galleria mellonella* L. Üzerine Etkisi

31

Efficacy Of Essential Oils of *Thymbra capitata* L. and *Mentha pulegium* L. Collected in Tunisia on Larvae of *Galleria mellonella* L.

Sarra NCIBI, Abir BEN AMOR, Faten BEN ABDELKADER

Tunceli Ballarının Coğrafi İşaret Çalışması
Aslı ÖZKÖK, Ömür GENÇAY ÇELEMLİ, Golshan ZARE, Çiğdem ÖZENİRLER, Nazlı MAYDA, Kadriye SORKUN

39

Geographical Indication Study of Tunceli Honeys

Aslı ÖZKÖK, Ömür GENÇAY ÇELEMLİ, Golshan ZARE, Çiğdem ÖZENİRLER, Nazlı MAYDA, Kadriye SORKUN

Kestane (*Castanea sativa*) Balı Örneklerinin Botanik Orijinlerinin Doğrulanması ve Toplam Polen Sayıları

54

Confirmation of botanical origin and total pollen numbers of chestnut (*Castanea sativa*) honey samples

Aslı ÖZKÖK, Nesrin ECEM BAYRAM

Aslı ÖZKÖK, Nesrin ECEM BAYRAM

Arıcılık Faaliyetleri Etkisi Altında Düzce Bal Arısı Popülasyonlarındaki Varyasyonların Morfometrik Yöntem ile Araştırılması

66

The Investigation of Variations in Düzce Honey Bee Populations Under The Influence of Beekeeping Activities by Using Morphometric Method

Songül BİR, Meral KEKEÇOĞLU

Songül BİR, Meral KEKEÇOĞLU

DERLEME MAKALELERİ

REVIEW ARTICLES

Sri Lanka Siddha Medicine'de Pediatrik Tedavilerde Balın Rolü

83

The Role of Honey in Pediatric Treatments in Sri Lankan Siddha Medicine

Pholtan Rajeev Sebastian RAJAMANO HARAN, Saravanan VIVEKANANDARAJAH SATHASIVAMPILLAI

Pholtan Rajeev Sebastian RAJAMANO HARAN, Saravanan VIVEKANANDARAJAH SATHASIVAMPILLAI

Arı sokmalarını etkileyen önemli şifalı bitkiler: Sistematik derleme çalışması

91

The Most Important Medicinal Plants Affecting Bee Stings: A Systematic Review Study

Aliasghar MANOUCHEHRI, Pegah SHAKIB, Fakher BIGLARYAN, Mohammadreza NAZER, Mohammad DARVISHI

Aliasghar MANOUCHEHRI, Pegah SHAKIB, Fakher BIGLARYAN, Mohammadreza NAZER, Mohammad DARVISHI

Bal Arılarında Probiyotik Bakterilerin Kullanımı

104

Use of Probiyotic Bacteriae in Honey Bees

Ayşe Ebru BORUM

Ayşe Ebru BORUM

Arı Polenini: Antioksidan Etkisi

119

Bee Pollen: its Antioxidant Activity

Hidayet TUTUN, Muhammet Mükerrrem KAYA, Melike Sultan USLUER, Hatice Ahu KAHRAMAN

Hidayet TUTUN, Muhammet Mükerrrem KAYA, Melike Sultan USLUER, Hatice Ahu KAHRAMAN

Bal Arısı Zehrinin Kompozisyonunu ve Üretim Miktarını Etkileyen Faktörler

132

Factors Affecting the Composition and Production Amount of Honey Bee Venom

Tuğçe ÇAPRAZLI, Meral KEKEÇOĞLU

Tuğçe ÇAPRAZLI, Meral KEKEÇOĞLU

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

A-GLUCOSIDASE AND α -AMYLASE INHIBITION OF SOME ETHANOLIC PROPOLIS SAMPLES

Bazı Etanolik Propolis Örneklerinin α -Glukosidaz ve α -Amilaz İnhibisyonu

Nimet BALTAŞ

Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Rize, TURKEY, ORCID No: 0000-0003-4748-0665, E-posta: nimet.baltas@erdogan.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 09.02.20201

Kabul Tarihi / Accepted:18.03.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.877301

ABSTRACT

Propolis is a natural product, and it is of a great interest due to the possible uses of non-synthetic supplements in improving metabolic disorders. To support this claim, the current study was designed and presented. In this study, six propolis extracts obtained from different location of Turkey were investigated to prove the beneficial therapeutic properties such as inhibition potent against some enzymes and levels of antioxidant. IC₅₀ results of α -glucosidase (0.208-0.426 mg/mL) and α -amylase (0.487-0.938 mg/mL) were found the variable range. Moreover, antioxidant results of them were given to support the inhibition degrees. According to the total phenolic (TPC) and antioxidant data, S4 was noted as the most efficient sample. Future studies are needed to investigate the biological effects of propolis, but the ultimate evaluating showed that it could be a significant source thanks to its nutritional and clinical potential.

Keywords: α -glucosidase, α -amylase, Enzyme inhibition, Antioxidant, Propolis

ÖZ

Metabolik bozuklukların iyileştirilmesinde sentetik olmayan takviyelerin olası kullanımı nedeniyle, doğal bir ürün olan propolis büyük ilgi görmektedir. Bu iddiayı desteklemek için mevcut çalışma planlandı ve ortaya kondu. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen altı propolis ekstratının tedavi amacıyla kullanılabilmesi adına faydalı özelliklerini ortaya koymak için bazı enzimlere karşı inhibisyon etkileri ve antioksidan seviyeleri araştırıldı. α -glukozidaz IC₅₀ sonuçları 0,208-0,426 mg/mL ve α -amilaz IC₅₀ sonuçları 0,487-0,938 mg / mL aralığında bulundu. Ayrıca, inhibisyon etki derecelerini desteklemek için antioksidan aktivite sonuçları da verildi. Toplam fenolik (TPC) ve antioksidan verilerine göre, S4 en verimli örnek olarak kaydedildi. Propolisin biyolojik etkilerini araştırmak için ileride yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır, ancak sonuç olarak, propolisin beslenme ve klinik potansiyeli olarak dikkate değer bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: α -glukozidaz; α -amilaz; Enzim inhibisyonu; Antioksidan; Propolis

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Propolis bal arıları tarafından ağaçlardan, ve bitkilerin tomurcuk, yaprak, gövde ve salgılarından toplanan maddelerin başlarında bulunan salgı bezlerinden salgıladıkları enzimlerle işleyerek ürettiği çeşitli miktarlarda esansiyel ve aromatik yağlar, balmumu ve reçine karışımı içeren doğal bir

arı ürünüdür. Kovanı enfeksiyonlardan koruma amaçlı arıların ürettiği propolisin rengi reçinenin kaynağına bağlı olarak açık sarıdan koyu kahverengiye kadar değişebilir. Propolisin çok çeşitli fenolik ve flavanoid maddeler içermesi sebebiyle eski yıllardan beri geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan birçok

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

bilimsel çalışmada propolisin antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antifungal, antitümör ve antiülser gibi birçok biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bilinen birçok hastalığın tedavisi hastalık ile ilişkili enzimlerin inhibisyonu yada tam olarak aktivitesinin durdurulmasıyla mümkün olmaktadır. Bu çalışmada, propolisin sahip olduğu farmakolojik özelliklerinden yola çıkarak Tip-2 diyabet ile yakından ilişkili olan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve antioksidan aktiviteleri *in-vitro* olarak incelendi.

Gereç-Yöntem: Ağustos 2019 yılında Türkiye' nin 6 farklı ilindeki (Ankara, Kars, Giresun, Erzurum, Düzce, Zonguldak) Arı Yetiştiricileri Birliği'nden propolis örnekleri temin edildi. Propolis örneklerinin %70'lik etanol içerisinde ekstraktları hazırlandı. Hazırlanan propolis örneklerinin *diabetes mellitus* ile yakından ilişkili olan, özellikle ağız ve midede nişastanın sindiriminden sorumlu α -amilaz enzimine ve bağırsaklarda disakkaritlerin sindirimini gerçekleştiren α -glukozidaz enzimine karşı inhibitor etkisi incelendi. Her iki enzim için IC_{50} değerleri (ortamda var olan enzim aktivitesini yarıya düşüren propolis konsantrasyonu) belirlendi. Pozitif kontrol (standart ilaç) olarak akarboz kullanıldı. Ayrıca, ekstraktların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak gallik asit eşdeğeri cinsinden belirlendi. Propolis örneklerinin serbest radikal temizleme aktiviteleri ABTS [2,2 -azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] ve DPPH (2,2 difenil1-pikrilhidrazil) yöntemleri kullanılarak belirlendi ve örneklerin bu radikaller varlığında SC_{50} (ortamda var olan radikal miktarının yarısını temizlemek için gerekli olan propolis miktarı) değerleri tayin edildi

Bulgular: Etanolik propolis ekstraktlarının α -glukozidaz ve α -amilaz enzimi varlığında IC_{50} değerleri sırasıyla 0,208-0,426 mg/mL ve 0,487-0,938 mg/mL aralığında bulundu. Propolis örneğinin IC_{50} değeri ne kadar düşük ise enzim inhibisyonunda daha etkili olduğu anlamına gelmektedir. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı 123,210 ile 258,815 mg GAE/g örnek aralığında bulundu. Örneklerin etkin derecede ABTS ve DPPH radikallerini temizlediği gözlemlendi. ABTS metodunda en aktif örnek olan S4'ün SC_{50} değeri 0,078±0,001 mg/mL olarak bulundu. DPPH radikal temizleme yönteminde ise örneklerin SC_{50} değerleri 0,412±0,005 ile 0,876±0,005 mg/mL aralığında hesaplandı.

Sonuç: Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen propolis örneklerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, α -amilazın ve α -glukozidazın enzimatik aktivitesini engellediği gözlemlendi. Önemi her geçen gün daha da iyi anlaşılakta olan ve ender bulunan geniş spektrumlu bir antibiyotik sınıfında adından söz ettiren propolisin, antidiyabetik doğal bir ürün olabileceği söylenebilir.

INTRODUCTION

Propolis is a resinous substance produced by honeybees (*Apis mellifera*) from various leaf buds and plant exudates, which is used to seal and repair unwanted open spaces in the hive. Also, it is superior to other bee products because of its crucial bioactivity content such as antioxidant, antimicrobial, anticarcinogenic, antimutagenic etc. (Baltas et al. 2016, Miguel et al. 2014).

Nowadays and from ancient times, people have used complementary therapies to protect and cope with different diseases. *Diabetes mellitus* (DM) is a metabolic disorder containing multiple etiologies can be characterized by chronic postprandial hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat, and protein metabolism. The results of this metabolic disorder defects general imbalance between blood sugar absorption, insulin secretion, and insulin action. Two types are described, Type 2 diabetes (TD2) is much more common than Type 1 (TD1). According to the World Health Organization (WHO) and the International Diabetes Federation estimating, the number of total diabetic patients will reach approximately 440 million in 2030 (Mekonnen Abebe and Alemu Balcha 2012, Telagari and Hullatti 2015).

When we examine the reason for the diseases given such as two types, generally it is seen because of the abnormal activity of the relevant enzyme activity in metabolic pathways. These activities should be kept at a reasonable and desirable level. Furthermore, if it is possible, there should be a need to search for new sources from natural compounds.

The previous studies on propolis have mainly focused on bioactivity. Besides the current bioactivity effects of ethanolic extract of some propolis samples; the manuscript at hand is prepared to show the capacity of inhibition degree of α -glucosidase and α -amylase.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Propolis samples were supplied from the experienced Beekeepers Association Union in different geographical zones (Ankara, Kars, Giresun, Erzurum, Düzce, Zonguldak) of Turkey. For extraction, 5 g of the powdered propolis was placed with 50 mL 70% ethanol in a glass flask and stirred on a shaker (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for 24 h. The suspension was centrifuged at 10.000 g for 15 min, and then supernatants were evaporated. The residue was resolved in minimal volumes of 70% ethanol.

In vitro α -Glucosidase inhibition study

α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibition assay was determined spectrophotometrically (Özil et al. 2018). The enzyme solution 20 U/mL was prepared in phosphate buffer (pH 6.8, 50 mM). In test tubes, 200 μ L of test sample, 5 μ L of the enzyme (20 U/mL) and 1245 μ L of buffer were added and incubated for 15 min at 37°C. After incubation period, 250 μ L of *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (2 mM) was added and change in absorbance was monitored for 20 min at 400 nm in the UV/VIS spectrophotometer (1601UV-Shimadzu, Australia). Acarbose was used as a standard inhibitor. The IC₅₀ value was determined as the concentration of compound that give 50% inhibition of maximal activity.

In vitro α -amylase inhibition study

The inhibition of α -amylase activity was performed according to a previously described method (Unnikrishnan et al. 2015). Briefly, 250 μ L of ethanolic propolis extracts with varying concentrations (20–0.625 mg/mL) and 250 μ L of 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing alpha-amylase (porcine pancreatic alpha-amylase) solution (0.5 mg/mL) were incubated for 10 min at 25°C. After pre-incubation, 250 μ L of 1% starch solution in 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.9 with 0.006 M sodium chloride) was added to each tube at 5s intervals. The reaction mixtures were then incubated at 25°C for 10 min. The reaction was stopped with 500 μ L dinitrosalicylic acid color reagent. The tubes were then incubated in a boiling water bath for 5 min and cooled to room temperature. The reaction mixture was then diluted by adding 2 mL of distilled water, and absorbance

was measured at 540 nm in the UV/VIS spectrophotometer (1601UV-Shimadzu, Australia).

Total phenolic contents (TPC)

Total phenolic contents of the ethanolic extracts of propolis samples were determined following the Folin–Ciocalteu method using gallic acid as standard (Singleton and Rossi 1965). TPC was shown as mg of gallic acid equivalents per g samples (mg GAE/ g sample).

ABTS assay

The ABTS radical scavenging activity of the propolis extracts was measured using the actual method in the literature (Re et al., 1999). ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] was dissolved in water to a 7 mM concentration. To perform the radical cation (ABTS^{•+}), this stock solution reacted with 2.45 mM potassium persulfate and incubated in the dark for 16–18 h at room temperature. Before using this chemical, the ABTS solution was diluted to get an absorbance of 0.700 \pm 0.020 at 734 nm with phosphate-buffered at pH 7.4. Briefly, 1.8 mL of adjusting solution was mixed 0.2 mL of the sample extract at different concentrations. Test samples were allowed to react with stable free radicals, in the dark, at room temperature for 5 min. After the incubation period, the decrease in optical density (OD) at 734 nm was measured, using a UV–Visible spectrophotometer (1601UV-Shimadzu, Australia).

DPPH-free radical scavenging assay

For DPPH assay, the procedure followed the method of Brand-Williams et al. (1995) with minor modifications. Different concentration ranges of propolis extracts were used for calculation of 50% scavenging of DPPH radical (SC₅₀ – mg of sample per mL). Furthermore, the equal milliliter of propolis extracts and fresh DPPH solution was mixed, and its optical density (OD) was taken at 517 nm after 50 min using a spectrophotometer (1601UV-Shimadzu, Australia). The scavenging activity was calculated by the showing equation in DPPH assay.

RESULTS

In the current study at hand, the results of α -Glucosidase and α -Amylase inhibitory activities of the tested samples were shown as IC₅₀ (mg/mL). The IC₅₀ values of these enzyme activities of analyzed propolis show the efficient different concentration ranges as 0.208-0.426 mg/mL and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

0.542-0.938 mg/mL, respectively (**Table 1**). Although it was even worse than the α -glucosidase inhibition value of acarbose (8.504 \pm 0.086 μ g/mL) known as a standard drug, S4 sample showed a significant α -glucosidase inhibition activity as shown in **Table 1**. Furthermore, nearly the same situation with α -glucosidase was seen in α -Amylase results,

even though S2 was the best. This α -Amylase inhibition results could be seen as exciting for delaying the degradation of polysaccharides because its inhibition would decrease the absorption of glucose thus the postprandial blood sugar level would be reduced (Ramnath and Venkataramgowda 2017).

Table 1. IC₅₀ values of the ethanolic propolis extracts for the analyzed enzymes*

Tablo 1. Analiz edilen enzimler için etanolik propolis ekstraktlarının IC₅₀ değerleri *

Samples	Inhibition of α -glucosidase IC ₅₀ (mg/mL)	Inhibition of α -amylase IC ₅₀ (mg/mL)
S1	0.334 \pm 0.002	0.542 \pm 0.008
S2	0.214 \pm 0.005	0.487\pm0.006
S3	0.292 \pm 0.001	0.696 \pm 0.010
S4	0.208\pm0.009	0.635 \pm 0.008
S5	0.328 \pm 0.002	0.754 \pm 0.010
S6	0.426 \pm 0.002	0.938 \pm 0.007
Min-Max. (Min.-Mak.)	0.208-0.426	0.487-0.938
Acarbose	8.504 \pm 0.086	8.504 \pm 0.086

*The assays were done in triplicate. Means \pm standard deviations. IC₅₀ value of acarbose was given in terms of μ g/mL.

According to the obtained antioxidant activity results, the total phenolic content of studied propolis samples ranged from 123.210 to 258.815 mg GAE/g sample. Socha et al. (2015) evaluated the antioxidant activity of ethanol extracts of propolis from different regions of Poland. They reported slight differences in their total phenolic content ranged from 150.05 to 197.14 mg GAE/g.

The ABTS and DPPH are the synthetic compounds that involve a proton free radical with a characteristic absorption that decreases significantly upon exposure to radical scavengers (Lee et al. 2015). Although their application, which is based on the reduction of free radicals by an antioxidant resembles each other for the determination of

antioxidant capacity, each of them has different advantages. While the ABTS assay is more sensitive to identifying the antioxidant activity since it has faster reaction kinetics and a heightened response to antioxidants, DPPH may be applied in polar and nonpolar organic solvents, thus hydrophilic and lipophilic antioxidants can be examined (Kedare and Singh 2011, Lee et al. 2015). After shed light on this reality, **Table 2** was summarized as 0.078-0.524 mg/mL and 0.412-0.876 mg/mL for the ethanolic propolis extraction results of the half maximal scavenging concentration (SC₅₀), respectively, in the ABTS and DPPH methods. The SC₅₀ value of S4 propolis was nearly twice lower than that of the nearest values of the other propolis ethanol extracts.

Table 2. Antioxidant properties of the ethanolic propolis extracts*

Tablo 2. Etanolik propolis ekstraktlarının antioksidan özellikleri *

Samples	Total Phenolic Contents (mg GAE/g)	ABTS Method SC ₅₀ (mg/mL)	DPPH Method SC ₅₀ (mg/mL)
S1	156.548 \pm 2.392	0.288 \pm 0.001	0.512 \pm 0.004
S2	184.278 \pm 1.086	0.347 \pm 0.004	0.689 \pm 0.002
S3	147.763 \pm 1.540	0.315 \pm 0.002	0.582 \pm 0.003
S4	258.815\pm6.122	0.078\pm0.001	0.412\pm0.005
S5	146.214 \pm 4.016	0.314 \pm 0.002	0.589 \pm 0.006
S6	123.210 \pm 0.895	0.524 \pm 0.001	0.876 \pm 0.005

* The assays were done in triplicate. Means \pm standard deviations.

DISCUSSION

Nowadays, sometimes, the drugs could badly be mentioned due to some reasons such as biological side effects or drug resistance. Especially, drug resistance can be seen in the order: unconscious drug consumption or inadequate resistance against to form-changing diseases. But natural compounds could come to the help of these belligerent effects as drug potentials. For example, the drug potentials of propolis extracts for Type 2 diabetes disease could be controlled with their inhibition effects against α -glucosidase and α -amylase enzymes (Mekonnen Abebe & Alemu Balcha, 2012; Telagari & Hullatti, 2015).

The enzyme inhibition results were in agreement with the study on α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of previous propolis studies. Three of them mentioned that different types of propolis extracts acted as a significant enzyme inhibitor agent (Ramnath and Venkataramgowda 2017, Salah et al. 2017, Vongsak et al. 2015,).

Propolis variably contains some constituents such as flavonoids, coumarins, simple phenols (e.g., thymol and eugenol), and their derivatives (Izuta et al. 2009, Popova et al. 2015). This variation in propolis content is due to direct and/or indirect different conditions such as the collection region, climate, floral origin, processing techniques, storage conditions, seasonal variations, and collection methods (Souza et al. 2016, Popova et al. 2015, Vongsak et al. 2015). It has been demonstrated that the efficiency of the studied enzyme inhibitions related to the amount of polyphenolic constituent which was extracted from the source material.

So that, this prevailing idea could be elaborated, enzyme inhibition effects of phenolic compounds were supported by previous studies. *Gynura medica* leaf was studied for the purpose of isolation and characterization of phenolic compounds which were thought to be an α -glucosidase inhibitory agent. Kaempferol, quercetin, kaempferol-3-O- β -d-glucopyranoside, kaempferol-3-O-rutinoside, rutin, chlorogenic acid, and 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester were isolated from the leaf of *G. medica*. All the compounds were showed the α -glucosidase inhibitory activity (Tan et al., 2013). Rasouli et al. (2017) evaluated the α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of 26 polyphenols using molecular docking and virtual screening studies. They speculated that caffeic acid, curcumin, cyanidin, daidzein, epicatechin, eridictiol, ferulic

acid, hesperetin, naringenin, pinoselinol, quercetin, resveratrol, and syringic acid were the potent α -glucosidase inhibitors, while catechin, hesperetin, kaempferol, silibinin and pelargonidin were dominant for α -amylase inhibition (Rasouli et al. 2017).

After giving a general opinion about phenolics, the next section where was reported the findings of our study based upon the actual methodologies it was detailed to gather information, was about the antioxidant characterization of ethanolic propolis samples.

Antioxidant activity results could be correlated when the previous researches are considered (Izuta et al. 2009, Ramnath and Venkataramgowda 2016, Popova et al. 2015). Ramnath and Venkataramgowda (2016) employed to assess the ABTS and DPPH radical scavenging potential of ethanol extract of propolis collected from 10 different locations of India successfully and they presented the ABTS and DPPH data in the range of 0.298-0.860 mg/mL and 0.333-0.600 mg/mL, respectively.

CONCLUSION

Complementary medicine, the study of natural products, is one of the major fields of therapeutic approaches, together with phototherapy, aromatherapy, apitherapy, and has been around for an exceptionally long time. We wanted to touch upon the reality of apitherapy because it is known as a virgin scientific area of these therapeutic approaches. Moreover, Turkey has one of the richest sources of apitherapy products in the world.

The current propolis samples demonstrated the ability of antioxidant activity, which were correlated with the assessment of some enzyme inhibition degrees like α -glucosidase, and α -amylase. Obtained results emphasize that this natural compound has massive potential in nutrition and complementary medicine. Further investigations are needed to increase the scientific value of the current results. Namely, potentially phytoactive compounds from propolis can be purified to chemical homogeneity. Then, these potential natural substances can be compared with well-known standard drugs. But the most important way to verify the current reports of *in vitro* inhibitory activities is preclinical studies, particularly using animal models.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Conflict of Interest

The author declares no possible conflicts of interest.

Source of Funding: No financial aid has been received.

Ethical issue: Not Applicable.

REFERENCES

- Baltas, N., Yildiz, O., Kolayli, S. (2016). Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), 52–55. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1167049>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Izuta, H., Narahara, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Kondo, S., Hara, H. (2009). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Bee Products and Their Constituents Determined by ESR. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(12), 1947–1951. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1947>.
- Kedare, SB., Singh, RP. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- Lee, KJ., Oh, YC., Cho, WK., Ma, JY. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 165457. <https://doi.org/10.1155/2015/165457>.
- Mekonnen Abebe, S., Alemu Balcha, S. (2012). The Effect of Supervised Progressive Resistance Training (PRT) on Glycemic Control and Cardio Vascular Disease (CVD) Risk Markers in Type 2 Diabetes Patients, North West Ethiopian. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 3(172), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000172>.
- Miguel, MG., Nunes, S., Dandlen, SA., Cavaco, AM., Antunes, M. D. (2014). Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*, 34(1), 16–23.
- Özil, M., Parlak, C., Baltaş, N. (2018). A simple and efficient synthesis of benzimidazoles containing piperazine or morpholine skeleton at C-6 position as glucosidase inhibitors with antioxidant activity. *Bioorganic Chemistry*, 76, 468–477. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2017.12.019>.
- Popovaa, M., Lyoussib, B., Aazzac, S., Antunesc, D., Bankovaa, V., Miguel G. (2015). Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Properties and Chemical Profiles of Moroccan Propolis. *Natural Product Communications*, 10 (11), 1961–1964. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001139>.
- Ramnath, S., Venkataramgowda, S. (2016). Antioxidant Activity of Indian Propolis-An In Vitro Evaluation. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 5, 79–85. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/IJ PPE.5.79>.
- Ramnath, S., & Venkataramgowda, S. (2017). Anti-Inflammatory And Anti-Diabetic Activity of Indian Propolis. *European Journal of Pharmaceutical And Medical Research*, 4(1), 311–316.
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, SM. B., Adibi, H., Khodarahmi, R. (2017). Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & Function*, 8(5), 1942–1954. <https://doi.org/10.1039/C7FO00220C>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Salah, NM., A Souleman, AM., Shaker, KH., El Hawary, S., El-Shahid, ZA., Abd El-Hady, FK. (2017). Acetylcholinesterase, Alpha-Glucosidase and Tyrosinase Inhibitors from Egyptian Propolis. *Available Online on Wwww.ljppr.Com International Journal of*

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(4), 528–536.
<https://doi.org/10.25258/phyto.v9i2.8126>.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., Juszczak, L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, 29(5), 416–422.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.949705>.
- Souza, E.A., Zaluski, R., Veiga, N., Orsi, R.O. (2016). Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2), 396–401.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.16714>.
- Tan, C., Wang, Q., Luo, C., Chen, S., Li, Q., Li, P. (2013). Yeast α -glucosidase inhibitory phenolic compounds isolated from *Gynura medica* leaf. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2551–2558.
<https://doi.org/10.3390/ijms14022551>.
- Telagari, M., Hullatti, K. (2015). In-vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(4), 425–429.
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.161270>
- Unnikrishnan, P.S., Suthindhiran, K., Jayasri, M. A. (2015). Alpha-amylase Inhibition and Antioxidant Activity of Marine Green Algae and its Possible Role in Diabetes Management. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl 4), 511-515.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.172954>
- Vongsak, B., Kongkiatpaiboon, S., Jaisamut, S., Machana, S., Pattarapanich, C., Vongsak, B., Pattarapanich, C. (2015). In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(5), 445–450.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.004>.

Citation/Atf: Kartal S, Tunca Rİ, Özgül O, Karabağ K, Koç H. 2021. Microscopic and molecular detection of *Nosema sp.* in the Southwest Aegean region (Güneybatı Ege Bölgesinde *Nosema* Türlerinin Mikroskopik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi). U. Arı D./U. Bee J. 21: 8-20, DOI: 10.31467/uluaricilik.880380

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPIC AND MOLECULAR DETECTION OF NOSEMA SP. IN THE SOUTHWEST AEGEAN REGION

Güneybatı Ege Bölgesi'nde *Nosema* Türlerinin Mikroskopik ve Moleküler Olarak Belirlenmesi

Serengül KARTAL¹, Rahşan İVGİN TUNCA², Okan ÖZGÜL², Kemal KARABAĞ³, Hasan KOÇ⁴

¹Muğla Sıtkı Koçman University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, 48000, Kötekli, Muğla, TURKEY, ORCID No.: 0000-0003-1751-8976, E-posta: kartalserengul@gmail.com.

²Muğla Sıtkı Koçman University, Ula Ali Koçman Vocational School, 48640, Ula, Muğla, TURKEY, ORCID No.: 0000-0003-0745-6732, Yazışma Yazarı/Corresponding author: E-posta: rivgin@gmail.com

³Akdeniz University, Agriculture Faculty, Dept. of Animal Biotechnology, 07058, Antalya, TURKEY, ORCID No.: 0000-0002-4516-6480, E-posta: karabag@akdeniz.edu.tr.

⁴Muğla Sıtkı Koçman University, Department of Biology, 48000, Kötekli, Muğla, TURKEY, ORCID No.: 0000-0002-2560-4527, E-posta: khasan@mu.edu.tr.

Geliş Tarihi / Received: 15.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 24.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.880380

ABSTRACT

Beekeeping, performed in many parts of the world, has a very large place in the world trade market with bee products such as wax, bee venom, propolis and royal jelly, especially honey production. However, honey bee diseases are quite common and restricted the production of bee products. One of the most important of these diseases, *Nosema*, is caused by spores in intestinal epithelium cells of the honeybee. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* are the factors of this disease and also common in our country. These two species can be distinguished from each other by molecular diagnostic methods. In this study, materials collected from 152 apiaries located in 13 districts of Muğla province and 62 water sources close to these apiaries. The spores were counted using Thoma lame under light microscope. DNA isolation was carried out from spore positive samples. 218MITOC FOR-REV and 321APIS FOR-REV primers were used to figure out the *N. apis* and *N. ceranae* species. After DNA sequence analysis of the obtained amplifications, it was determined that all samples formed 3 haplotypes according to studied sequences for the first time. In Muğla region, the presence of only *N. ceranae* as a disease agent was determined and the prevalence of the disease was detected at a rate of 71.53±6.02%. Moreover, blast analysis showed that the *N. ceranae* sequence detected high similarity (94-100 %) with the previously reported in Lebanon, France, Morocco and Thailand samples.

Keywords: *N. apis*, *N. ceranae*, molecular detection, Haplotype, Muğla, Turkey

ÖZET

Dünya'nın pek çok yerinde hayvansal üretim faaliyeti olarak yapılan arıcılık, başta bal üretimi olmak üzere bal mumu, arı zehri, propolis, arı sütü gibi arı ürünleri ile de dünya ticaret pazarında oldukça geniş bir yere sahiptir. Ancak, arıcılıktan elde edilecek verimi kısıtlayan bal arısı hastalıkları oldukça yaygınlaşmış durumdadır. Bu hastalıkların en önemlilerinden biri olan *Nosema*, bal arısının bağırsak

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

epitelyum hücrelerinde sporların neden olduğu hastalıktır. Ülkemizde de yaygın bulunan bu hastalığın etmeni olarak *Nosema apis* ve *Nosema ceranae* gösterilmektedir. Bu iki tür birbirlerinden en iyi şekilde moleküler tanı yöntemleri ile ayırt edilebilmektedir. Bu çalışmada, Muğla ilinin 13 farklı lokasyonunda bulunan 152 arılıktan ve bu arılıklara yakın 62 su kaynağından alınan örneklerde *Nosema* sporları ışık mikroskobu altında Thoma lamı kullanılarak spor sayımı yapılmıştır. *Nosema* sporu gözlemlenen örneklerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *Nosema* tür taraması için 218MITOC FOR- REV ve 321APIS FOR-REV primerleri kullanılarak ilgili gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Yapılan network analizinde bu gen bölgelerine göre ilk kez 3 haplotipi belirlenmiştir. Muğla yöresinde *Nosema* hastalığı yaygınlığı %71,53±6,02 oranında tespit edilmiş ve hastalık etmeni olarak sadece *N. ceranae*'nin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, blast analizi, daha önce Lübnan, Fransa, Fas ve Tayland ülkelerinden bildirilen *N. ceranae* örnekleri ile yüksek benzerlik (%94-100) tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *N. apis*, *N. ceranae* moleküler tespit, Haplotip, Muğla, Türkiye

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Bal arıları ekonomik ve biyolojik yönden oldukça önemlidir. Bal arıları bal, propolis, arı sütü, polen, bal mumu, arı zehri gibi arı ürünleri sayesinde dünya pazarında önemli yer almaktadır. Arıcılık, Dünya'nın hemen hemen her yerinde yapılan tarımsal bir faaliyettir. Arıcılık faaliyetlerini engelleyen en önemli nedenlerden biri de arı zararlı ve hastalıklarıdır. Nosemosis, ergin balarılarında oldukça yaygın görülen *Nosema apis* (Zander, 1909) ve *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996) adlı mikrosporidiaların neden olduğu bir hastalıktır. Hastalık kolonilerde genel olarak koloni performansını etkiler ve populasyon sayısının düşmesine neden olarak koloninin yok olmasına sebebiyet vermektedir. Farklı türdeki *Nosema* sporlarının birbirlerinden ayırt etmede en etkili yolu moleküler tanı yöntemleridir. Bu çalışmada Muğla ili genelinden toplanan bal arısı örnekleri ve kovanlara yakın su kaynaklarından alınan su numunelerinde *Nosema* hastalığının mikroskobik ve moleküler teşhisi yapılarak Dünya genelinde ciddi koloni kayıplarına neden olan bu hastalığın Muğla yöresindeki varlığı ve yaygınlığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Bal arısı örnekleri, Muğla ilini temsilen 13 ilçeden belirlenen 152 arılıktan, her arılıktan tesadüfi olarak belirlenmiş ortalama 20 kovanın girişinden yaklaşık 100 adet olacak şekilde arı örneği toplanmıştır. Su örnekleri arı kovanlarına yakın 62 su kaynağından (Bunlardan 12 tanesi arılıkların içindeki arıcılar tarafından yerleştirilmiş olan suluklar, geri kalanları ise arılıklara yakın olan akarsular, su yolları ve çeşmelerdir) en az 50 ml olacak şekilde su numuneleri alınmıştır. Arazi çalışmaları ilkbahar

Nisan-Mayıs ve sonbahar Ekim-Kasım aylarında 2017 yılında tamamlandı. Laboratuvara getirilen arı örneklerinden Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) uygulama kılavuzun göre homojenatlar hazırlandı. Sporların tespiti, sayımı ve hesaplanması 400x büyütme mikroskop altında thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. 13 ilçeden ortalama en yüksek spor sayısına sahip 3 arılıktan alınan örneklerde ticari izolasyon kiti (PureLinkGenomic DNA Mini Kit) kullanılarak DNA izolasyonları yapıldı. 218MITOC For-Rev ve 321APIS For-Rev primerleri, ilgili gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Sekans analizine toplam 35 PCR sonucu gönderildi ancak 30 tanesinin sekans sonucu değerlendirilebilir bulundu. Değerlendirilen sonuçların MEGA 6.0 programında sekans dizileri, SplitsTree programı kullanılarak filogenetik ağaç görüntüsü ve Network programı kullanılarak haplotip belirlenmesi yapıldı. BLAST veri tabanı üzerinden sekans benzerlikleri analizi yapıldı.

Sonuç: Muğla yöresinde *Nosema* hastalığı yaygınlığı %71,53±6.02 oranında tespit edilmiş ve toplanan 62 su örneğinden sadece 5 tanesinde *Nosema* sporlarına rastlanmıştır. Hastalık etmeni olarak sadece *N. ceranae*'nin varlığı belirlenmiştir. PZR sonrasında DNA dizisine gönderilen 35 örneğin yalnızca 30'unun dizi sonucu değerlendirilebildi. BLAST analizi sonucunda örnekler Lübnan, Fransa, Fas ve Tayland örneklerinde belirlenen *N. ceranae* dizileri ile %94-100 benzerlik göstermiştir. Hit dizileri MEGA 6 programında hizalandı. Yapılan network analizinde bu gen bölgelerine göre 3 haplotipi belirlenmiştir. Filogenetik ağaca göre Ula ve out grup farklı dal üzerinde yer alırken, Muğla'dan alınan diğer örnekler Muğla'dan gelen diğer gruplar ise diğer ana dal üzerinde yer almaktadır.

INTRODUCTION

Honeybees (*Apis mellifera* L.) provide not only bee products such as honey, propolis, royal jelly, pollen, bee wax, bee venom to be placed in the market by ensuring the production of World trade (Özbek 2002) but also pollinating the wild flora and industrial crops (Van Engelsdorf and Meixner 2010). However, bee diseases and pests affect beekeeping activities and the quality of the products obtained from beekeeping. Bee diseases and pests spread all over the world in a short time because of the trading of the bees, bee products and beekeeping materials between countries (Öztürk 2001). Also, migratory beekeeping activities are an important factor in the rapid spread of honey bee diseases and pests within the country (Gülpinar 2005). Because of these reasons, honey bee diseases and pests are one of the most important factors that slowing the progress of beekeeping in our country and decrease the efficiency of production (Doğaroğlu 1999). Nosemosis is a disease caused by microsporidia called *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, which are quite common in adult honeybees. *N. apis* was first described by Zander (1909) and has a worldwide distribution (Matheson 1996). *N. ceranae* was reported in 1996 in the Asian honey bee, *Apis cerana* (Fries et al. 1996). Later, Higes et al. (2006) mentioned that *A. mellifera* in Europe was infected by *N. ceranae*.

Shortly after, the existence of *N. ceranae* has been confirmed in the America and Asia (Chauzat et al. 2007, Cox-Foster et al. 2007, Klee et al. 2007, Huang et al. 2007, Paxton et al. 2007, Chen et al. 2008, Sarlo et al. 2008, Williams et al. 2008). Scientists has also been suggested that *N. ceranae* may replace with *N. apis* at the same time period (Klee et al. 2007, Martin-Hernandez et al. 2007, Paxton et al. 2007, Higes et al. 2009, Yoshiyama and Kimura 2011). It has been reported by scientists in many countries that *N. ceranae* has spread all over the world. (Klee et al. 2007, Fries 2010, Higes et al. 2010, Ivgin Tunca et al. 2016, Mohammadian et al. 2019, Shumkova et al. 2020). It was reported that *N. apis* cause infection in the middle intestinal epithelium of adult bees (Fries et al. 2006, Huang et al. 2007), while *N. ceranae* infects other tissues and impairs intestinal tissue integrity (Chen et al. 2009, Gisder et al. 2010, Dussaubat et al. 2012).

Nosema spores depend on their hosts to meet the ATP requirement and use transporters to draw energy from the host cell (Paldi et al. 2010). It has

been shown that the routine regeneration in the intestines is not possible because of the suppression of the genes that sustain homeostasis in colonies infected with *N. ceranae* and early death occurs (Dussaubat et al. 2012). Latest, Higes et al. (2020) examined tissue tropism of *N. apis* and *N. ceranae* in worker honey bees as well. It has been shown that the expression of the gene encoding vitellogenin (Vg), a glycolipoprotein produced and stored in the honey bees' fat body, is significantly reduced in bees infected with *N. ceranae* (Antunez et al. 2009, Goblirsch et al. 2013, Garrido et al. 2016, Badaoui et al. 2017). Recent studies have shown that *N. ceranae* C-type noseamosis has been reported to be the most common bee pathogen and has a major impact on global colony losses (Higes et al. 2007, 2010, 2013, Paxton et al. 2007, Cox-Foster et al. 2007, Fries 2010).

The first detection of Nosema disease in Turkey were reported in 1952 (Uygur and Girişgin 2008) and the presence and effects of Nosema disease were first identified by Kutlu (1988) in the Eastern Mediterranean (Adana) and the southwestern Aegean (Muğla). In the following years, molecular studies were carried out the existence of *N. apis* and *N. ceranae* by 3 different researchers in the same year. (Utuk et al. 2010, Muz et al. 2010, Whitaker et al. 2010). Later studies, *N. ceranae* has shown to be more common in our country (Ivgin Tunca et al. 2016, Sarıbyık and Özkırım 2018).

In 2020, Tokarev et al (2020) informed that “the family Nosematidae is redefined and includes the genera Nosema and Vairimorpha comprising a monophyletic lineage of Microsporidia” However, Grupe and Quandt, (2020) also informed this new classification but they used as Nosema in their article in order to evaluate their study with previous literatures. In the current study, it is mentioned as Nosema in order to make a healthy comparison with the existing literatures.

The aim of this study is to determine the presence of Nosema in Muğla province in South West Anatolia. According to Beekeeping Registration System (ACS), there are 80.675 registered beekeepers and bee hives 8.12836 million in 2019 in Turkey. The registered local bee colonies in Muğla are around 1.2 million. During the pine honey production season, the number of bee hives reaches 3-3.5 million colonies with migratory beekeepers from other provinces. 90% of Turkey's pine honey is produced in Muğla. Therefore, Muğla is a very crowded and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

important area for beekeeping activities. Microscopic and molecular diagnosis of *Nosema* spores were done from worker bee samples collected in different apiaries in 13 districts of Muğla and water samples taken from water sources which were close to apiaries. Thus, the presence and condition of *Nosemosis* in Muğla, which is one of the important centers for the honey bee sector, was determined by this study.

MATERIAL AND METHODS

Honey bee samples were collected from 152 different apiaries located in 13 districts of Muğla province in the spring and autumn period separately from the local and migratory beekeeping. An average of twenty hives were determined randomly from each apiary. Average five bees were taken from each hive and a total of one hundred bee samples were put into alcoholic tubes from the entrance of these selected hives from in each apiary (Table 1). At least 50 ml of water samples were taken from the 62 water sources (12 of them stable water resources inside the apiaries, rest of them water channels, streams and fountains) used by the bees near the apiaries (Table 2). Field studies were completed in May, April (Spring period) and in October-November (Autumn period) in 2017. Homogenates from honey bee samples were prepared according to the World Organization for Animal Health (OIE) application manual (2008). Detection, counting and calculation of the spores were done with thoma lame under 400x magnified light microscope using OIE terrestrial manual (2008).

Kruskal-Wallis test (SPSS 24IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.) and ANOM analysis (MINITAB 18) were applied in order to determine the differences between sampling locations according to spor numbers.

DNA isolations were made in samples having highest number of spores taken from an average of 3 apiaries with from 13 districts. Commercial isolation kit (PureLinkGenomic DNA Mini Kit) was used for the isolation study. 218MITOC For-Rev and 321APIS For-Rev primers were used replicate the relevant gene regions.

Each PCR reaction mixture contained 10 ng DNA, 0.5 U Taq DNA polymerase, 10XPCR buffer, 2.5 M MgCl₂, 0.4 µM 218MITOC F/R, 0.5 µM 321APIS F/R primers and deionized water. Final concentration

volume was 20 µl. PCR conditions included initial denaturation at 95°C for 2 min and 35 cycles were performed in 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 59.3°C, and 1 minute at 72°C and finally 7 minutes at 72°C. PCR products were controlled in 2% agarose gel (Fries et al. 2013, Martín-Hernández et al. 2007). A total of 35 PCR products were sent to sequencing but 30 of them gave evaluating results. 30 sequence results were analyzed using MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013), phylogenetic tree image obtained in SplitsTree (Huson and Bryant, 2006), and Network (Bandelt et al. 1999), haplotype determination was made using the program and sequence similarity analysis was performed via BLAST database.

RESULTS

The different densities of the spores were found in almost all of the samples from different apiaries (Figure 1).

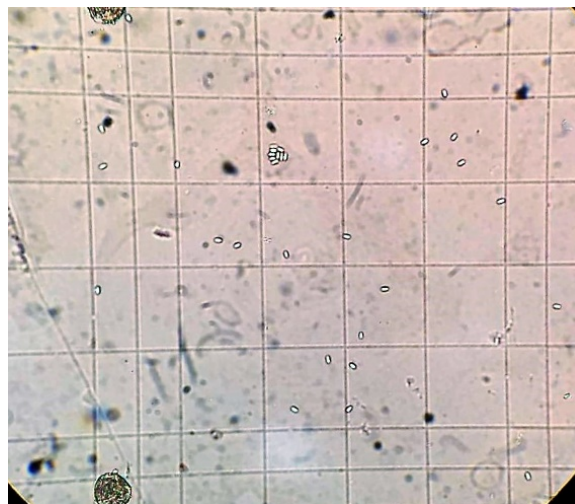


Figure 1. *Nosema* spores from bee samples at 400x microscope

In general, *Nosema* spores were found in all samples (100%) from Dalaman. This was followed by Yatağan with 92%, Milas with 90%, Ula with 84%, Ortaca with 83%, Marmaris with 80%, Köyceğiz with 75%, Bodrum with 70%, Menteşe with 69%, Fethiye with 54%, Seydikemer with 30% and Kavaklıdere with 29% (Table 1). As a result, *Nosema* spores caused *Nosema* disease by 71.53±6.02% were found throughout Muğla. The highest number of spores was observed from Yatağan samples and the lowest one was observed for samples from

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Seydikemer honeybee samples (Table 1). A total of 62 water samples were examined and an average of 5.16 ± 0.64 water samples were analyzed at each location. Nosema spores were not found in the water samples taken from Menteşe, Marmaris, Datça,

Bodrum, Seydikemer, Ortaca, Köyceğiz and Fethiye (Table 1). However, the spores were determined in one sample from Kavaklıdere, Dalaman and Yatağan, and in 2 samples taken from Milas and there were no water samples from Ula.

Table 1. The number of apiaries where bee samples were collected, Nosema positive apiary number, the rate of the positive apiaries, and Nosema spore numbers, the number of water samples, spore positive water samples, and ratio of positives.

Location	Number of sampled Apiaries	Number of spore positive apiaries	Ratio(%)	Spore numbers	Numbers of water samples	Positive water	Ratio(%)
Menteşe	13	9	69.23	2.1×10^6	3	0	0%
Marmaris	10	8	80.00	0.7×10^6	4	0	0%
Milas	10	9	90.00	0.8×10^6	7	2	28.57%
Datça	12	7	58.33	1×10^6	7	0	0%
Dalaman	13	13	100.00	2.2×10^6	5	1	20%
Bodrum	10	7	70.00	1×10^6	8	0	0%
Seydikemer	13	4	30.77	0.3×10^6	9	0	0%
Ortaca	6	5	83.33	1.9×10^6	6	0	0%
Köyceğiz	4	3	75.00	1.3×10^6	2	0	0%
Ula	19	16	84.21	1×10^6	No sample		
Fethiye	22	15	68.18	0.5×10^6	3	0	0%
Yatağan	13	12	92.31	9.3×10^6	5	1	20%
Kavaklıdere	7	2	28.57	2.6×10^6	3	1	33.33%

Normal distribution tests (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk) were applied to decide which tests can be performed before starting the statistical analysis of the data obtained from the spore numbers. When all data were evaluated together, it was determined that the data did not show normal distribution ($P < 0.05$; 0.01). The same results were found when normal distribution tests were performed for the measurements made on the basis of the districts where samples were collected. Since the data sets do not show normal distribution, the nonparametric alternative of ANOVA, Kruskal-Wallis Test (SPSS

24) was applied. According to the result of Kruskal-Wallis analysis, there are statistical differences between districts in terms of the number of spores ($P < 0.01$) (Figure 2).

One-Way ANOM test was performed using Minitab 18 program to determine which districts differ in terms of the number of spore (Figure 3). In the graph, the number of spores obtained from Yatağan location (red box) is higher than other districts and have created a statistically significant difference.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

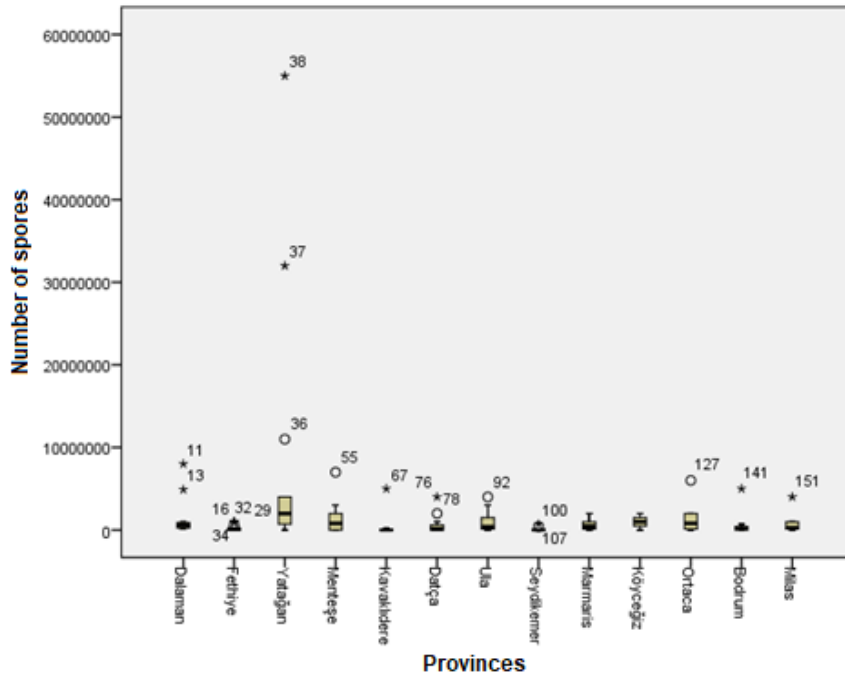


Figure 2: Box-plot for the distribution of spores' value in the samples collected areas. Circle and asterisk indicated samples having extreme number of spores. The numbers above the circles and asterisk are the sample order. The vertical axis shows the spore numbers and the names of locations where samples were collected on the horizontal axis are given.

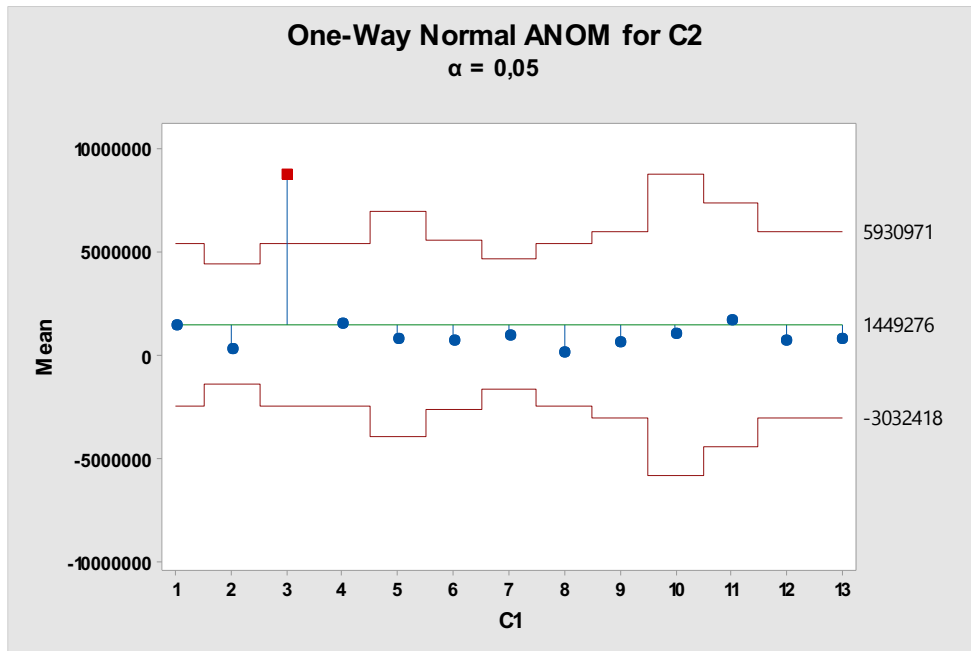


Figure 3: One-Way ANOM Test (1: Dalaman, 2: Fethiye, 3: Yatağan, 4: Menteşe, 5: Kavaklıdere, 6: Datça, 7: Ula, 8: Seydikemer, 9: Marmaris, 10: Köyceğiz, 11: Ortaca, 12: Bodrum, 13: Milas) Red lines indicate upper and lower boundaries. The blue dots indicate the locations that do not differ, and the red box indicates the location that differs from the general average in terms of the number of spores.

Molecular Analysis Results

Molecular analysis has shown that the observed spores belong to *N. ceranae* and *N. apis* spores were not found in this study. The sequence result of only 30 of the 35 samples, which sent to the DNA sequence, could be evaluated. As a result of the BLAST analysis, the samples showed 94-100% similarity with the *Nosema ceranae* sequences determined in Lebanon, France, Thailand and Morocco samples.

Hit sequence sequences were aligned on the MEGA 6 (Tamura et al. 2013) program. As a result of the Network (Bandelt et al. 1999) analysis, it was determined that all samples formed by 3 haplotypes according to studied sequences for the first time in Turkey. Haplotype analysis was performed to determine common genomic sequences shared by all individuals in the studied populations. The widest frequency was obtained in haplotype 1. The out

group was in haplotype 1 and the out group referans sequence was from NCBI gene data bank (GenBank: Accession LC510254.1). According to the data obtained from the sequence results, haplotype 1 was detected from 21 sequenced samples from 13 location in Muğla and one sequence data from out group. Haplotype 2 was detected only in 8 samples belonging to Datça, Yatağan, Ula, Ortaca, Milas and Menteşe locations. Haplotype 3 was detected in only one sample belonging to the Ula location (Figure 4). A phylogram constructed in SplitsTree (Huson and Bryant, 2006) was drawn to visualize the genetic similarities or differences identified in the populations studied (Figure 4). According to the phylogenetic tree, the Ula and out group (GenBank: Accession LC510254.1) were in different branch, the other groups from Muğla were located in other main branch.

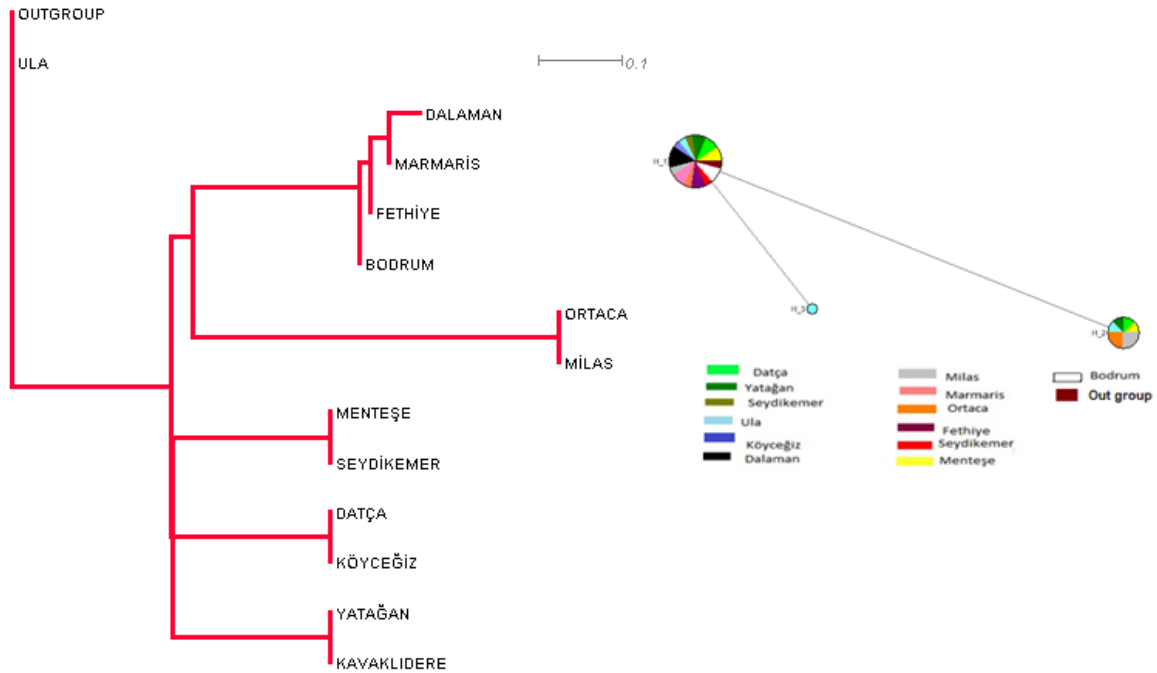


Figure 4: Dendrogram from sequenced data for *N. ceranae* and the haplotypes obtained as a result of Network analysis of genes belonging to *N. ceranae*

DISCUSSION

Molecular detection of the animal and human pathogens is known to be more sensitive than microscopic analysis (Fayer et al. 2003, Giersch et al. 2009, Kahler and Thurston-Enriquez 2007, Valencakova et al. 2011). The most reliable way to distinguish and diagnose the *N. ceranae* and *N. apis* is using molecular methods (Gatehouse and Malone 1998, Sagastume et al. 2010, Tay et al. 2005). Nosema disease is effective all over the world as well as in our country. From time-to-time Nosematosis cause significant colony losses. In our country, the first findings of Nosema disease were reported in 1952 and other studies on Nosema disease continued in later years (Uygur and Girişgin 2008, Büyük et al. 2014). The present study, Nosema spores detected from worker honeybees and water sources found in or near the apiaries. Statistical differences between Nosema spores were found to be significant among the sampled locations in Muğla. In the study, it is thought that number of Nosema spores increase in the hive due to heavy rainfall and humidity in the spring. Previous studies have also reported that the linear relationship between Nosema spore density and humidity is statistically significant (Büyük 2016, Tosun 2012, Gisder et al. 2010, Martín-Hernández et al. 2009). Traver and Fell (2012,) also mentioned that *N. ceranae* spores have been reported to occur at high levels in spring and low levels in fall and winter. In the study, a very small proportion of the collected water samples were contaminated by nosema spores according to the water analysis. Water samples were collected from apiaries (the bee samples were taken in the same apiaries) or near the apiaries. The few number of spores were found in the water samples due to the fact that the water sources were mostly them are flowing water (stream, water channel, fountain, etc.). But nematodes and protozoa species have been observed rather than the spores. In addition, the pollution was observed in the water containers placed in the apiaries in order to meet the water supply fro the bees. Because the water containers were not cleaned and changed frequently enough. At this point, it should be taken into account that bees benefiting from stable water resources may be exposed to other diseases due to dirty containers and water. In the current study, *N. apis* were not found both molecular and microscopic analyses in worker bees and water samples. *N. ceranea* spores were the only spores in both sample types.

The distribution and effects of Nosema disease in Adana and Muğla provinces was carried out by Kutlu (1988) and 15600 worker honey bee samples collected from 312 apiaries were studied as a result of microscopic analyses. Their results showed that the disease level was determined as 31.3% in Muğla, 29.8% in Adana, 29.6% in Dalaman, 28.6% in Aydın, 25.7% in Datça, 25.0% in Milas, 23.8% in Fethiye, 23.3% in Köyceğiz and 20.5% in Marmaris. In present study, the ratio of disease in all Mugla region is 71.53%. A 2.5-fold increase in the percentage of disease is observed from Kutlu's study in 1988 to 2017 in which our study was conducted. *N. ceranae* has a more severe effect than *N. apis*. The study was conducted in 1988 on the basis of *Nosema apis*, whereas today *N. ceranae* has an impact on the whole region. This situation shows that the effects of Nosema disease in Muğla region are more serious.

In other study for Muğla region, Nosema was effective in winter and spring periods, and also the disease was the most intense in the Thrace region and Muğla (Başar 1990). Another study investigated the density of *N. apis* on 7820 honeybees between in August 1988-June 1989, they found that Nosema infection pevalance was highest in April-November (Keskin et al. 1996). At different time periods, Nosema spores were determined by microscopic method in Muğla (Şimşek 2007, Şimşek et al. 2010). According to different studies, *N. ceranae* was found from the bee samples in Muğla (Whitaker et al.,2010; Utuk et al. 2016; Ivgin Tunca et al. 2016) Sarıbyık and Özkırım (2018) collected 51 samples from Muğla province in 2 periods including spring and August in Muğla province. In 102, they found *N. ceranae* in 20, *N. apis* in 13, and both spores in 69 samples.

Since molecular techniques were not so widespread in the past, Nosema disease was shown as *N. apis*. On the other hand, *N. ceranae* was thought to infect only *Apis ceranae* until twenty years ago. The later studies revealed that *N. ceranae* also infects western European honey bees. In a recent study in Thailand to understand the biology of *N. ceranae*, the genetic diversity in different hosts (*A. mellifera*, *A. ceranae*) was investigated using both PCR and genome-based methods, and that *N. ceranae* populations shared many SNPs with other global populations and it was observed to be clonal. However, on the contrary of previous studies, it has been determined that these populations carry many SNPs that are not found elsewhere, and these

populations have evolved in their current geographic location for some time (Peters et. al. 2019).

In current study, *Nosema* spores have not been detected in flowing water resources as a result of water analysis but it does not mean that there are no spores. This study shows that *N. ceranae* is widespread in Muğla province. At the same time, the molecular haplotype of *N. ceranae* gene regions from mediterranean samples were determined for the first time in Turkey. It will be possible to examine the determining role of haplotypes on the wintering ability and reproductive performance of bees with current data.

As a result, beekeeping contributes the economy of the countries directly and indirectly. Bee diseases play effective role in the quality of bee products and the sustainability of colonies. Therefore, periodic monitoring of bee diseases and investigation of their effects is important in terms of sustainable beekeeping activity.

Contribution of authors as; Serengül Kartal, Raşan İvgin Tunca, Hasan Koç, Okan Özgül for sample collection, Serengül Kartal, Raşan İvgin Tunca for lab. analysis, Serengül Kartal, Kemal Karabağ for statistical analysis, Serengül Kartal, Raşan İvgin Tunca, Kemal Karabağ, Hasan Koç, Okan Özgül for ms writing.

Conflict of interest: The authors declare that *here is no conflict of interest* regarding the publication of this article

Financial Aid: The study was supported by Muğla Sıtkı Koçman University Scientific Research Projects Coordinator with project number 17/010.

Acknowledgement

The authors declare that *there is no conflict of interest* regarding the publication of this article. In addition, we would like to thank Muğla Provincial Directorate of Agriculture, Muğla Bee Keeping Association who provided to supply of the samples, MSKU Scientific Research Projects Coordinator and Research Assistant Emel TÜTEN SEVİM for helps. This article was created from Serengül KARTAL's Master Thesis.

REFERENCES

- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., (2009). Immune Suppression in the Honey Bee (*Apis mellifera*) Following Infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia), Environ. Microbiol., doi:10.1111/j.1462- 2920.2009.01953x.
- Badaoui F., Amar A., Hassou L., Zoglat A., Okou CG. (2017). Dimensionality Reduction And Class Prediction Algorithm With Application To Microarray Big Data, Journal of Big Data, 4: 32. <https://doi.org/10.1186/s40537-017-0093-4>.
- Bandelt, HJ., Forster, P., Röhl, A., (1999). Median-Joining Networks For Inferring Intraspecific Phylogenies, Molecular Biology and Evolution, 16:37-48.
- Başar, E. (1990). Ülkemizdeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) *Acarapis woodi* ve *Nosema apis* Parazitlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Büyük, M., (2016). Kırşehir İlindeki Arılarda *Nosema* Hastalığının Belirlenmesi, Yüksek lisans Tezi Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı.
- Büyük, M., Tunca, Rİ., Taşkın, A. (2014). 'Türkiye'de *Nosema* spp. Varlığına Yönelik Yapılmış Çalışmalar', Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1(2), 234–238.
- Chauzat, MP., Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Cougoule, N., Faucon, JP. (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French Honey Bee Colonies, J. Apic. Res. 46, 127–128.
- Chen, Y., Evans, JD., Smith, IB., Pettis, JS. (2008). *Nosema ceranae* is a Long-Present And Wide-Spread Microsporidian Infection of the European Honey Bee (*Apis mellifera*) in the United States, J. Invertebr. Pathol. 97, 186–188.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen- Rindal D, Pettis JS (2009). Morphological, Molecular, And Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated From The European Honey Bee, *Apis mellifera*, J Eukaryot Microbiol 56:142–147.
- Cox-Foster, DL., Conlan, S., Holmes, EC., Palacios, G., Evans, JD., Moran, NA., Lipkin, WI.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder, *Science*, 318, 283–287.
- Doğaroğlu, M. (1999). Modern Arıcılık Teknikleri, Anadolu Matbaa ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Sti., İstanbul.
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botias, C., Moritz, R.F., Le Conte, Y., Alaux, C., (2012). Gut Pathology And Responses To The Microsporidium, *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*, *PLoS One*, 7(5): e37017.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., (2003). First Detection Of Microsporidia in Dairy Calves in North America, *Parasitol Res* 90:383–386.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European Honey Bees, *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 73-79.
- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R.J., Tanner, G., Webster, T.C., Williams, G.R. (2013). Standard Methods for *Nosema* research. *In: The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for Apis mellifera Pest and Pathogen Research*, Dietemann V, Ellis J.D. & Neumann P, eds. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1):<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J. (1996). *Nosema ceranae* (Microspora, Nosematidae), Morphological And Molecular Characterization Of A Microsporidian Parasite Of The Asian Honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae), *European Journal of Protistology* 32, 356-365.
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M. (2006). Natural Infections of *Nosema ceranae* in European Honeybees, *Journal of Apicultural Research* 45, 230-233.
- Garrido, P.M., Porrini, M.P., Antúnez, K., Branchiccela, B., Martínez-Noel, G.M.A., Zunino, P., Salerno, G., Eguaras, M.J., Leno, E., (2016). Sublethal Effects Of Acaricides and *Nosema ceranae* Infection On Immune Related Gene Expression in honeybees, *Garrido et al. Vet Res* 47:51DOI 10.1186/s13567-016-0335-z
- Gatehouse, H.S., Malone L.A., (1998). The Ribosomal RNA Gene Region of *Nosema apis* (Microspora): DNA Sequence for Small and Large Subunit rRNA Genes and Evidence of a Large Tandem Repeat Unit Size, *J Invertebr Pathol. Mar*;71(2):97-105.
- GenBank: ACCESSION No LC510254.1 AUTHORS Takashima, S., Ohari, Y. and Itagaki, T. TITLE The prevalence of newly found *Nosema* species and *Nosema ceranae* from honeybees, *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* in Tohoku region of Japan.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* Infects Honeybees (*Apis mellifera*) and Contaminates Honey in Australia, *Apidologie* 40, 117-123.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.C., Linde, A., Genersch, E. (2010). Five Year Cohort Study Of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Affect Virulence And Sertiveness Of *Nosema ceranae*?, *Applied and Environmental Microbiology* 76,3032–3038.
- Grupe, A.C. II., Quandt, C.A. (2020) A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLOS Pathogens* 16(6): e1008580. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008580>
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., (2013). Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>
- Gülpınar, V. (2005). Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları, *Teknik Arıcılık*. 87: 2-7.
- Higes M, Garcia-Palencia P, Martín-Hernández R, Aranzazu M. (2007). Experimental Infection of *Apis mellifera* Honey Bees with *Nosema ceranae* (Microsporidia), *J Invertebr Pathol*, 94(3): 211-217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., et al. (2009). Honeybee Colony Collapse due to *Nosema ceranae* in Professional Apiaries, *Environmental Microbiology Reports* 1,110–113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, A New Microsporidian Parasite in HoneyBees in Europe, *Journal of Invertebrate Pathology* 92, 93–95.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A. (2010), *Nosema ceranae* in Europe: An Emergent Type C nosemosis, *Apidologie* 41,375–392.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporida), a Controversial 21st Century Honeybee Pathogen, *Environmental Microbiology Reports* 5,17–29. doi:10.1111/1758-2229.12024.
- Mariano Higes, Pilar García-Palencia, Almudena Urbieto, Antonio Nanetti, Raquel Martín-Hernández (2020). *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) *Veterinary Pathology* 57(1) 132-138. <https://doi.org/10.1177/0300985819864302>
- Huang, WF., Jiang, JH., Chen, YW., Wang, CH. (2007). A *Nosema ceranae* Isolate from The Honeybees *Apis mellifera*, *Apidologie* 38, 30-37.
- Huson, DH., Bryant H., (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267.
- İvgin Tunca, R., Oskay, D., Gösterit, A., Tekin, K., (2016). Does *Nosema ceranae* Wipe Out *Nosema apis* in Turkey? (Short Communication), *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2):259-264.
- Kahler, AM., Thurston-Enriquez, JA., (2007). Human Pathogenic Microsporidia Detection in Agricultural Samples: Method Development And Assessment, *Parasitol Res* 100:529–538.
- Keskin, N., Basar, E., Saraçbaşı, T., (1996). Türkiye'nin Bazı Yörelerindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera* L.) *Nosema* Hastalığı, *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 25-35.
- Klee J, Besana A, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, et al. (2007). Wide Spread Dispersal Of The Microsporidium *Nosema ceranae*, An Emergent Pathogen Of The Western Honeybee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 96,1–10.
- Kutlu, MA. (1988). Ergin Balarısı (*Apis mellifera* L.) Hastalığı *Nosema apis*'in Dağılımı ve Enfeksiyon Oranı Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 45 s.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P., Marin, P., Botias, C., Garrido-Bailon, E., et al. (2009). Effect of Temperature on The Biotic Potential of Honeybee Microsporidia, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2554–2557.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martinez- Salvador, A., Garrido- Bailon, E., Higez, M. (2007). Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331-6338.
- Matheson, A. (1996). World Bee Health Update, *Bee World*, 77: 45–51.
- Mohammadian, B., Bokaie, S., Moharrami, M., Nabian, S., Forsi, M. (2019). Prevalence of Honeybee Colony Collapse Disorder and Its Relation To *Nosema* spp. and Climate In Apiaries Of Ira', *Journal of Veterinary Research*, 74(1):11-18 [10.22059/JVR.2017.235690.2649](https://doi.org/10.22059/JVR.2017.235690.2649)
- Muz, MN., Girisgin, AO., Muz, D., Aydin, L. (2010). Molecular Detection Of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* Infections in Turkish Apiaries With Collapsed Colonies, *Journal of Apicultural Research*, Vol. 49 (4), 342.
- Özbek, H., (2002). Arılar ve Doğa, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2 (3): 22-25.
- Öztürk, Aİ. (2001). Balarısı Hastalıkları, *Muğla'da Tarım*, 1(5): 57-59.
- Paldi N., Glick, E., Oliva, M., Zilberberg, Y., Aubin, L., Pettis, J., Chen, Y., Evans, JD., (2010). Effective Gene Silencing in a Microsporidian Parasite Associated with Honeybee (*Apis mellifera*) Colony Declines, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17): 5960–5964.
- Paxton, RJ. (2010). Does Infection by *Nosema ceranae* Cause “Colony Collapse Disorder” in Honeybees (*Apis mellifera*), *Journal of Apicultural Research* 49, 80-84.
- Paxton, RJ., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* Has Infected *Apis mellifera* in Europe Since At Least 1998 and May Be More Virulent Than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38,558-565.
- Peters, M.J, Suwannapong, G., Pelin, A., Corradi, N., (2019). Genetic and Genome Analyses Reveal Genetically Distinct Populations of the Bee Pathogen *Nosema ceranae* from Thailand. *Microbial Ecology* 77(4):877-889. doi: 10.1007/s00248-018-1268-z.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Sagastume, S., del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N., (2010). Polymorphism And Recombination For rDNA In The Putatively Asexual Microsporidian *Nosema ceranae*, A Pathogen Of Honey Bees, *Environmental Microbiology*, 13(1): 84-95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02311.x>.
- Sarıbıyık, C., Özkırım, A. (2018), The Transition Ratio of *Nosema* spp. Spores From Colonies to Honey Versus Honey to Colonies, *Journal of Agricultural Science*; Vol. 11, No. 1; 2019, 72-80.
- Sarlo, E., Medici, SK., Braunstein, M., Eguaras, M., (2008). Presencia Y Distribución De *Nosema ceranae* En La Región Sudeste De La Provincia De Buenos Aires, In: *Actas del Segundo Congreso Argentino de Apicultura, Mar del Plata, Argentina, Agosto 2008*, p. 26.
- Shumkova, R., Neov, BS., Georgieva, A., Teofanova, D., Radoslavov, G., Hristov, P. (2020). Resistance of Native Honey Bees from Rhodope Mountains and Lowland Regions of Bulgaria to *Nosema ceranae* and Viral Pathogens, *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 23, No 2, 206–217 DOI: 10.15547/bjvm.2201.
- Şimşek D., (2007). Muğla İli Balarılarının (*Apis mellifera* L.) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Şimşek, D., Keskin, N., Aktaş, S., (2009) Türkiye, Arıcılık Endüstrisinde Önemli Bir Yere Sahip Olan Muğla'da Nosemosis Üzerine Bir Araştırma, *Mellifera*, 9, 2-8.7.
- Tamura, K., Stechr, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionay Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729.
- Tay, WT., O'mahoney, EM., Paxton, RJ., (2005). Complete rRNA Gene Sequences Reveal That The Microsporidium *Nosema bombi* Infects Diverse Bumble Bee (*Bombus* spp.) Hosts and Contains Multiple Polymorphic Sites, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6): 505-513. <http://dx.doi.org/10.1111/j.550-7408.2005.00057.x>.
- Tokarev, Y.S., Huang, W. F., Solter, L.F., Malysh, J. M., Becnel, J. J., Vossbrinck, C. R., (2020) A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics, *Journal of Invertebrate Pathology* 169: 107279. doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279
- Tosun, O. (2012). Bal Arılarında (*Apis mellifera* L., 1758) Nosemosis (Nosematosis) Hastalığının Doğu Karadeniz Bölgesinde Bulunan Arı Kolonilerindeki Varlığı, Dağılımı ve Hastalık Etkenlerinin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 112 s.
- Traver, BE., Fell, RD. (2012). Prevalence and Infection Intensity of *Nosema* in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies In Virginia, *J. Invertebr. Pathol.*, 107, 43–49.
- Uygur, ŞÖ., Girişgin, AO. (2008). Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 8, 4,130-142.
- Ütük, A.E., Pişkin, F.Ç., Kurt, M. 2010. Türkiye'de *Nosema ceranae*'nin ilk moleküler tanısı. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 57: 275-278.
- Ütük, AE., Piskin, FÇ., Girişgin, AO., Özgür, S., Aydın, L., (2016). Microscopic and Molecular Detection of *Nosema* spp. In Honeybees of Turkey, *Apidologie* 47: 267-271.
- Van Engelsdorp, D., Meixner, MD., (2010). A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors that May Affect Them, *Journal of Invertebrate Pathology*, 580-595.
- Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M., Malcekova, B., Novotny, F., Goldova, M., (2011). Molecular Identification and Genotyping Of Microsporidia in Selected Hosts, *Parasitol Res.* [doi:10.1007/s00436-011-2543-9](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2543-9).
- Whitaker, J., Szalanski, AL., Kence, M. (2010). Molecular Detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish Honey Bees, *Apidologie* [doi:10.1051/apido/2010045](https://doi.org/10.1051/apido/2010045).
- Williams, GR., Shafer, ABA., Rogers, REL., Shutler, D., Stewart, DT. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite of European Honeybees (*Apis mellifera*), in

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Canada and Central USA., Journal of Invertebrate Pathology, 97,189–192.

Yoshiyama, M., Kimura, K. (2011). Distribution of *Nosema ceranae* in the European Honey Bee,

Apis mellifera in Japan, Journal of Invertebrate Pathology, 106, 263–267.

Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Munchener Bienenztg, 31, 196–204.

Citation/Atrf: Ilyasov RA, Lim, S, Lyeol ML, Lee, Kwon, HW, Nikolenko, AG, 2021. Effect of Miticides Amitraz And Fluvalinate On Reproduction and Productivity of Honey Bee *Apis Mellifera* (Akarisit Amitraz ve Fluvalinat'ın Bal Arısı *Apis mellifera*'nın Üreme ve Verimliliğine Etkisi). U. Arı D./U. Bee J. 21:21-30, DOI: 10.31467/uluaricilik.883775

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

EFFECT OF MITICIDES AMITRAZ AND FLUVALINATE ON REPRODUCTION AND PRODUCTIVITY OF HONEY BEE *APIS MELLIFERA*

Akarisit Amitraz ve Fluvalinat'ın Bal Arısı *Apis mellifera*'nın Üreme ve Verimliliğine Etkisi

Rustem A. ILYASOV^{1,2*}, Sooho LIM¹, Myeong Lyeol LEE¹, Hyung Wook KWON¹, Alexey G. NIKOLENKO^{2,1}

¹Department of Life Sciences and Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, 119 Academy-ro, Yeonsu-gu, Incheon 22012, REPUBLIC OF KOREA, ORCID No: 0000-0003-2445-4739, Corresponding Author: E-posta: apismell@hotmail.com, ORCID No: 0000-0002-6724-3715 E-posta: 93sooho@gmail.com, ORCID No: 0000-0000-0000-0000, E-posta: be9020@hanmail.net, ORCID No: 0000-0001-9340-7974, E-posta: hwkwon@inu.ac.kr,

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Prospekt Oktyabrya 71, 450054, RUSSIA, ORCID 0000-0002-9235-680X, E-posta: a-nikolenko@yandex.ru

Geliş Tarihi / Received: 23.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 30.03.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.883775

ABSTRACT

Varroa destructor is a well-known ectoparasite of the honey bee *Apis mellifera*. Amitraz and fluvalinate are highly effective miticides used against *V. destructor* infestation in colonies of honey bee *A. mellifera*. Though honey bees more resistant to miticides, there are side effects of these chemicals on the reproduction, olfaction, and honey production of honey bees. We showed a negative impact of miticides amitraz and fluvalinate on honey production and reproduction of honey bee colonies. Also, we assumed the reduction of olfaction of honey bees by fluvalinate due to changes of expression of olfactory related neuropeptide genes short neuropeptide F sNPF, tachykinin TK, short neuropeptide F receptor sNPFR. The external treatment of honey bee colonies by miticides amitraz and fluvalinate along with a positive effect of pest control harms reproductivity, honey productivity, and, probably, can reduce learning and memory, gustation and olfaction of honey bees. When used for a short time and with care, miticides can be less harmful to honey bees. Breeding varroa-resistant honey bees allow to reduce the use of miticides and produce organic honey. Therefore, the further development of beekeeping should be in the direction of selection for disease and *Varroa* resistance and adaptation to the environment.

Keywords: Amitraz, Fluvalinate, Honey Production, Reproduction, *A. mellifera*, *V. destructor*, Short Neuropeptide F sNPF, Tachykinin TK, Short neuropeptide F receptor sNPFR, RT-PCR, Gene expression.

ÖZ

Varroa, bal arısı *Apis mellifera*'nın iyi bilinen bir ektoparazitidir. Amitraz ve fluvalinat, bal arısı *A. mellifera* kolonilerinde *V. destructor* istilasına karşı kullanılan oldukça yüksek etkili akarisitlerdir. Bal arıları, akarisitlere karşı daha dirençli olsalar da, bu kimyasalların bal arılarının üreme, koku alma ve bal üretimi üzerinde yan etkileri vardır. Bu çalışma ile Akarisitler olan amitraz ve fluvalinatın bal üretimi ve bal arısı kolonilerinin üremesi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bal arılarının

Fluvalinat'a bağlı olarak koku alma duyusunun azalması durumunu ilgili nöropeptid genlerinin kısa nöropeptid F sNPF, taşikinin TK, kısa nöropeptid F reseptörü sNPFR ifadesindeki değişiklik olduğunu varsaydık. Bal arısı kolonilerinin akarisitler olan amitraz ve fluvalinate ile kontrol edilmesi, haşere kontrolünün olumlu etkisiyle birlikte üremeye, bal verimliliğine zarar verir ve muhtemelen bal arılarının öğrenmesini ve hafızasını, lezzetini ve kokusunu muhtemelen azaltabilir. Kısa bir süre ve özenle kullanıldığında, akarisit kullanımı bal arılarına daha az zarar verebilir. Varroaya dirençli bal arılarının yetiştirilmesi, akarisit kullanımını azaltmaya ve organik bal üretmeye izin verir. Bu nedenle, arıcılığın daha da geliştirilmesi için seçim; hastalıklara, Varroa'ya dirençli ve çevreye uyum yönünde olmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Amitraz, fluvalinat, bal üretimi, üreme, *A. mellifera*, *V. destructor*, kısa nöropeptid F sNPF, takikinin TK, kısa nöropeptid F reseptörü sNPFR, RT-PCR, gen ifadesi.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çalışmanın amacı: Bu makalede, amitraz ve fluvalinat gibi akarisitlerin bal arısı kolonileri üzerindeki etkisi yumurtlama, bal üretimi ve koku alma özelliklerinin gözlemlenerek tahmin edilecektir.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada 46 bal arısı *A. mellifera* kolonisi (Rusya'dan 40 koloni ve Kore'den altı koloni) deney grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak yirmi altı bal arısı *A. mellifera* kolonisi (Rusya'dan yirmi koloni ve Kore'den altı koloni) kullanıldı. İşçi arılar 2019 yılında kovanların girişinden toplanmıştır.

Rusya'dan 20 bal arısı *A. mellifera* kolonisi ve Kore'den 6 koloniye haricen ortalama 2 µg/arı fluvalinat dozu uygulanmıştır. Rusya'dan gelen diğer 20 bal arısı *A. mellifera* kolonisine harici olarak ortalama 20 µg/arı amitraz dozu uygulanmıştır. Kontrol deneylerinde, Rusya'dan 20 bal arısı *A. mellifera* kolonisi ve Kore'den 6 kolonide her hargi bir uygulama yapılmamıştır. Rusya'daki *A. mellifera* kolonilerinde haricen amitraz ve fluvalinate uygulamalarının ortalama yumurtlama ve bal üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kore bal arısı *A. mellifera* kolonileri, fluvalinat uygulamasının koku alma ile ilgili nöropeptid genleri kısa nöropeptid F sNPF, taşikinin TK, kısa nöropeptid F reseptörü sNPFR ekspresyonu üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Ortalama yumurtlama ve bal üretiminin değerlendirilmesi, Biyokimya ve Genetik Enstitüsü, Ufa Federal Araştırma Merkezi, Rusya Bilimler Akademisi'nde (Rusya) gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR, Incheon Ulusal Üniversitesinde (Kore) gerçekleştirildi. Her bal arısı kolonisinden on beş işçi arıdan izole edilmiş antenler alındı. Qiagen RNeasy Mini Kit üreticinin (Qiagen, Almanya) talimatlarına göre kullanılarak antenlerden toplam RNA'lar izole edilmiştir. cDNA, toplam 500 ng RNA'dan oligo-dT ve Superscript III enzimi (Invitrogen, Yeni Zelanda)

ile sentezlenmiş ve RT-PCR, Brilliant III Ultra-hızlı SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, ABD) kullanılarak AriaMx Real-Time PCR Sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR primerleri, (ribosomal protein 49 gene, TK, sNPF ve sNPFR) Macrogen firması tarafından sentezlenmiştir. RT-PCR: 95°C-1 dakika, 95°C-5 sn'lik 40 döngü, 55-60°C-10 sn, 72°C-10 sn koşullarında gerçekleştirilmiştir. Her bir RT-PCR, üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Genlerin ekspresyon seviyesi delta-delta Ct yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bal arısı kolonisinde, anaarının ortalama yumurtlama oranı, EP = E/D olarak bulunur; burada E- kolonideki ana arı tarafından yumurtlanan toplam yumurta sayısı, EP-kraliçelerin ortalama yumurtlama, D-yumurtlama günlerin sayısı göstermektedir. Kolonilerdeki ortalama üretkenlik HP = H/M olarak tahmin edildi, burada H-kolonide toplam bal üretimi, HP-ortalama bal üretimini, M-balın üretildiği ay sayısını gösterir. Varyans (ANOVA) analizi, standart sapma SS, standart hata SE, güven aralığı CI, Student t-testi ve olasılık P analizi JMP 13 (SAS, ABD) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Deneysel bal arısı *A. mellifera* kolonileri, kontrol grubu ile karşılaştırmasında ölümcül olmayan dozlarda akarisit amitraz ve fluvalinat ile muamele edildi. Kontrol grubunda yumurtlama ortalama 1650 adet, bal verimi ortalama 31.1 kg elde edilirken, Fluvalinat uygulaması yapılan bal arıları grubunda yumurtlama kontrole göre %9,7 oranında azalmıştır (t-testi=2,55, p≤0,05). Amitraz ile muamele edilen bal arısı grubunda yumurtlama, kontrole göre %7,9 oranında azalmıştır (t-testi = 2,20, p ≤ 0,05) (Şekil 1, Tablo 1).

Fluvalinat ile muamele edilen bal arısı grubunda bal üretimi kontrole göre %21,9 oranında azalmıştır (t-testi = 2,89, p ≤ 0,05). Amitraz ile muamele edilen

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

bal arısı grubunda, bal verimi kontrole göre %12.1 oranında azalmıştır (t-testi = 2.80, $p \leq 0.05$) (Şekil 1, Tablo 2).

Amitraz ve fluvalinat uygulaması yapılan bal arısı kolonilerindeki varyans ANOVA analizi, p değerlerine ve 0.05 anlamlılık seviyesine göre, bal arısı kolonilerinde fluvalinat ve amitrazın yumurtlama ve bal üretimi üzerindeki etkileşim etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (Tablo 3). Ayrıca, bal arısı kolonilerinde fluvalinat ve amitrazın yumurtlama ve bal üretimi üzerindeki etkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir, bu da her iki akarisit bal arısı kolonileri üzerinde neredeyse benzer olumsuz etkilere sahip olduğu anlamına gelmektedir.

Fluvalinata maruz kalan bal arılarında sNPF ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır (t-testi = 4.41, $p = 0.01$). Fluvalinata maruz kalan bal arılarında TK ekspresyonu önemli ölçüde değişmedi (t-testi = 0.80, $p = 0.46$). Fluvalinata maruz kalan bal arılarında sNPF ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır (t-test = 3.49, $p = 0.01$). Muhtemelen, sNPF'nin spesifik membran reseptörü sNPF ile etkileşim yoluyla hedef hücrelere etki etmesinden dolayı artan sNPF ekspresyonu. Bu nedenle, fluvalinat muamelesinden sonra sNPF ekspresyonundaki değişiklikler önemlidir (Şekil 2).

Tüm olasılıklar değerlendirildiğinde, mitisitlerin dezavantajlardan daha fazla avantaja sahip olduğu varsayılabilir. Ektoparazitik akarların bal arıları üzerindeki olumsuz etkisi, sayılarının artması nedeniyle her geçen gün artarken, mitisitlerin bal arıları üzerindeki olumsuz etkisi detoksifikasyon süreçleri nedeniyle azalma eğilimindedir. Bu nedenle arıcılıkta mitisitlerin kullanılması ekonomik olarak faydalıdır. Bal arılarına kıyasla, ektoparazitik akarlar, daha küçük boyutları ve daha az etkili detoksifikasyon sistemleri nedeniyle bu mitisitlere karşı daha hassastır. Bu nedenle bal arıları, ektoparazitik akarlar göre mitisitlerden daha az muzdariptir. Bununla birlikte, mitisitler arılar için güvenli değildir. Amitraz ve fluvalinat gibi akar öldürücülerin bal arılarına, *A. mellifera* benzer, olumsuz etkileri önceki çalışmalarda da gözlenmiştir.

Amitraz ve fluvalinat gibi akarisitlerin bal arıları üzerindeki olumsuz etkisi deneysel olarak bu çalışmada gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, Varroa akarlarının amitraz ve fluvalinat akarisitlerine karşı artan direnç söz konusudur. Bununla birlikte, sürekli seçimle Varroa akarlarına dirençli bal arısı popülasyonları elde etmenin mümkün olduğu

gösterilmiştir. Varroaya dirençli bal arılarının yetiştirilmesi, akarisit kullanımını azaltmaya ve organik bal üretilmesine izin verir. Bu nedenle, arıcılığın daha da geliştirilmesi, hastalık ve Varroa direnci seçimi ve çevreye uyum yönünde olmalıdır.

INTRODUCTION

The honey bee, *Apis mellifera*, is an essential pollinator that provides ecological services and economic values in agriculture (Klein et al. 2007, Southwick and Southwick 1992). Varroosis caused by *Varroa destructor* mite leads to losses of honey bee colonies and reduces their adaptation (Zhang 2000, Anderson and Trueman 2000).

To prevent damages from ectoparasitic mites, beekeepers commonly use the miticides amitraz and fluvalinate. Fluvalinate is a synthetic pyrethroid that act as a neurotoxin inducing sustained membrane depolarization. Fluvalinate is highly effective against mites and ticks (Wallace 2002, Gupta and Crissman 2013, Gosselin-Badaroudine and Chahine 2017). Amitraz is a synthetic amidine, a derivative of an oxoacid belonging to the group of triazopentadiene. It acts as a neurotoxin with a target of octopamine receptor. Fluvalinate and amitraz are highly effective against mites and are commonly used to control ectoparasitic mites in honey bee colonies (Gregorc et al. 2012, Gracia et al. 2017). In comparison with ectoparasitic mites, honey bees are more resistant to these miticides due to their bigger size and more effective system of detoxification, but despite this, there are various side effects of amitraz and fluvalinate on mortality, productivity, reproduction, and olfaction (Berry et al. 2013, Frost et al. 2013, Ilyasov et al. 2014, Rangel and Tarpy 2015, Dai et al. 2017, Lim et al. 2020). Olfaction is a basic regulation mechanism for honey bees, which important in different aspects of their social life organization (Nässel, 2002; Taghert and Veenstra, 2003; Hauser et al., 2006; Johnson, 2006; Marciniak et al., 2011) and nectar foraging behavior (Menzel 1999, Hewes and Taghert 2001, Johnson 2006, Hummon et al. 2006, Giurfa 2007, Altstein and Nässel 2010, Xu et al. 2016, Schoofs et al. 2017).

The neuropeptides short neuropeptide F sNPF, tachykinin TK, and short neuropeptide F receptor sNPF are peptidergic regulators in the olfactory systems of insects (Jung et al. 2013, Jiang et al. 2017). Thus, the reduction of olfaction in honey bees caused by miticide fluvalinate must be accompanied

by changes in gene expression of olfactory-related neuropeptide genes and their receptors.

In this paper, the effect of miticides amitraz and fluvalinate on honey bee colonies will be estimated by observation the ovipositioning, honey production, and olfaction.

MATERIALS AND METHODS

Honey bee sampling and experimental groups

Forty-six colonies of honey bee *A. mellifera* (forty colonies from the Republic of Bashkortostan, Russia Federation (54,46N 56,01E), and six colonies from Incheon, the Republic of Korea (37,22N 126,38E)) were used as an experimental group. Twenty-six colonies of honey bee *A. mellifera* (twenty colonies from the Republic of Bashkortostan, Russia Federation, and six colonies from Incheon, the Republic of Korea) were used as a control group. Worker bees were collected from the entrance of hives in 2019.

Twenty colonies of honey bee *A. mellifera* from Russia and six colonies from Korea were externally treated with an average dose of 2 µg/bee fluvalinate. Another twenty colonies of honey bee *A. mellifera* from Russia were externally treated with an average dose of 20 µg/bee amitraz. In control, twenty colonies of honey bee *A. mellifera* from Russia and six colonies from Korea remain untreated. Russian colonies of *A. mellifera* were evaluated for the effect of amitraz and fluvalinate external treatment on average oviposition and honey production. Korean colonies of *A. mellifera* were evaluated for the effect of fluvalinate external treatment on expression of olfactory related neuropeptide genes short neuropeptide F sNPF, tachykinin TK, short neuropeptide F receptor sNPFR. Evaluation of average oviposition and honey production was performed in Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences (Russia). The experiment with honey bees was carried out for three months (June, July, August) in 2019.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR was performed at Incheon National University (Korea). From each honey bee colony were isolated antennae from fifteen worker bees. Total RNAs were extracted from the antenna using a Qiagen RNeasy Mini Kit according to the instructions of the manufacturer (Qiagen, Germany).

The cDNA was synthesized with oligo-dT and Superscript III enzyme (Invitrogen, New Zealand) from 500 ng of total RNA. The RT-PCR was performed on the AriaMx Real-Time PCR System using Brilliant III Ultra-fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, USA).

The RT-PCR primers were synthesized in company Macrogen Inc. (Seoul, Korea): the ribosomal protein 49 gene (AF441189) RP49 primers RP49-F: 5'-GGGACAATATTTGATGCCCAAT-3' and RP49-R 5'-CTTGACATTATGTACCAAACTTTTCT-3', product size is 100 bp (housekeeping gene); the neuropeptide gene tachykinin (XM_026441578) TK primers TK-F 5'-GGCGGGGATTTACGGATCAA-3' and TK-R 5'-CCCTCGAAATTCATCGTG-3', product size is 166 bp; the neuropeptide gene short neuropeptide F (XM_003250107) sNPF primers sNPF-F 5'-ATAGATTACTCAGATGAAATACCAG-3' and sNPF-R 5'-GCACTCATTGGTTTTGATAGAATAG-3', product size is 218 bp; the short neuropeptide F receptor gene (XM_006561685) sNPFR primers sNPFR-F 5'-GCATTTTGTACATCTGCGTC-3' and sNPFR-R 5'-TCGTTGCTTCTTCTCTCTC-3', product size is 112 bp (Mao et al. 2011, Lim et al. 2020). The RT-PCR was performed in the following conditions: 95°C-1 min, 40 cycles of 95°C-5 s, 55-60°C-10 s, 72°C-10 s. Each RT-PCR was performed in three replicates. The expression level of genes was evaluated using the delta-delta Ct method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

The average oviposition of queen in each honey bee colony was estimated as $EP = E/D$, where H- total number of laid eggs by queens in the colony, OP- average oviposition of queens, D-number of oviposition days.

The average productivity in each honey bee colony was estimated as $HP = H / M$, where H-total produced honey in the colony, HP-average honey production of honey bee colonies, M-number of months when honey was produced.

The analysis of variance ANOVA, standard deviation SD, standard error SE, confidence interval CI, Student's t-test, and probability P ($P \leq 0.05$ means statistical significance at 95% reliability) was estimated using JMP 13 (SAS, USA).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

RESULTS

The experimental honey bee *A. mellifera* colonies were treated by sublethal doses of miticides amitraz and fluvalinate in comparing control. In the control group, oviposition was an average of 1650 pcs, honey productivity was average 31.1 kg. In the group

of honey bees, treated with fluvalinate, oviposition was decreased relative to the control by 9.7% (t-test = 2.55, $p \leq 0.05$). In the group of honey bees, treated with amitraz, oviposition was decreased relative to the control by 7.9% (t-test = 2.20, $p \leq 0.05$) (Figure 1, Table 1).

Table 1. Average oviposition OP of queen bees in honey bee colonies treated with amitraz and fluvalinate

Group	OP \pm SE, pcs.	CI, pcs.	SD	t-test
Fluvalinate	1490 \pm 11.5	1410 - 1510	51.3	2.55
Amitraz	1520 \pm 24.1	1380 - 1590	53.7	2.20
Control	1650 \pm 20.6	1440 - 1700	65.3	

OP-average oviposition of queen bees, SE-standard error, CI-confidence interval, SD-standard deviation, t-test – Student's t-test. Each group N = 20.

In the group of honey bees, treated with fluvalinate, honey production was decreased relative to the control on 21.9% (t-test = 2.89, $p \leq 0.05$). In the group of honey bees, treated with amitraz, honey

productivity was decreased relative to the control on 12.1% (t-test = 2.80, $p \leq 0.05$) (Figure 1, Table 2).

Table 2. Average honey production HP in honey bee colonies treated with amitraz and fluvalinate

Group	HP \pm SE, kg	CI, kg	SD	t-test
Fluvalinate	24.6 \pm 2.1	20.3 - 26.4	3.1	2.89
Amitraz	27.7 \pm 1.2	25.2 - 31.6	4.1	2.80
Control	31.1 \pm 2,1	26.6 - 34.7	1.7	

HP-average honey production of honey bee colonies, SE-standard error, CI-confidence interval, SD-standard deviation, t-test – Student's t-test. Each group N = 20.

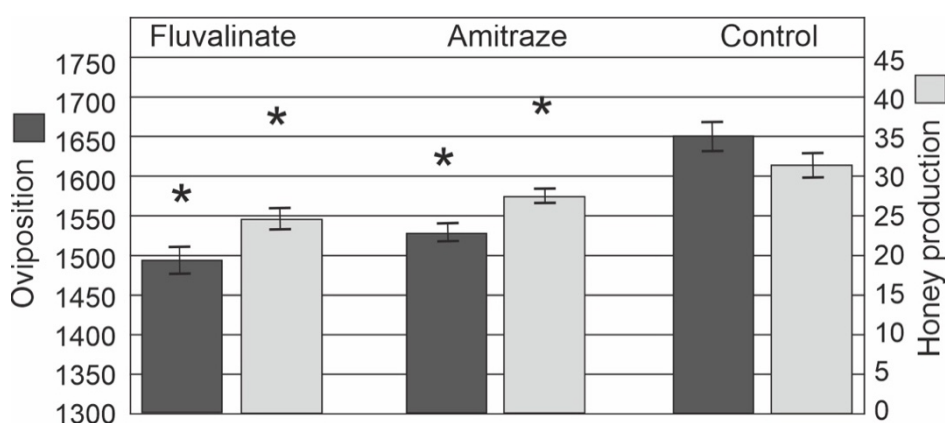


Figure 1. Average oviposition and honey production in honey bee colonies treated with amitraz and fluvalinate. * Statistically significant differences, $p \leq 0.05$. Each group N = 20.

The analysis of variance ANOVA in honey bee colonies treated with amitraz and fluvalinate based

on the p-values and a significance level of 0.05 showed that the interaction effect of fluvalinate and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

amitraz on oviposition and honey production in honey bee colonies are statistically significant (Table 3). Moreover, the differences between the effects of fluvalinate and amitraz on oviposition and honey

production in honey bee colonies are not statistically significant, which means that both miticides have almost similar negative effects on honey bee colonies.

Table 3. Analysis of variance ANOVA the effect of the miticides amitraz and fluvalinate on useful traits of honey bee colonies

Useful traits	Comparison	DF	SS	SE	F-value	P-value
Honey productivity	Fluvalinate / Control	2	11.208	0.221	3.655	0.049*
	Amitraz / Control	2	43.745	0.199	14.265	0.001*
	Fluvalinate / Amitraz	2	6.476	0.232	2.112	0.164
Oviposition	Fluvalinate / Control	2	119544.450	0.233	30.735	0.001*
	Amitraz / Control	2	2446.021	0.228	0.629	0.044*
	Fluvalinate / Amitraz	2	6043.601	0.005	1.554	0.230

DF - degrees of freedom, SS - a sum of squares, SE-standard error, F-value - Fisher's exact test value, P-value – a value of probability, * - statistically significant differences.

Effects of fluvalinate on the expression of olfactory-related neuropeptide genes sNPF, TK, sNPFR.

The expression of sNPF was significantly increased in fluvalinate exposed honey bees (t-test = 4.41, $p = 0.01$). The expression of TK was not significantly changed in fluvalinate exposed honey bees (t-test =

0.80, $p = 0.46$). The expression of sNPFR was significantly decreased in fluvalinate exposed honey bees (t-test = 3.49, $p = 0.01$). Probably, the increased expression of sNPF due to that sNPF acts on target cells, through interaction with specific membrane receptor sNPFR. Therefore, the changes of sNPFR expression after fluvalinate treatment are important (Figure 2).

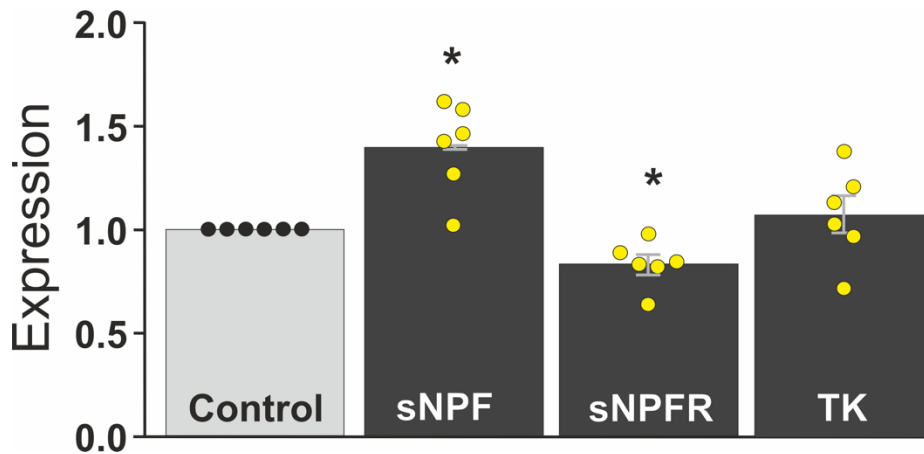


Figure 2. The patterns of sNPF, TK, and sNPFR neuropeptide genes expression. Relative expression levels of sNPF, TK, and sNPFR in antenna from control (light grey) and fluvalinate treated (dark grey) honey bees. Data points represent values from biological replicates. * Statistically significant differences, $p \leq 0.05$. Each group $N = 6$.

DISCUSSION

Evaluating all the options, it can be assumed that miticides have more advantages than

disadvantages. The negative impact of ectoparasitic mites on honey bees is increasing every day due to the increase in their numbers, while the negative

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

impact of the miticides on honey bees tends to decrease due to detoxification processes. Therefore, the use of miticides in beekeeping is economically beneficial. In comparison with honey bees, ectoparasitic mites are more sensitive to these miticides due to their smaller size and less effective system of detoxification. Therefore, honey bees suffer less from miticides than ectoparasitic mites. However, miticides are not safe for bees. The analogous, negative effects of miticides amitraz and fluvalinate on honey bees *A. mellifera* were observed in previous studies (Ilyasov et al. 2014, Lim et al. 2020).

After external treatment, the honey bee colonies with miticides amitraz and fluvalinate their economically useful treats such as honey production, olfaction, and oviposition can be reduced. The expression of TK was not statistically significantly changed by fluvalinate treatment of honey bees, whereas the expression of sNPF was significantly increased and the expression of sNPF_R was significantly decreased by fluvalinate treatment of honey bees. Fluvalinate did not affect the TK signaling pathway, but can significantly affect the sNPF signaling pathway, which can decrease learning and memory, gustation and olfaction of honey bees. Olfaction is a basic regulation tool for honey bees' social life organization (Nässel 2002, Taghert and Veenstra 2003, Hauser et al. 2006, Johnson 2006, Marciniak et al. 2011), foraging behavior, and honey production (Menzel 1999, Hewes and Taghert 2001, Johnson 2006, Hummon et al. 2006, Giurfa 2007, Altstein and Nässel 2010, Xu et al. 2016, Schoofs et al. 2017).

When used for a short time and with care, miticides can be less harmful to honey bees. We assumed, the short time treatment of honey bee colonies against *V. destructor* with miticides amitraz and fluvalinate can help honey bees to control pests in the colony and will have more benefits if the treatment will provide by schedule before honey harvesting in spring and after honey harvesting in autumn.

There is the global problem of the growing resistance of *V. destructor* mites to miticides amitraz and fluvalinate, which leads to increasing their dosages, which leads to increased toxicity to honey bees and contamination of beekeeping products (Rinkevich 2020). Fortunately, nine resistant to mite *V. destructor* populations of honey bee *A. mellifera* is obtained by constant selection: 1. Ireland North

County Dublin honey bee population, 2. The population of *A. m. scutellata* in Brazil and South Africa, 3. Toulouse honey bee population, 4. Island of Fernando de Noronha honey bee population, 5. Primorsky, Russia honey bee population, 6. Gotland, Sweden honey bee population, 7. Avignon, France honey bee population, 8. Honey bee population of Arnot Forest, Ithaca, NY, USA, 9. Marmara island honey bee population in Turkey (Mondragón et al. 2005; Allsopp 2006; Locke and Fries 2011; Çakmak, Fuchs, 2013; Locke, 2016; Conlon et al., 2018; McMullan, 2018; van Alphen and Fernhout 2020). Thus, the constant selection of honey bee colonies for hygienic behavior and resistance to mite *V. destructor* is more preferable to using increasing amounts of miticides. Moreover, it is assumed, environmental factors may play a big role in reducing the population of Varroa mites, not only the genetics of honey bees (Çakmak, Fuchs, 2013).

CONCLUSION

The negative effect of miticides amitraz and fluvalinate on honey bees have been shown here experimentally. Besides, there is increasing resistance of Varroa mites to the miticides amitraz and fluvalinate. However, it has been shown that it is possible to obtain populations of honey bees resistant to Varroa mites by constant selection. Breeding varroa-resistant honey bees allow to reduce the use of miticides and produce organic honey. Thus, the further development of beekeeping should be in the direction of selection for disease and Varroa resistance and adaptation to the environment.

Author contributions

Supervision: HWK, AGN. Writing original draft: HWK, SHL, MLL, RAI, AGN. Writing review and editing: HWK, SHL, MLL, RAI, AGN.

Funding

This research funding are the Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ0147612021)" Rural Development Administration, and the Priority Research Centers Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2020R1A6A1A03041954) for Hyung Wook Kwon; the Russian Government Contract 2021-2023 (# AAAA-A21-121011990120-

7) for Rustem A. Ilyasov; the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (# 19-54-70002) for Alexey G. Nikolenko.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because experimental work was conducted with an unregulated invertebrate species.

Consent to participate

The authors agree to participate in this research study.

Consent for publication

The authors agree to publish and a copyright transfer.

Availability of data and material/ Data availability

The qRT-PCR data used in this paper available in the database of GenBank. All other data is available upon request from the corresponding authors.

Code availability

The paper uses data obtained from open access materials in issues on journal websites. All used applications are available online through the internet.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ0147612021)" Rural Development Administration and also by the Priority Research Centers Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2020R1A6A1A03041954).

REFERENCES

Allsopp, M. H. (2006). Analysis of Varroa destructor infestation of Southern African honeybee populations *Dissertation for the degree of Master of Sciences* (pp. 1-285). Pretoria, Republic of South Africa: University of Pretoria.

Altstein, M., Nässel, DR. (2010). Neuropeptide signaling in insects. In T. G. Geary & A. G. Maule (Eds.), *Neuropeptide systems as targets for parasite and pest control* (Vol. 692, pp. 155-165). USA, New York: Springer Science+Business Media, LLC Landes Bioscience.

Anderson, DL., Trueman, JW. (2000). Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3), 165-189. doi: 10.1023/a:1006456720416.

Berry, JA., Hood, WM., Pietravalle, S., Delaplane, KS. (2013). Field-level sublethal effects of approved bee hive chemicals on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Plos One*, 8(10), e76536. doi: 10.1371/journal.pone.0076536.

Çakmak, I., Fuchs, S. (2013) Exploring a treatment strategy for long-term increase of varroa tolerance on Marmara Island, Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 242-250. doi: 10.3896/IBRA.1.52.5.11.

Conlon, B. H., Frey, E., Rosenkranz, P., Locke, B., Moritz, R. F. A., Rauttu, J. (2018). The role of epistatic interactions underpinning resistance to parasitic Varroa mites in haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(6), 801-809. doi: 10.1111/jeb.13271.

Dai, P., Jack, CJ., Mortensen, AN., Ellis, JD. (2017). Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. *Pest Management Science*, 73(11), 2282-2286. doi: 10.1002/ps.4608.

Frost, EH., Shutler, D., Hillier, NK. (2013). Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 2931-2938. doi: 10.1242/jeb.086538.

Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(8), 801-824. doi: 10.1007/s00359-007-0235-9.

Gosselin-Badaroudine, P., Chahine, M. (2017). Biophysical characterization of the Varroa destructor NaV1 sodium channel and its affinity for tau-fluvalinate insecticide. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- 31(7), 3066-3071. doi: 10.1096/fj.201601338R.
- Gracia, MJ., Moreno, C., Ferrer, M., Sanz, A., Peribáñez, M., Estrada, R. (2017). Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. *Plos One*, 12(2), e0171633. doi: 10.1371/journal.pone.0171633.
- Gregorc, A., Evans, JD., Scharf, M., Ellis, JD. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa mites* (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1042-1049. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.03.015.
- Gupta, R., Crissman, J. (2013). Agricultural chemicals. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig, B. Bolon & R. Ochoa (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (3 ed., pp. 1349-1372). Boston, United States: Academic Press.
- Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Blenau, W., Grimmekhuijzen, CJ. (2006). A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology*, 80(1), 1-19. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.07.005.
- Hewes, RS., Taghert, PH. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research*, 11, 1126-1142. doi: 10.1101/gr.169901.
- Hummon, AB., Richmond, TA., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, MA., Sweedler, JV. (2006). From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science*, 314, 647-649. doi: 10.1126/science.1124128.
- Ilyasov, RA., Farkhutdinov, RG., Shareeva, ZV. (2014). Influence of acaricides amitraz and fluralinate on average daily egg and total honey productivity of honey bee colonies. *Biomics*, 6(2), 73-76.
- Jiang, HB., Gui, SH., Xu, L., Pei, YX., Smagghe, G., Wang, JJ. (2017). The short neuropeptide F modulates olfactory sensitivity of *Bactrocera dorsalis* upon starvation. *Journal of Insect Physiology*, 99, 78-85. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.03.012.
- Johnson, EC. (2006). Postgenomic approaches to resolve neuropeptide signaling in *Drosophila*. In H. Satake (Ed.), *Invertebrate neuropeptides and hormones: basic knowledge and recent advances* (pp. 179-224). Trivandrum: Transworld Research Network.
- Jung, JW., Kim, J-H., Pfeiffer, R., Ahn, Y-J., Page, TL., Kwon, HW. (2013). Neuromodulation of olfactory sensitivity in the peripheral olfactory organs of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Plos One*, 8(11), e81361. doi: 10.1371/journal.pone.0081361.
- Klein, AM., Vaissière, BE., Cane, JH., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, SA., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. doi: 10.1098/rspb.2006.3721.
- Lim, S., Yunusbaev, UB., Ilyasov, RA., Lee, HS., Kwon, HW. (2020). Abdominal contact of fluralinate induces olfactory deficit in *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164(1), 221-227. doi: 10.1016/j.pestbp.2020.02.005.
- Livak, KJ., Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Locke, B. (2016). Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie*, 47(3), 467-482. doi: 10.1007/s13592-015-0412-8.
- Locke, B., Fries, I. (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*, 42(4), 533-542. doi: 10.1007/s13592-011-0029-5.
- Mao, W., Schuler, M., Berenbaum, MR. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 12657-12662. doi: 10.1073/pnas.1109535108.
- Marciniak, P., Kuczer, M., Rosinski, G. (2011). New physiological activities of myosuppressin, sulfakinin and NVP-like peptide in *Zophobas atratus* beetle. *Journal of Comparative Physiology B*, 181, 721-730. doi: 10.1007/s00360-011-0563-5.
- McMullan, J. (2018). Adaptation in honey bee (*Apis mellifera*) colonies exhibiting tolerance to *Varroa destructor* in Ireland. *Bee World*, 95(2),

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- 39-43. doi: 10.1080/0005772X.2018.1431000.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185, 323-340. doi: 10.1007/s003590050392.
- Mondragón, L., Spivak, M., Vandame, R. (2005). A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie*, 36(3), 345-358. doi: 10.1051/apido:2005022.
- Nässel, DR. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, 68, 1-84. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00057-6.
- Rangel, J., Tarpy, DR. (2015). The combined effects of miticides on the mating health of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research*, 54, 325-329. doi: 10.1080/00218839.2016.1147218.
- Rinkevich, F. D. (2020). Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the *Varroa* Mite, *Varroa destructor*, within commercial beekeeping operations. *Plos One*, 15(1), e0227264. doi: 10.1371/journal.pone.0227264.
- Schoofs, L., De Loof, A., Van Hiel, MB. (2017). Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 62, 35-52. doi: 10.1146/annurev-ento-031616-035500.
- Southwick, EE., Southwick, LJ. (1992). Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 85(3), 621-633. doi: 10.1093/jee/85.3.621.
- Taghert, PH., Veenstra, JA. (2003). *Drosophila* neuropeptide signaling. *Advances in Genetics*, 49, 1-65. doi: 10.1016/S0065-2660(03)01001-0.
- van Alphen, J. J. M., Fernhout, B. J. (2020). Natural selection, selective breeding, and the evolution of resistance of honeybees (*Apis mellifera*) against *Varroa*. *Zoological Letters*, 6, 6. doi: 10.1186/s40851-020-00158-4.
- Wallace, KB. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 1. doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00574-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00574-1).
- Xu, G., Gu, G-X., Teng, Z-W., Wu, S-F., Huang, J., Song, Q-S., Fang, Q. (2016). Identification and expression profiles of neuropeptides and their G protein-coupled receptors in the rice stem borer *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*, 6, 28976. doi: 10.1038/srep28976.
- Zhang, Z. Q. (2000). Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Systematic and Applied Acarology*, 5, 9-14. doi: 10.11158/saasp.5.1.2.

Citation/Atf: Ncibi S, Ben Amor A, Ben Abdelkader F. 2021. Efficacy of essential oils of *thymbra capitata* L. And *mentha pulegium* L. Collected in Tunisia on larvae of *Galleria mellonella* L. (Tunus'ta Toplanan *Thymbra capitata* L. ve *Mentha pulegium* L. Esansiyel Yağlarının *Galleria mellonella* L. Üzerine Etkisi). U. Arı D./U. Bee J. 21: 31-38, DOI: 10.31467/uluaricilik.888724

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

EFFICACY OF ESSENTIAL OILS OF *Thymbra capitata* L. AND *Mentha pulegium* L. COLLECTED IN TUNISIA ON LARVAE OF *Galleria mellonella* L.

Tunus'ta Toplanan *Thymbra capitata* L. ve *Mentha pulegium* L. Esansiyel Yağlarının *Galleria mellonella* L. Üzerine Etkisi

Sarra NCIBI¹, Abir BEN AMOR², Faten BEN ABDELKADER^{3*}

¹Department of Plant health and Environment, LR14AGR02 of Bioaggressors and Integrated Pest Management in Agriculture, National Agronomic Institute of Tunisia, University of Carthage, 43 street Charles Nicolle, 1082, Tunis, TUNISIA, ORCID No: 0002-7621-0835, E-posta: s.ncibi@gmail.com, ORCID No: 0003-4063-5521

² Department of Animal Resources, Fisheries and Food Technology, National Agronomic Institute of Tunisia, University of Carthage, 43 street Charles Nicolle, 1082, Tunis, TUNISIA, ORCID No: 0001-5064-6553, E-posta: abirbenamr03@gmail.com.

³ National Agronomic Institute of Tunisia, University of Carthage, 43 street Charles Nicolle, 1082, Tunis, TUNISIA ORCID No: 0003-4063-5521, Corresponding author: E-postal: benabdelkader.faten@gmail.com.

Geliş Tarihi / Received: 02.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 08.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.888724

ABSTRACT

The wax moth is one of the honeybee pests that cause a lot of damage and loss for the beekeepers in Tunisia. The use of insecticides is more and more used although they are known to contaminate wax and honey. This study aims to test the essential oils of two North African common plants *Thymbra capitata* L. and *Mentha pulegium* L. efficacy as alternative method by fumigation on instars of *Galleria mellonella* L. We also determined the duration of the development stages of the great wax moth (GWM) presented in Tunisia. Results showed that under a temperature ranged between 30 and 33°C, the total duration from eggs to adults of GWM lasted 51 days. The fumigant test showed the toxicity of both oils on larvae instars tested. The second larvae instar was more susceptible than the 4th instar. Moreover, *M. pulegium* was more toxic against the 2nd larvae instar than *T. capitata* with an LC50 at 48h of 41.82 and 456.27 µl/L air, respectively. The essential oils present a good alternative to the insecticides to control wax moths.

Keywords: *Galleria mellonella*, *Thymbra capitata*, *Mentha pulegium*, fumigation, development stages, LC₅₀.

ÖZ

Balmumu güvesi, Tunus'taki arıcılar için çok fazla zarara ve kayba neden olan bal arısı zararlılarından biridir. Balmumu ve balı kirlettikleri bilinmesine rağmen böcek öldürücülerin kullanımı giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, iki Kuzey Afrika ortak bitkisi *Thymbra capitata* L. ve *Mentha pulegium* L.'nin büyük mum güvesi (GWM) *G. mellonella* üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca büyük balmumu güvesinin gelişme aşamalarının sürelerini de belirlenmiştir. Sonuçlar, 30 ila 33°C arasında değişen bir sıcaklık altında, yumurtalardan GWM'li yetişkinlere kadar olan toplam sürenin 51 gün sürdüğünü göstermiştir. Fumigant testi, test edilen larva dönemlerinde her iki yağın da toksisitesini göstermiştir. İkinci larva dönemi, 4. evreye göre daha hassastır. Dahası, *M. pulegium*, 2. larva dönemine karşı, sırasıyla, 48. saatte 41.829 ve 456.276 µl / Lair'de bir LC50 ile *T. capitata*'dan daha toksik olduğu belirlenmiştir. Bu bulgulara göre uçucu yağlar, mum güvelerini kontrol altına almak için böcek ilaçlarına iyi bir alternatif sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, *Thymbra capitata*, *Mentha pulegium*, tütsüleme, gelişme evreleri, LC₅₀.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Balmumu güvesi, Tunus'taki arıcılar için çok fazla zarara ve kayba neden olan bal arısı zararlılarından biridir. Balmumu ve balı kirlettikleri bilinmesine rağmen böcek öldürücülerin kullanımı giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu çalışma, iki Kuzey Afrika ortak bitkisi *Thymra capitata* L. ve *Mentha pulegium* L.'nin uçucu yağlarının alternatif bir yöntem olarak *Galleria mellonella* L. Tunus'ta sunulan güve (GWM).

Materyal ve Metot: *G. mellonella*'nin larvaları, istila edilmiş bal arısı kolonilerinden elde edildi ve laboratuvarında yetiştirildi. Büyük mum güvesinin (GWM) gelişme aşamalarının süresi belirlendi. Uçucu yağlar, bir Clevenger tipi kullanılarak *Thymra capitata* L. ve *Mentha pulegium*'dan çıkarıldı. Uçucu yağların toksisitesi, fümigasyon yoluyla değerlendirildi. Bunun için çap filtre kağıtlarına (Whatman No.1) 4, 8, 12, 14, 16, 20, 25, 30 ve 50 µl'lik farklı yağ dozları empenye edilmiş ve 10 larva içeren pleksiglas şişelerin vidalı kapaklarına takılmıştır. İkinci ve dördüncü dönem olmak üzere iki evre test edildi. Mortalite 2, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48 saat sonra değerlendirildi. 48 saatte ölümcül konsantrasyon LC50 de değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: Sonuçlar, 30 ila 33°C arasında değişen bir sıcaklık altında, yumurtalardan GWM'li yetişkinlere kadar olan toplam sürenin 51 gün sürdüğünü gösterdi. Fumigant testi, test edilen larva dönemlerinde her iki yağın da toksisitesini göstermiştir. İkinci larva dönemi, 4. evreye göre daha hassastır. Dahası, *M. pulegium*, 2. larva dönemine karşı, sırasıyla, 48. saatte 41.829 ve 456.276 µl / Lair'de bir LC50 ile *T. capitata*'dan daha toksikti. Uçucu yağlar, mum güvelerini kontrol altına almak için böcek ilaçlarına iyi bir alternatif sunar.

INTRODUCTION

The wax moth is one of the most serious threats of honeybee colonies and stored combs. (Ritter and Akkratanakul 2006). This pest is found throughout the world. *Achroia grisella* Fabricius 1794 called the lesser wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) and *G. mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) called the greater wax moth (GWM) are both common in Tunisia but *Galleria mellonella* is more widespread and causing more damage (Pirk et al. 2016).

The damage of wax moths is caused only during their larval stage. The larvae attack stored combs

and those inside the honeybee colonies, burrow into the combs and feed on skins of pupae, on pollen, on wax and other debris found in the beewax (Jindra and Sehnal 1989). If the colonies are strong the honey bees defend themselves and the chance of infestation is low. However, larvae of GWM can destroy the weak colonies (Shimanuki 1981) The larvae when digging into the combs, make silken tunnels in the middle of the comb that become covered with a mass of webbing, a condition described as "Galleriasis" (Ritter and Akkratanakul 2006).

Several chemicals and non-chemical have been used to control the wax moth on stored beeswax combs (Williams 1997, Ritter and Akkratanakul 2006). Para-dichlorobenzene (1,4-dichlorobenzene, PDCB) is a fumigant insecticide used to control the wax moth during the storage of beeswax combs. Its toxicity was reported by the US Department of Labor: NIOSH/OSHA/DOE (Bogdanov et al. 2004). In Germany for example 36 to 50% of German honey contained from 3 to 50 µg PDCB /kg (Wallner 1992).

Alternative methods such as the essential oils supposedly do not present the same risks as synthetic insecticides (Jemâa et al. 2012, Isman 2016, Ncibi et al. 2020). Plants may present potential alternatives to control insects because they are composed of many bioactive chemicals (Wink 1993). Oils are a mixture of several molecules, and their biological activities have been shown to act as potent acute or chronic insecticides (Owayss and Abd-Elgayed 2007, Elbeheri et al. 2016, Bisht et al. 2017, Almadani and Hiware 2020).

In our study, we attempted to study for the first time the duration of development stages of the GWM in TUNISIA under laboratory conditions on one hand and on another hand to evaluate the toxicity of essential oils extracted from two local plants (*Thymra capitata* L and *Mentha pulegium*) on the second and the fourth larvae instars. The choice of these instars was made after survival analyses on all the instars. The larvae of the first instar were too small to handle and the larvae of the last instars were too big and cause already a lot of damage. For this reason we chose the second and the fourth instars.

MATERIALS AND METHODS

Wax moth rearing

Larvae of *G. mellonella* were obtained from infested honey bee colonies collected from the National Agronomic Institute of Tunisia apiary (36.84536, 10.19184). The wax moths were reared based on the methods described by Ellis et al. (2013). Briefly, around 50 to 60 larvae were placed into containers with artificial diets (Marilleau 1978) and fed until the pupal stage. Once the adult moths emerged, the males and females were transferred together into other plastic containers to mate. Once the females laid eggs, the eggs were collected and transferred to artificial diets used as food by the newly emerged larvae.

Essential oils extraction

Fresh aerial parts of the two spontaneous plants *T. capitata* L and *M. pulegium*. L were collected from two regions Ras Jbal (37, 1254; 10,0726) Menzel Abdrahmen 37.1413; 9.5146) respectively, situated in the Bizerte Governate in Northern Tunisia, and Essential oils (thyme and mint oils respectively) were obtained from 1 kg of fresh aerial parts by steam distillation for 3 hours using a Clevenger-type apparatus. Briefly, the vessel of apparatus is heated and temperature is controlled with a thermometer. Evaporation under atmospheric pressure occurs at 100°C, and the vapors charged in essential oils flow through the distillation column, enrich the concentration of essential oil, and flow further into the condenser where both the water and essential oil drop into the Clevenger apparatus (Périno et al. 2019).

Fumigant activity bioassay

To assess fumigant toxicity of two plants, 4 cm diameter filter papers (Whatman No.1) were impregnated with the different oil doses of 4, 8, 12, 14, 16, 20, 25, 30 and 50 µl. Control received water. The impregnated filter papers were then attached to the screw caps of 115 ml plexiglas bottles. The calculated fumigant concentrations were respectively 34.78; 69.56; 104.34; 121.73; 139.13; 260.86; 434.78; 869.56 and 1304.34 µl/l air. Each bottle contained 10 larvae. Two instars were tested,

the second and the fourth instars of GWM. Each concentration and control were replicated four times. Mortality was recorded after 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48 hours. Bioassays were designed to assess respectively median lethal concentration LC₅₀ (dose that kills 50% of the exposed insects) at 48h.

Statistical Analysis

Probit analysis (Finney 1971) was conducted to estimate lethal concentrations (LC₅₀) and with its 95% fiducial limits using SPSS version 23 (IBM Corporation, USA).

RESULTS

Development stages of *Galleria mellonella*

The rearing of GWX under laboratory conditions revealed that at a temperature ranging from 30 to 33°C and a 40 to 45% RH, the egg stage lasts 10 days while the larvae stage lasts 30.5 days almost (Table 1). The color of the eggs is white close to light pink (Fig.1a). Upon hatching, the larvae are creamy and white, and their length is variable (Fig. 1B). In this study, we did not follow the number of molting stages. But we noted that the increase in growth and size of larvae happens during the final instars where the length reached approximately 20.5±0.26 mm. This last instar ceases feeding and starts the formation of the cocoon and finally became a pupa (Fig.1c). From pupae to adult moth took 10.5 days. The mean life span of adults was around 11 days (Table 1).

The entire life cycle from eggs to adult emergence took approximately 51 days.

Table 1: Duration of development stages of *G.mellonella*

Stage	Duration (days)
Egg	10 ± 0.33
Larvae	30.5 ± 2.38
Pupae	10.5 ± 0.57
Adult (female)	11 ± 0.81

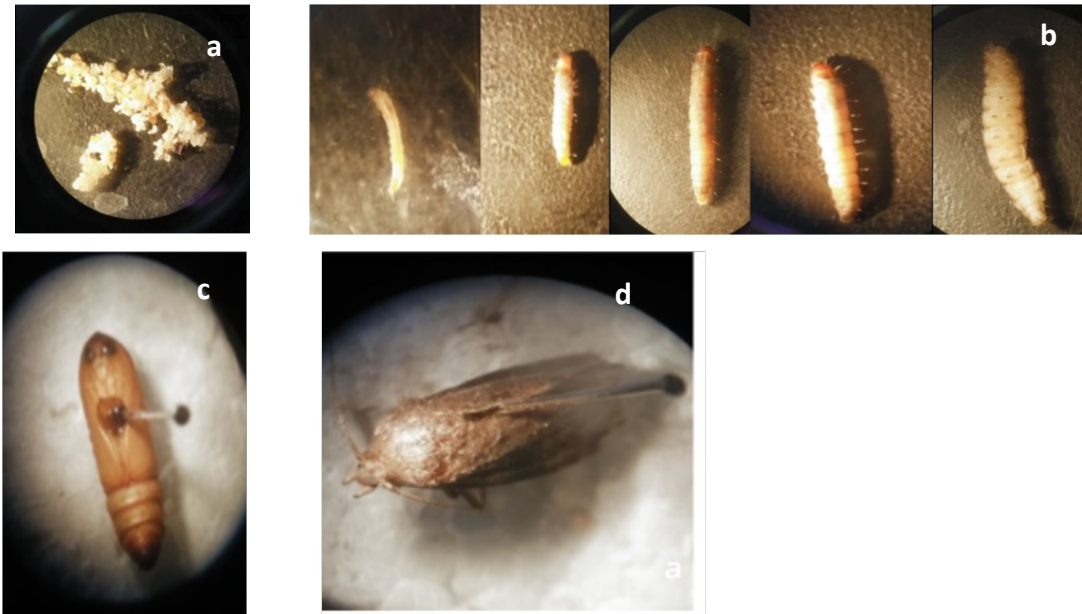


Figure 1. Different developmental stages of *Galleria mellonella*: eggs (a), larval (b), pupae (c), adult moths (d)

Fumigant test

The effect of thyme oil on wax moth larvae is variable depending on the stage exposed. The mortality of second instar larva exposed to thyme oil started after 2h at the highest concentration (1304.34 μ l/l air) to reach 100% at 24h (Fig. 2A). As the concentration

gradually decreases, the time to record a larva mortality increases. At the lowest concentration (34.78 μ l/l air), the mortality of larvae was only 2.5 % only after 48 hours. However, with the fourth instar larvae, we started to record the mortality after 24h (Fig. 2B). Moreover, with the highest concentration, we reached only 50% of mortality after 48h.

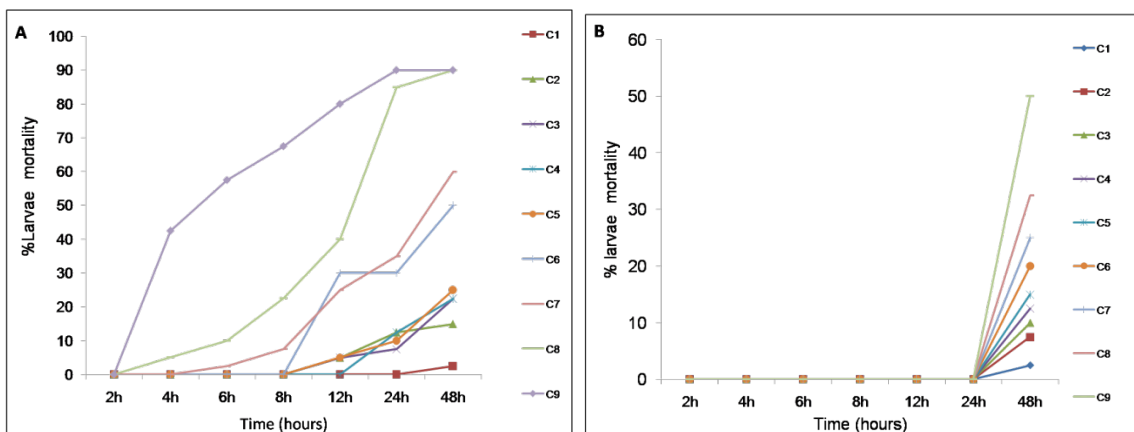


Figure 2. Percentage of mortality of L2 (A) and L4 (B) instar over time exposed to *Thymra capitata* L. oil.

Concerning the mint oil, the mortality of L2 instar at 1304.34 μ l/l air after 4h of exposure was 17% and reached 100% after 48h. And at the lowest

concentration, 20% of mortality was recorded at 12h and more than 60% was recorded after 48h for all the concentrations (Fig. 3A).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

However, when L4 instar was exposed to the same concentrations, only 7.5% of mortality was recorded

after 48h. The six first concentrations did not induce mortalities with the L4 instar (Fig. 3B)

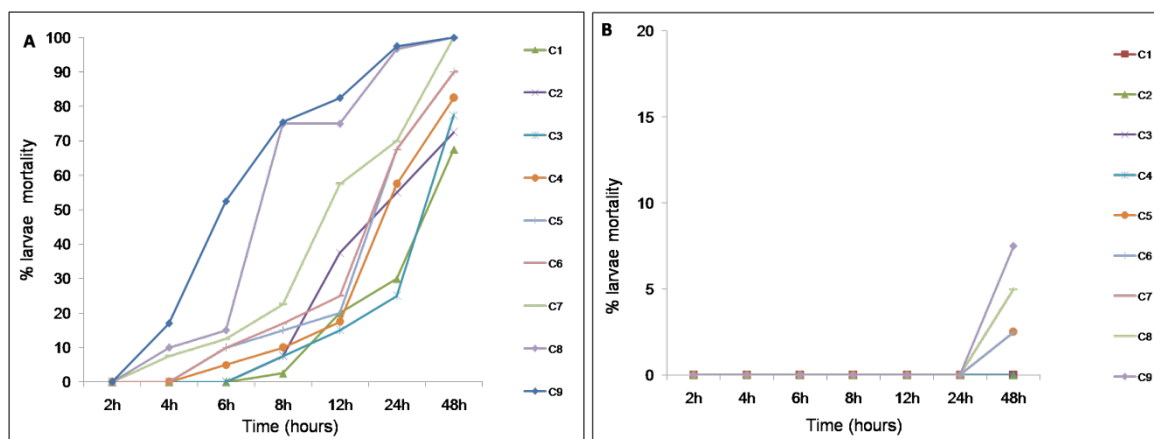


Figure.3. Percentage of mortality of L2 (A) and L4 (B) instar over time exposed to *Mentha pulegium* oil

When calculated in terms of concentration (LC₅₀), probit analysis showed that the 2nd larvae instar is more susceptible to both oils than the 4th larvae instar (Table 2). Moreover, mint oil seems to be more

toxic than thyme oil when applied on larvae of the second instar. While thyme oil is more toxic than mint oil when applied on the 4th instar larvae.

Table 2. The LC₅₀ (µl/ml) for essential oils of *Mentha.pulegium* and *Thymbra.capitata* against the 2nd and the 4th larval instars of GWM

Larvae instar	plant	Lethal concentration LC50 (µl/L air)	Model fitness		
			(X ²) ^a	df	p
L2	<i>M. pulegium L.</i>	41.8 (-27.92 – 75.92)	12.79	9	0.119
	<i>T. capitata L.</i>	456.2 (334.49– 637.23)	8.63	8	0.374
L4	<i>M. pulegium L.</i>	1677 (695.70 – 43.35)	0.34	7	1.000
	<i>T. capitata L.</i>	957.7 (678.57-1701.15)	5.58	8	0.664

Units LC₅₀ = µl/l air, applied for 48 h

df; degree of freedom

p; significance

95% lower and upper confidence limits are shown in parenthesis.

^aChi-square value

DISCUSSION

Various investigators have noted the biological behavior of *G. mellionella* all around the world (Paddock 1918, Jindra and Sehnal 1989, Williams 1997, Ellis et al. 2013, Kwadha et al. 2017) but no information has been published for Tunisia.

Paddock (1918) reported the egg stage ranged from an average of 7.2 to 21.8 days while Shimanuki (1981) and Charriere and Imdorf (1999) reported a

period between 3 and 30 days before eggs hatching into larvae. In this study, the eggs stage lasts 10 days at a temperature ranging from 30 to 33°C. According to Williams (1997), the duration of egg development is faster at warm temperatures (29°C–35°C) and more slowly at cold temperatures reaching 30 days at 18°C.

Larval development also depends on temperature and humidity. It could last 24–28 days at 29–32°C and high humidity (Ellis et al. 2013). In this study, larvae

development lasts 30.5 days while from pupae to adults, it takes 10.5 days. This result is close to those found by Warren and Huddleston (1962) who reported a duration of 32.9 and 8 days for larvae and pupal development, respectively.

Moreover, the total duration of 51 days from eggs to adults of *G. mellonella* did not differ from some previous studies (Paddock 1928, Warren and Huddleston 1962). The cycle can last from 6 weeks to 6 months depending on temperature and food available (Charriere and Imdorf 1999).

The wax moth is highly destructive and can cause important losses to combs and hive materials. Many essential oils and their components were tested for control wax moth larvae such as clove and eugenol (Williams 1997).

Elbehery et al. (2016) found that the treatment of beeswax with neem oil at different concentrations caused the mortality of larvae all stages of *G. mellonella* and that the mortality was concentration dependent. These results agree with our findings. Indeed, the fumigant test showed that the mortality of GWM larvae is increasing with the increase of the concentrations and exposure time.

Comparing the LC₅₀ values of the present investigation with different studies indicated different results. The LC₅₀ of thyme recorded for the 5th instar larvae was 4.5384 ml/Lair in the study of Almadani and Hiware (2020) which was much higher than the LC₅₀ of the 4th instar recorder in this study. The LC₅₀ of peppermint oil-1% in acetone of 5th instar larvae of GWM was 2920 µl/ml (Bisht et al. 2017) while the LC₅₀ of the 4th larvae instar of mint oil in this study was 1677 µl/ml air.

Results of this research illustrated that larvae varied in their susceptibility to the two essential oils. This variability might be explained by the insecticidal ability of the active constituents of oils but also to the age of exposed larvae (Owayss and Abd-Elgayed 2007). The essential oils of *M. pulegium* and *T. capitata* were widely used to control stored grain insects in Tunisia (Salem et al. 2017, Ncibi et al. 2020).

Also the *Thymus. algeriensis* oil from two sites in Tunisia was found to possess strong insecticidal activity after 24 hours with LC₅₀ ranged from 44.25 to 112.75 µl/l air against *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae third instar (Ben El Hadj Ali et al. 2015). The lethal concentration (LC₅₀) value of *M. pulegium* was 0.3 µL/L on some

Lepidopteran species adults was demonstrated (Chaaban et al. 2019). Other studies showed that larvicidal activity of *M. pulegium* was more efficient on the 3rd instar fourth and fifth instars larvae of *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera) (Ezzine et al. 2018).

This work is an attempt to study the biological cycle of the wax moth and its control using a North African endemic species. *T. capitata* L. and *M. pulegium* L. have an insecticide activity against the larvae of *G. mellonella* and they are more toxic to the second instar than the fourth instar.

CONCLUSION

G. mellonella has a large geographic distribution and causes serious problems for the apicultural industry. Botanical insecticides particularly essential oils supposedly do not pose the same risks on human health and environment, as synthetic insecticides, the interest in and utilization of such control tools have become increasingly relevant in the control of insect pests (Almadani and Hiware 2020). Essential oils seem to be a safe alternative to control the wax moth, but further studies should be carried out using different plants in Tunisia.

Author contribution

Faten Ben Abdelkader and Abir Ben Amor designed the study. Sarra Ncibi and Abir Ben Amor carried out the experiments. Faten Ben Abdelkader wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Source of finance

Not applicable

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Ethical issue

Not applicable

Acknowledgment

We would like to thank the anonymous reviewers who provided valuable comments to the final version of the manuscript.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

REFERENCES

- Almadani A, Hiware, C. 2020. The effect of homeopathic drug and essential oil against greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *Indian Journal of Agricultural Research* 54(4):10.18805/IJARE.A-5258.
- Ben El Hadj Ali I, Chaouachi, M, Bahri, R, Chaieb, I, Boussaïd, M, Harzallah-Skhiri, F. 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops and Products* 77: 631-639, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.046>.
- Bisht K, Mishra, VK, Yadav, SK, Kumar, R. 2017. Efficacy of some essential oils against the greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) under storage condition. *Environ. Ecol* 35: 2760-2763, 10.13140/RG.2.2.24285.31209.
- Bogdanov S, Kilchenmann, V, Seiler, K, Pfefferli, H, Frey, T, Roux, B, Wenk, P, Noser, J. 2004. Residues of para-dichlorobenzene in honey and beeswax. *Journal of Apicultural Research* 43(1): 14-16, <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101102>.
- Chaaban SB, Hamdi, SH, Mahjoubi, K, Jemâa, JMB. 2019. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 126(3): 237-246, <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00218-8>.
- Charriere JD, Imdorf, A. 1999. Protection of honeycombs from wax moth damage. *American bee journal* 139(8): 627-630.
- Elbehery H, Abd El-Wahab, TE, Dimetry, NZ. 2016. Management of the greater wax moth *Galleria mellonella* with Neem Azal-T/S, in the laboratory and under semi-field conditions. *Journal of Apicultural Science* 60(2): 69-76, DOI: 10.1515/jas-2016-0018.
- Elbehery H, El-Wahab Tarek Essa, A, Dimetry Nadia, Z. 2016. Management of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella* with Neem Azal-T/S, in the Laboratory and under Semi-Field Conditions, *Journal of Apicultural Science*, pp. 69.
- Ellis JD, Graham, JR, Mortensen, A. 2013. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-17, 10.3896/IBRA.1.52.1.10.
- Ezzine O, Dhahri, S, Akkari, H, Ben-Jamaa, ML. 2018. Larvicidal activity of essential oil of *Mentha pulegium* on larvae of *Orgyia trigotephra* Boisduval, 1829 (Lepidoptera, Erebidae). *Journal of New Sciences CIRS(20)*: 3423-3428, DOI: 10.1021/bk-2016-1218.ch002.
- Finney D. 1971. Probit analysis, Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Isman MB. 2016. Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations, Medicinal and aromatic crops: production, phytochemistry, and utilization, ACS Publications, pp. 13-26.
- Jemâa JMB, Tersim, N, Toudert, KT, Khouja, ML. 2012. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research* 48: 97-104, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.003>.
- Jindra M, Sehnal, F. 1989. Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 35(9): 719-724, [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90091-7).
- Kwadha CA, Ong'amo, GO, Ndegwa, PN, Raina, SK, Fombong, AT. 2017. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8(2): 61.
- Marilleau R. 1978. Fiche technique fausse teigne des nids des bourdons. cahiers de liaison de l'O.P.I.E 29
- Ncibi S, Attia, S, Diop, SMB, Ammar, M, Hance, T. 2020. Bio-insecticidal activity of three essential oils against *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792)(Coleoptera: Bostrichidae). *African Entomology* 28(2): 339-348, <https://doi.org/10.4001/003.028.0339>.
- Owayss AA, Abd-Elgayed, AA. 2007. Potential efficacy of certain plant volatile oils and chemicals against greater wax moth, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: pyralidae). *Bull. Ent. Soc. Egypt, Econ. Ser* 33: 67-75.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Paddock FB. 1918. The beemoth or waxworm, in: Creative Media Partners L., 2019 (Ed.), pp. 40.
- Paddock FB. 1928. The Control of the Beemoth. *Journal of economic entomology* 21(3): 489-494, [10.1093/jee/21.3.489](https://doi.org/10.1093/jee/21.3.489).
- Périno S, Chemat-Djenni, Z, Petitcolas, E, Giniès, C, Chemat, F. 2019. Downscaling of Industrial Turbo-Distillation to Laboratory Turbo-Clevenger for Extraction of Essential Oils. Application of Concepts of Green Analytical Chemistry. *Molecules* 24(15): 2734.
- Pirk CWW, Strauss, U, Yusuf, AA, Démares, F, Human, H. 2016. Honeybee health in Africa—a review. *Apidologie* 47(3): 276-300, [10.1007/s13592-015-0406-6](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0406-6).
- Ritter W, Akwatanakul, P. 2006. Honey bee diseases and pests: a practical guide. FAO.
- Salem N, Bachrouch, O, Sriti, J, Msaada, K, Khammassi, S, Hammami, M, Selmi, S, Boushih, E, Koorani, S, Abderraba, M. 2017. Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *International journal of food properties* 20 (sup3): S2899-S2913, <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1382508>.
- Shimanuki H. 1981. Controlling the greater wax moth: a pest of honeycombs. rev. *Farmers' Bulletin-US Dept. of Agriculture (USA)*. no. 2217.
- Wallner K. 1992. residues of P-dichlorobenezene in wax and honey. *American Bee Journal* 132(8): 538-541.
- Warren L, Huddleston, P. 1962. Life history of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L., in Arkansas. *Journal of the Kansas Entomological Society* 35(1): 212-216, [doi: 10.3390/insects8020061](https://doi.org/10.3390/insects8020061).
- Williams JL. 1997. Insects: Lepidoptera (moths), in: Morse R.A. (Ed.), *Honey bee pests, predators, and diseases*, pp. 121-141.
- Wink M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective, in: Van Beek T.A., Breteler, H. (Ed.), *Phytochemistry and agriculture*, pp. 171-213.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TUNCELİ BALLARININ COĞRAFİ İŞARET ÇALIŞMASI

Geographical Indication Study of Tunceli Honeys

Aslı ÖZKÖK^{1*}, Ömür GENÇAY ÇELEMLİ², Golshan ZARE³, Çiğdem ÖZENİRLER², Nazlı MAYDA⁴, Kadriye SORKUN²

^{1*}Hacettepe Üniversitesi, Arı ve Arı Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (HARÜM), Beytepe, Ankara, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0002-7336-2892, *Yazışma Yazarı/Corresponding author: E-posta: asozkok@gmail.com

²Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beytepe, Ankara, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0002-2215-9552, E-posta: gencay@hacettepe.edu.tr, ORCID No.: 0000-0003-0390-2416, E-posta: cigdemozenirler@gmail.com, ORCID No: 0000-0003-3224-7748, E-posta: kadriye@hacettepe.edu.tr.

³Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0002-5972-5191, E-posta: golshanzare@gmail.com.

⁴Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Edirne, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0002-7289-5830, E-posta: nazli.mayda@gmail.com.

Geliş Tarihi / Received: 15.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 07.04.2021

DOI: 10.31467/uluarıcılık.896300

ÖZ

Yapılan çalışmada, Tunceli ilinden toplanan ballarda melissopalinojik ve kimyasal analizler ile Tunceli ballarının karakterizasyonu çıkartılmış olup bölgenin coğrafi işaret çalışmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşaması olan melissopalinojik analizler kapsamında, yöre ballarının bitkisel kaynağı olabilecek 31 familyaya ait 80 takson tespit edilmiştir. Analiz edilen 32 balın 7 tanesinin monofloral (bir adet; *Berberis crataegina*- T13, bir adet *Hypericum scabrum*- T14, beş adet *Paracaryum cristatum* balı-T18,21,24,27,28), diğerlerinin ise multifloral olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal analizin bir aşaması olan, balda früktoz ve glikoz değerlerinin tesbiti analizi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile gerçekleştirilmiş olup; früktoz değerlerinin 25,97-43,44 g/100g aralığında (ortalama: 32,28±3,32 g/100g), glikoz değerlerinin; 21,84-45,6 g/100g aralığında (ortalama: 33,04±5,22 g/100g) olduğu tespit edilmiştir. Früktoz/Glikoz oranının ise 0,83-1,13 aralığında olup ortalama değerin 0,97±0,07 olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal analizler kapsamında UV-Vis Spektrometre cihazı ile tespit edilen toplam fenolik madde miktarları 98,96±0,02 mgGAE/kg 330,96±0,02 mgGAE/kg (ortalama 143,46±0,21 mgGAE/kg) değerleri aralığında bulunmuştur. Tunceli ili ballarının, uçucu bileşenlerinin tayini Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) cihazı ile gerçekleştirilmiş olup yapılan analiz sonucunda ballarda; aldehidler, alifatik asit ve esterleri, alkoller, hidrokarbonlar, karboksilik asit ve esterleri, ketonlar, terpenler, yağ asidi ve esterleri bileşik gruplarına ait bileşikler tespit edilmiştir. Bu gruplardan karboksilik asit ve esterleri ile yağ asidi ve esterleri gruplarına ait bileşiklere yüksek oranlarda rastlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bal, Coğrafi işaret, Melissopalinoji, Kimyasal analiz, Tunceli

ABSTRACT

In this study, characterization of Tunceli honeys was made by melissopalynological and chemical analyzes in honey collected from Tunceli province and contribution was aimed to the geographical indication study of the region. Within the scope of the melissopalynological analysis, which is the first

stage of the study, 80 taxa belonging to 31 families that can be the plant source of the local honeys were determined. Seven of the 32 honeys analyzed were monofloral (one; *Berberis crataegina*-T13, one *Hypericum scabrum*-T14, five *Paracaryum cristatum* honey-T18,21,24,27,28), and the others were multifloral. The analysis of determination of fructose and glucose values in honey, which is a step of chemical analysis, was carried out with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) device. It was found that fructose values in the range of 25.97-43.44 g / 100g (average: 32.28 ± 3.32 g / 100g) and glucose values in the range of 21.84-45.6 g / 100g (average: 33.04 ± 5.22 g / 100g). Fructose / Glucose ratio was determined between 0.83-1.13 and the average value was found 0.97 ± 0.07 . Within the scope of chemical analyzes, the total phenolic substance amounts were detected by the UV-Vis Spectrometer. It has been found in the range values were 98.96 ± 0.02 mgGAE / kg - 330.96 ± 0.02 mgGAE / kg (average 143.46 ± 0.21 mgGAE / kg). The determination of the volatile components of Tunceli province honeys was carried out by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) device and as a result of the analysis; compounds belonging to the compound groups of aldehydes, aliphatic acid and esters, alcohols, hydrocarbons, carboxylic acids and esters, ketones, terpenes, fatty acids and esters have been identified. Among these groups, compounds belonging to the groups of carboxylic acids and esters, fatty acids and esters have been found in high rates.

Keywords: Honey, Geographical indication, Melissopalynology, Chemical analysis, Tunceli

EXTENDED ABSTRACT

Aim: Names or signs indicating a product identified with a locality, area, region or country of origin in terms of a distinct quality, reputation or other characteristics are defined as "geographical indication". The determination of the plant origin, which can also be defined as the origin name of honey, is traditionally based on the microscopic evaluation of honey. The basic principle here is to determine the origin of honey indirectly. The plant pollens in the honey are defined in order to determine the plants visited by the bees during the production of honey. With chemical analysis, it is possible to determine both the quality of honey and various compounds originating from sources specific to the region of production. Our aim in this study is to reveal the characteristics of honey produced in Tunceli province and contribute to Tunceli honey to obtain geographical indications. Within the scope of this purpose, 32 honey samples harvested in 2018 were collected from beekeepers registered in the association with the contribution of the Tunceli Province Beekeepers Association. Melissopalynological and chemical analyzes of the collected honey samples were made.

Materials and Methods: Within the scope of the geographical indication study of Tunceli honey, 32 samples of honey harvested in 2018 were collected from the beekeepers registered in the association with the contribution of the Tunceli Province Beekeepers Association. In addition, during the field studies, apiaries in different regions were visited

considering the blooming season in the region, and plants that could be a source of nectar and pollen for bees were collected from plants that naturally spread in the province. Collected samples were evaluated taxonomically. Melissopalynological and chemical analyzes (moisture, sugar, total phenolic and GC-MS) of the collected honey samples were made.

Results: As a result of the melissopalynological analysis, which is the first stage of the study, 80 taxa belonging to 31 families that can be the plant source of the local honeys were determined. Seven of the 32 honey samples analyzed were monofloral (one; *Berberis crataegina*-T13, one *Hypericum scabrum*-T14, five *Paracarium cristatum* honey-T18,21,24,27,28), and the others were multifloral. As a result of melissopalynological analyzes, pollens of *Berberis crataegina*, *Hypericum scabrum* and *Paracaryum cristatum* taxa were found in dominant proportions in some honeys, while *Anthemis tricornis*, *Astragalus* sp., *Berberis crataegina*, *Coronilla varia*, *Epilobium hirsutum*, *Helianthemum ledifum*, *Lotus Plantago lanceolata*, *Potentilla argentea*, *Tanacetum parthenium*, *Teucrium* sp., *Trifolium repens*, *Onobrychis oxyodonta*, *Verbascum* sp. the secondary rates of pollen belonging to taxa were found. Total pollen count (TPS10) values in 10 grams of honey calculated within the scope of melissopalynological analysis were determined in the range of 3662-845775. Moisture values that provide information about the harvesting and storage conditions of honey. It has been determined as minimum 12.8%, maximum 16.8% and average $15.51 \pm 0.84\%$, and it has been observed that

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

moisture of honey samples are distributed within normal values within the framework of standards. The analysis of determination of fructose and glucose values in honey, which is a step of chemical analysis, was carried out with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) device. It was found that fructose values in the range of 25.97-43.44 g / 100g (average: 32.28 ± 3.32 g / 100g) and glucose values in the range of 21.84-45.6 g / 100g (average: 33.04 ± 5.22 g / 100g). Fructose / Glucose ratio was determined between 0.83-1.13 and the average value was found 0.97 ± 0.07. Within the scope of chemical analyzes, the total phenolic substance amounts were detected by the UV-Vis Spectrometer. It has been found in the range values were 98.96 ± 0.02 mgGAE / kg - 330.96 ± 0.02 mgGAE / kg (average 143.46 ± 0.21 mgGAE / kg). The determination of the volatile components of Tunceli province honey samples were carried out by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) device. As a result of the analysis; compounds belonging to the compound groups of aldehydes, aliphatic acid and esters, alcohols, hydrocarbons, carboxylic acids and esters, ketones, terpenes, fatty acids and esters have been identified. Among these groups, compounds belonging to the groups of carboxylic acids and esters, fatty acids and esters have been found in high rates.

Conclusion: This study has contributed to the scientific evaluation of honey produced in Tunceli province from a scientific point of view, and contribute to the planned geographical indication study regarding both the regional beekeeping and the country's economy and local honey.

GİRİŞ

Bal, bal arıların çeşitli çiçeklerden topladığı nektarın, fiziksel ve kimyasal değişime uğratılmasından sonra petek gözlerine depoladıkları tatlı, koyu kıvamlı bir besin maddesidir (Kaftanoğlu 2010). Balın fiziksel ve kimyasal özellikleri, bitkisel kökenindeki farklılıklardan, iklim koşulları ve çevresel faktörler ile arıcılık yöntemlerinden etkilenebilmektedir (Sorkun 2008). Balın bileşenlerini su, protein, karbonhidratlar, mineral maddeler, aminoasitler, çeşitli vitaminler, organik asitler ve enzimler oluşturmaktadır (White ve Winters 1989).

Bitki kaynağına, üretim ve pazarlama metotlarına göre değişik şekil ve görünüşte olan balların kaliteleri arasında da farklar mevcuttur. Bal kalitesinin

belirlenmesi yalnızca tek bir parametre ile değil, birçok parametrenin incelenmesi ile gerçekleşmektedir (Balcı 1978).

Balda yapılan mikroskopik analiz ile o balı oluşturan bitkilerin coğrafik ve botanik kökeni, polen yoğunluğu ve yabancı maddelerin bulunup bulunmadığı saptanmaktadır. Balın kalitesinin belirlenmesinde önemli bir parametre olan polen analizi, balın, fermantasyonu (Russmann 1998), tağşişi (Kerkvliet v.d. 1995), nişasta tanesi içerip içermediği (Sorkun 2002) ve mineral tozlar gibi kontaminasyonla bala bulaşan ve balda bulunmaması gereken mikroskopik partiküller hakkında önemli bilgiler vermektedir (Louveaux v.d. 1978). Mikroskopik analiz sonucu belirlenen, bal içerisindeki polenlerin yoğunluğu %16-44 arasında ise sekonder, %3-15 arasında ise minör ve %3'ten küçük ise eser olarak bildirilmektedir. Hangi bitki poleni yüzdesi 45'den çok ise bal o bitkinin ismi ile anılmaktadır (Sorkun 2008).

Belirgin bir niteliği, ünü veya diğer özellikleri itibarıyla kökenin bulunduğu bir yöre, alan, bölge veya ülke ile özdeşleşmiş bir ürünü gösteren ad veya işaretler "coğrafi işaret" olarak nitelendirilmektedir (Türk Patent ve Marka Kurumu, 2021). Son yıllarda gıda ürünlerinin kalitesini ortaya çıkarmak ve bölgelere özgü ürünleri koruma altına almak amacıyla "coğrafi işaret" çalışmalarına önem verilmiştir. Özellikle, içeriği bölgeden bölgeye değişen bir gıda olan balın "coğrafi işaret"inin alınması balın kalitesinin ortaya çıkması ve sahtecilikten korunması açısından oldukça faydalıdır. Balın "coğrafi işaret"inin alınmasında bitkisel ve kimyasal özelliklerinin tespiti gereklidir. Balların bitkisel orijinlerinin tayininde mikroskopik olarak içerisinde bulunan polenlerinin incelenmesine dayanan melissopalnolojik analiz önem arz etmektedir. Buradaki temel prensip balın kökenini dolaylı yoldan tespit etmektir. Balların üretimi sırasında arıların ziyaret ettiği bitkileri belirlemek için bal içindeki bitki polenlerinin tanımlanması yapılmaktadır (Sorkun 2008). Kimyasal analizler ile de hem balın kalitesi hem de üretim yapılan bölgeye özgü kaynaklardan köken alan çeşitli bileşiklerin tespiti yapılabilmektedir. Günümüzde bal ile ilgili en önemli problemlerden biri bu alanda yapılan hilelerdir. Yapılan yanlış uygulamaların başında arının şeker şurubu ile beslenmesi veya bala invert şeker şurubu, yüksek früktozlu mısır şurubu, glikoz şurubu, sakkaroz şurubu gibi çeşitli şeker şuruplarının ilave edilmesi gelmektedir. Şekerli ballar arıların şeker şurubuyla beslenmeleri neticesinde elde edilen ballar olup arı çiçeğin nektarı yerine hemen kovanın önüne

konmuş olan şeker şurubundan katkılı bal imal etmektedir. Bu şekilde üretilen ballar doğada var olan çiçeklerin özünü ve çiçekten gelen doğal kimyasal özellikleri taşımamaktadır (Sunay 2010). Bu nedenle, tüketilen balın doğal olup olmadığının bilinmesi adına balın saflığının tespiti oldukça önem taşımaktadır ve bu amaçla balda “coğrafi işaret” alınması talebi günden güne artmaktadır.

Tunceli ili Türkiye'nin doğusunda, İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde, Anadolu diyagonalinin üzerinde ve Davis'in (Davis 1965) kare sistemine göre B7 karesinde yer almaktadır (Yüce Babacan v.d. 2017). Coğrafik özellikleri, iklim farklılıkları ve zengin su kaynaklarından dolayı çok zengin biyolojik çeşitlilik göstermektedir. Bölgede çok sayıda dağ (Sultanbaba, Munzur, Hel-Yel-Zel, Buyerbaba, ve Düzgünbaba), ırmak (Munzur, Pülümür, Mercan, Tahar, ve Perisuyuve) ve vadi (Munzur, Pülümür, Rabat, Tahar, ve Mercan) bulunmaktadır. Bölgenin en yüksek dağı, Munzur Dağları'nın doğusunda bulunan ve 3463 metre yükseklikteki Akbaba Tepesi'dir. Güneyden kuzeye ve batıdan doğuya yükselen il topraklarının %70'ini dağlar, %25'ini platolar, %5'ini ovalar ve düzlükler oluşturmaktadır (Tunceli ili coğrafyası 2016).

Doğu Anadolu Orman Kuşağı içinde kalan bölgeler genelde meşe ormanlarından oluşur. Güney yamaçların daha alçak kesimlerde yer yer meşe ve ardıç topluluklarına rastlanmaktadır. Vadilerde ve akarsu kenarlarında meşe ormanlarının yanı sıra ardıç, gürgen, dişbudak, akağaç, karaağaç, kızılğaç, huş, ceviz, söğüt, kavak ve çınar ağaçlarından oluşan zengin bir bitki örtüsü bulunmaktadır. Platolarda ise bitki örtüsü genellikle tek veya çok yıllık, çayır bitkilerinden oluşmaktadır (Tunceli ili coğrafyası 2016).

Tunceli ilinin zengin florasının en önemli bölgesi Munzur vadisidir (Yıldırım 1995). Munzur Vadisi, Tunceli-Ovacık arasında, 42.000 hektarlık bir alan 1971 yılında Milli Park olarak ilan edilmiştir. Bitki örtüsü bakımından çok zengin olan Munzur Vadisi Milli Parkı florasında, 1000'den fazla bitki türü kayıtlı olup bunlardan 45 tür Munzur Dağlarına, 228 tür Türkiye'ye endemik türlerden oluşmaktadır (Davis 1965, 1967, 1970, 1972, 1975, 1978, 1982, 1984, 1985, Davis v.d.1988, Güner v.d. 2012, Yıldırım 1995, Yüce Babacan ve Eker 2017).

Yüce Babacan v.d. (2017) göre Tunceli ilinde 55 familyaya ait, 203 cins ve 336 takson tespit edilmiştir. Tunceli'nin sahip olduğu zengin bitki çeşitliği, arıcılık ve bal üretimine değer sağlayacak çok değerli bir

kaynak niteliğindedir. Zengin bitki örtüsü sayesinde Tunceli ilindeki kovan başına bal veriminin Türkiye ortalamasının üzerinde olduğu bildirilmiştir (Işık 2012).

Arıcılık, bitki örtüsünün elverişli olması ve ekonomik giderinin çok fazla olmaması nedeniyle kırsal kalkınmada en önemli gelir kaynaklarından birisidir. Yapılan bu çalışma ile ülke arıcılığı için önemli bir yer teşkil eden Tunceli ilinde üretilen balların karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup, hem bölge arıcılığına, hem de buna bağlı olarak ülke ekonomisine ve yöre balı ile ilgili olarak yapılması planlanan coğrafik işaret çalışmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bal örneklerinin toplanması ve arazi çalışması

Çalışmada kullanılan 32 adet süzme bal örneği, Tunceli Arı Yetiştiricileri Birliği'nin yardımlarıyla Çemişgezek, Hozat, Merkez, Nazimiye, Ovacık, Pertek ve Pülümür ilçelerinde bulunan sabit arıcılardan toplanmıştır (Şekil 1).

Bölgedeki çiçeklenme sezonu göz önünde bulundurularak yapılan arazi çalışmalarıyla, farklı yörelerdeki arılıklar ziyaret edilmiş, il içerisinde doğal olarak yayılış gösteren bitkilerden arılar için nektar ve/ya polen kaynağı olabilecek olanlar toplanmıştır. Toplanan örnekler taksonomik olarak değerlendirilmiş ve melissopalinojenik analizlerde faydalanmak üzere, toplanılan bitkilerden referans polen preparatları hazırlanmıştır.

Referans Bitki Preparatlarının Hazırlanması

Balda yapılan polen analizlerinde bahsi geçen bitkiler ile bal içerisinde tespit edilen polenlerin kıyaslanabilmesi adına toplanan bitkilerden referans polen preparatları Wodehouse (1935) metoduna göre yapılmıştır. Lam üzerine çiçeğin anterlerinden bir miktar polen konularak birkaç damla alkol ile fikze edilmiştir. Steril diseksiyon iğnesi ucuna alınan bir miktar (1-2 mm³) bazik fuksinli gliserin-jelatin lam üzerindeki polen üzerine konulmuş ve lam, ısıtma tablasında 30-40°C'de ısıtılarak bazik fuksinli gliserin-jelatinin erimesi sağlanmıştır. Üzerine 18x18 mm²'lik lamel kapatılarak preparat ters çevrilmiştir. Preparatlar yaklaşık 12 saat sonra incelenmeye hazır hale gelmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Melissopalinojik Analizler

Balların bitkisel kökeninin tespiti için ve baldaki toplam polen sayısı (TPS) için preparatlar hazırlanmıştır (Moar 1985, Sorkun 2008). Balların bitkisel orijini için stok baldan 10 gr alınarak üzerine 20 ml distile su ilave edilmiştir. 45°C'lik su banyosunda bekletilerek balın su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 3500 rpm'de 45 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı dökülmüştür. Dipte kalan kısımdan bazik fuksinli gliserin-jelatin ile preparat hazırlanmıştır. Baldaki toplam polen sayısı için ise stok baldan 10 g alınarak üzerine 20 ml distile su ilave edilmiştir. İçerisine şahit olarak bir tanesinde 9666 adet *Lycopodium* sp. sporu bulunan tablet atılmış ve 45C°'lik su banyosunda bekletilmiştir. Tablet iyice eridikten sonra polenlerin ve sporların

boyanmasını sağlayan birkaç damla bazik fuksin ilave edilerek 3500 rpm'de 45 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı dökülmüştür. Dip kısmı kalan tüpün içerisine 0,1 ml kadar %50'lik gliserin ilave edilerek dipteki çökeltinin gliserin ile homojen bir biçimde karışması sağlanmıştır. Bu karışımdan pipetle 0,01 ml alınarak, 0,09 ml %50'lik gliserin konulmuş başka bir tüpe aktarılmıştır. Bu tüpteki çözeltiden 0,01 ml alınarak, lam üzerine konulmuş ve üzerine lamel kapatılarak, mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar, Nikon Eclipse E400 marka mikroskopta incelenmiş olup 18x18 mm'lik alan tamamen taranmıştır. Bu alanda bulunan tüm polenler ve *Lycopodium* sp. sporları nicelik olarak tespit edilmiştir. Sayılan spor ve polenlerden Toplam Polen Sayısı (TPS) bulunmuştur.



Şekil 1. Tunceli il haritası (<http://www.resimle.net/resim4363.html>)

Figure 1. Tunceli city map (<http://www.resimle.net/resim4363.html>)

Nem Analizi

Balların nem miktarı, Bogdanov (1997) ve Devillers v.d. (2004)'nin uyguladığı metoda göre refraktometre cihazı ile ölçülmüştür. Yaklaşık 1 gr bal, refraktometrenin cam bölmesine konulmuş ve nemin miktarı mercekli kısımdan bakılarak % olarak ifade edilmiştir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Cihazı ile Şeker Analizi

Yüksek oranlardaki şeker içeriğinden dolayı balın şeker profili, farklı türdeki balların ayırımında uygun kalite kriterlerinden biridir. Buna bağlı olarak baldaki şeker içeriğinin ve oranlarının tespiti Uluslararası Bal Komisyonu'nun (Bogdanov, 2002) belirlediği yöntem dahilinde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapılmıştır. Buna göre 5 gram bal örneği, 40 ml damıtık suda çözülmüştür. Çözelti içine 25 ml metanol konularak çözelti damıtık su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Tüm örnekler 0,45 µm'lik filtrelerden süzülerek akış hızı 1,3 ml/min, kolon sıcaklığı 30°C, enjeksiyon hacmi 50 µl ve asetronitril/su oranı 80 ml/20 ml olan hareketli fazdaki HPLC (Agilent 1200 Series- RID Dedektör ve parçacık büyüklüğü 5µm olan karbonhidrat çelik kolon) cihazına enjekte edilerek sonuçlar bulunmuştur.

UV-Vis Spektrofotometre Cihazı ile Toplam Fenolik Madde Miktarının Tayin Edilmesi

Aromatik karbonik asitler olarak da bilinen fenolik asitler balda temel antioksidant etki gösteren fitokimyasallardır. Ballarda Total Fenolik Asit miktarını bulabilmek için izlenen yöntem Hoerudin 2004 ve Özkök v.d. 2010 metotlarına göre yapılmıştır. Buna göre, 25 mg Gallik asit 100 ml %70'lik metanolde çözülerek stok hazırlanmıştır. Bu stoktan 0, 25, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlar hazırlanmış ve 10 ml'lik hazırlanan konsantrasyonlar %70'lik metanolle seyreltilerek standartlar hazırlanmıştır. Her bal örneğinden 5 g alınarak 50 ml %70'lik metanolde çözülmüştür. Hem bal örneklerinden hem de hazırlanan standartlardan 1'er ml alınarak test tüpüne konulmuştur. Üzerine 5 ml %10'luk Folin Ciocalteu ayırıcı konularak, vorteks ile karıştırılmıştır. Üç dakika sonra, 8 dakika içinde 4 ml

75 g/l Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 1 dakika karıştırılmış ve 45°C'deki su banyosu içerisinde 15 dakika bekletilerek inkübe edilmiştir. Örnekler, standartlar ve referanslar 765 nm'de UV Spektrofotometrede okunmuş ve standartların grafikleri çizilmiştir. Buradaki değerden GAE (Gallik asit) değeri bulunmuştur.

Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Cihazı ile Kimyasal Bileşen Tayini

Bal örneklerinin GC-MS ile kimyasal madde analizi, Barcarola v.d. (1998); Radovic v.d. (2001); Soria v.d. (2003); Cuevas-Glory v.d. (2007)'nin uyguladığı metotlarda değişiklik yapılarak uygulanmıştır. Buna göre; cam bir tüpe 5 g bal örneği tartılmış ve üzerine 25 ml metanol ilave edilmiştir. Bu karışım bir süre bekletildikten sonra 3500 rpm de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki süpernatant kısmından 1 µl çekilerek GC-MS'e enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Agilent marka 5973N Seçimli Kütle Dedektörlü, 6890N Network GC Sistemi (GCMS) kullanılarak analiz yapılmış olup DB 5MS Kolon (30 m x 25 mm ve 0,25 µm film kalınlığı) kullanılmıştır. Gaz kromatografisi kısmında sıcaklık 1 dakika 50°C'de tutulup sonra 10°C/dak. artış hızı ile 150°C'ye yükseltilmiş ve bu periyottan sonra 150°C'de 2 dakika tutulmuştur. En son olarak sıcaklık dakikada 20°C/dak. artış hızı ile 280°C'ye yükseltilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 280°C ve süre 49,5 dakika olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Melissopalinojistik Analiz Sonuçları

Her ilçeden gelen 32 bal örneğinin, 10 gr'daki toplam polen sayıları (TPS₁₀) ve polen içeriklerinin ortalama değerleri ayrı ayrı hesaplanmış ve sonuçlar ilçeler bazında Tablo 1, 2 ve 3'te verilmiştir.

Tunceli ballarında TPS₁₀ oranı minimum 3662 (859-T8), maksimum 845775 (858-T7) ve ortalama 87126.91 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Çalışmada ayrıca balların botanik orijinleri ve polen spektrumları belirlenmiş olup Tablo 2 ve 3'te gösterilmiştir. Bu analizler kapsamında, yöre ballarının bitkisel kaynağı olabilecek 31 familyaya ait 80 takson tespit edilmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1. Tunceli bal örneklerinin TPS₁₀ değerleri
Table 1. TPN₁₀ values of Tunceli honey samples

İLÇE	BAL NO	TPS ₁₀	TPS ₁₀ Bal Kalitesi*
KIRKMEŞE KÖYÜ/PÜLÜMÜR	852 (T1)	15661	Düşük
ÇEMİŞGEZEK	853 (T2)	77328	Normal
KARACA/HOZAT	854 (T3)	28300	Normal
HOZAT-MERKEZ	855 (T4)	107852	Zengin
MERKEZ	856 (T5)	7609	Düşük
EĞRİYAMAÇ KÖYÜ/MERKEZ	857 (T6)	5087	Düşük
MERKEZ	858 (T7)	845775	Çok zengin
BURMAGEÇİT KÖYÜ/MERKEZ	859 (T8)	3662	Düşük
MERKEZ	860 (T9)	84763	Normal
MERKEZ	861 (T10)	93080	Normal
MERKEZ	862 (T11)	200150	Zengin
ÇILGA KÖYÜ/MERKEZ	863 (T12)	95160	Normal
YAYIKOL KÖYÜ/NAZİMİYE	864 (T13)	112857	Zengin
NAZİMİYE	865 (T14)	139980	Zengin
NAZİMİYE	866 (T15)	33754	Normal
OVACIK	867 (T16)	97433	Normal
OVACIK	868 (T17)	41218	Normal
OVACIK	869 (T18)	17349	Düşük
OVACIK	870 (T19)	49046	Normal
OVACIK	871 (T20)	8234	Düşük
OVACIK	872 (T21)	37996	Normal
OVACIK	873 (T22)	230327	Zengin
OVACIK	874 (T23)	22540	Normal
OVACIK	875 (T24)	254830	Zengin
OVACIK	876 (T25)	5091	Düşük
OVACIK	877 (T26)	12261	Düşük
OVACIK	878 (T27)	101052	Zengin
PERTEK	879 (T28)	18588	Düşük
PÜLÜMÜR	880 (T29)	7249	Düşük
PÜLÜMÜR	881 (T30)	7444	Düşük
PÜLÜMÜR	882 (T31)	18754	Düşük
PÜLÜMÜR	883 (T32)	7631	Düşük
Ortalama Sonuç	-	87126.91	-

* < 20000: Düşük kalitede ballar, 20 bin-100 bin: Normal ballar, 100 bin-500 bin: Zengin ballar, 500 bin- 1 milyon: Çok zengin ballar, > 1 milyon: Katkılı ballar (Louveaux v.d. 1978, Feller-Demalsy v.d. 1989)

Tablo 2. 1-16 nolu Tunceli bal örneklerinin botanik orijinleri ve polen spektrumları

Table 2. Botanical origin and pollen spectra of Tunceli honey samples between 1 and 16.

TaksonNo	Bitki familyası	Bitki taksonu	Bal No																
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	
1	Acanthaceae	<i>Acanthus dioscoridis</i> L.																	E
2				E															E
3									M										E
4	Apiaceae	<i>Eryngium</i> L. sp.																	
5		<i>Turgenia</i> Hoffm. sp.																	
6		<i>Anthemis tricomis</i> Eig.	S	E	M	E													S
7		<i>Aster</i> L. sp.						M											
8		<i>Carduus</i> L. sp.										E							E
9		<i>Cichorium intybus</i> L.		E		E						E		E	E	E	E		
10		<i>Cirsium pubigerum</i> (DESF.) DC.	E			E						E							
11	Asteraceae	<i>Centaurea aggregata</i> Fisch. et Mey. ex DC.										E							M
12		<i>Centaurea urvillei</i> DC.											E						
13		<i>Centaurea</i> L. sp.							E										E
14		<i>Helianthus annuus</i> L.																	
15		<i>Inula montbretiana</i> DC.		E															M
16		<i>Senecio vernalis</i> Waldst. et Kit.																	
17	Berberidaceae	<i>Berberis crataegina</i> DC.																	
18		<i>Anchusa azurea</i> Miller		E															
19	Boraginaceae	<i>Echium italicum</i> L.				E													M
		<i>Myosotis</i> L. sp.																	

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TaksonNo	Bitki familyası	Bitki taksonu	Bal No															
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
20		<i>Paracaryum cristatum</i> (Schreber) Boiss.							E			E			E		E	
21	Brassicaceae										E			E			E	
22	Campanulaceae	<i>Campanula glomerata</i> L.		M								E						
23		<i>Campanula latifolia</i> L.		M										E		E		
24	Caryophyllaceae							E						E		E		
25	Chenopodiaceae													E		E		
26	Cistaceae					M												
27	Dipsacaceae	<i>Cephalaria procera</i> Fisch. et Lall.									E							E
28		<i>Scabiosa calocephala</i> Boiss.												E		E	M	
29																		
30		<i>Astragalus</i> L. sp.	M	M	S	M		S	S	M	S			M	M	M	M	M
31		<i>Coronilla orientalis</i> Miller	M															
32		<i>Coronilla varia</i> L.		M	M	E	M	M	E	S	M	M	M		E		M	M
33		<i>Ebenus laguroides</i> Boiss				E	M							E				
34	Fabaceae	<i>Hedysarum varium</i> Willd.				E					E	M	E	E	M	E	M	
35		<i>Onobrychis oxyodonta</i> Boiss.	E	E		M	M						E	E	E		E	
36		<i>Lotus corniculatus</i> L.	M			E						E	E	M	E		E	
37		<i>Medicago sativa</i> L.	M	E					M			E	E	M	E		E	
38		<i>Melilotus alba</i> Desr.			M						E							
39		<i>Trifolium pratense</i> L.	M		E	M		S	E	M		E		E	M		M	
40		<i>Trifolium repens</i> L.								M					E	M	E	E
41	Geraniaceae					E											E	S
42	Hypericaceae	<i>Hypericum scabrum</i> L.	E	S	E	M			M		M		M	M	S	M	D	M
43		<i>Phlomis pungens</i> Willd.								E								
44		<i>Prunella vulgaris</i> L.		M													E	
45		<i>Salvia</i> L. sp.				E									E		E	
46	Lamiaceae	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	E			E					M		E	E				
47		<i>Teucrium polium</i> L.				E			M			E						
48		<i>Teucrium</i> L. sp.					S											
49		<i>Thymus kotschyanus</i> Boiss. et Hohen.	E	M					M	E		E	E	E	M	E	E	
50	Liliaceae	<i>Allium</i> L. sp.										E		E	E	E	E	
51	Onagraceae	<i>Epilobium hirsutum</i> L.											E	S	M	E	M	E
52	Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	M	S		S	S			M		E	E	S	S	E	M	
53	Poaceae					E				E		E	E	E			E	E
54	Polygonaceae	<i>Rumex</i> L. sp.		E														
55	Rhamnaceae	<i>Paliurus spina-christi</i> Miller													E			
56									M									
57		<i>Malus</i> Miller sp.												E				
58	Rosaceae	<i>Potentilla argentea</i> L.	E	E	S	E		M	M	M	M		E	E	E		E	
59		<i>Potentilla inclinata</i> Vill.	M		M	E			E		E							E
60		<i>Sanguisorba minor</i> Scop.		E	E	M				E		M	M	M	E	E	E	E
61	Rubiaceae	<i>Galium verum</i> L.		E		E				E				E				E
62	Salicaceae	<i>Salix</i> L. sp.	E		E	E	M				E	E	E				M	E
63		<i>Verbascum</i> L. sp.	S									E						E
64	Scrophulariaceae	<i>Veronica anagalloides</i> Guss.				E												E
65	Taxaceae	<i>Taxus baccata</i> L.												E				
66	Tiliaceae	<i>Tilia</i> L. sp.			E													

* ≥%45 Dominant (D), (%16-44) Sekonder (S), (%3-15) Minör (M), (<%3) Eser (E)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 3. 17-32 nolu Tunceli bal örneklerinin botanik orijinleri ve polen spektrumları
Table 3. Botanical origin and pollen spectra of Tunceli honey samples between 17 and 32

Takson No	Bitki familyası	Bitki taksonu	Bal No																	
			T1 7	T1 8	T1 9	T2 0	T2 1	T2 2	T2 3	T2 4	T2 5	T2 6	T2 7	T2 8	T2 9	T3 0	T3 1	T3 2		
1			M		M															
2	Apiaceae	<i>Eryngium</i> L. sp.												E				E	E	
3		<i>Turgenia Hoffm</i> sp.																		
4													S	E						
5		<i>Anthemis</i> L. sp.					E												M	M
6		<i>Carduus</i> L. sp.	E	M		M		E		E							M	M		
7		<i>Carthamus</i> L. sp.																E		
8		<i>Cichorium intybus</i> L.	M		E					E							E			
9	Asteraceae	<i>Centaurea grandifolia</i> Gand.															M			
10		<i>Centaurea</i> L. sp.		E										E					E	
11		<i>Helianthus annuus</i> L.																	M	
12		<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Schultz Bip.	S																	
13		<i>Taraxacum Wiggers.</i> sp.			E															
14	Berberidaceae	<i>Berberis crataegina</i> DC.				S	M	D	D	E		M				M	M	E	M	
15	Betulaceae				E			E		E										
16																			M	
18		<i>Cerithe minor</i> L.																	E	
19	Boraginaceae	<i>Heliotropium</i> L. sp.				E	E	E	E	E				E						
20		<i>Paracaryum cristatum</i> (Schreber) Boiss.	S	D	S	S	D	S		D	M	S	D	D	E			S	M	
21	Brassicaceae	<i>Brassica</i> L. sp.			E	E				E										
22	Campanulaceae	<i>Campanula glomerata</i> L.	M	E		E					M									
23		<i>Campanula</i> L. sp.								E				M						
24	Caryophyllaceae			E															E	M
25	Chenopodiaceae												E							
26	Cistaceae		E	E		M			M											
27		<i>Helianthemum ledifolium</i> (L.) Miller			S	E		E		E	M	E	E	M	M	E	M			
28	Cyperaceae	<i>Carex ovalis</i> Good.				E														
29				E	M							E			M					
30		<i>Astragalus</i> L. sp.	E	E	E	E	E	E	E		M		E		M	E				
31		<i>Cicer</i> L. sp.													M		M	E	M	
32	Fabaceae	<i>Hedysarum varium</i> Willd.															M	M		
33		<i>Onobrychis oxyodonta</i> Boiss.	M								E	E			M	E	S	E	M	
34		<i>Onobrychis Adans.</i> sp.		E						E										

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Takson No	Bitki familyası	Bitki taksonu	Bal No															
			T1 7	T1 8	T1 9	T2 0	T2 1	T2 2	T2 3	T2 4	T2 5	T2 6	T2 7	T2 8	T2 9	T3 0	T3 1	T3 2
35		<i>Lotus corniculatus</i> L.	E		E		M							M	E			S
36		<i>Medicago sativa</i> L.													E			
37		<i>Trifolium campestre</i> schreb.								E								
38		<i>Trifolium repens</i> L.	M	E	M	M		M		E	M	M	E	M	S		M	M
39		<i>Trifolium</i> sp.						E								M		
40		<i>Salvia</i> L. sp.								E				E				M
41		<i>Salvia tomentosa</i> Miller		M														
42		<i>Stachys</i> sp.								E								
43	Lamiaceae	<i>Teucrium chamaedrys</i> e	E	M											M		E	M
44		<i>Teucrium orientale</i>	E										E	M				
45		<i>Teucrium polium</i>	E		E		M				E	M	E				E	
46		<i>Thymus kotschyanus</i>	M					E		E	E		E	M		M	M	
47			M		E	E												
48	Liliaceae	<i>Allium</i> L. sp.								E			E	E		M	E	
49	Myrtaceae		E													E		
50	Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	E		S	M	E		S	M	M	M	M	E		E	E	
51	Poaceae				E	E		E						E	M			M
52		<i>Rumex</i> sp.			E				E					E				
53	Polygonaceae	<i>Rumex acetosella</i> L.								E								
54															E			
55	Ranunculaceae	<i>Ranunculus</i> L. sp.		E		E												
56	Rhamnaceae												E					E
57			E	M	E		E		E	E	M	E	E		M	M		
58		<i>Malus</i> sp. Miller.																
59	Rosaceae	<i>Potentilla argentea</i> L.				E												
60		<i>Rosa</i> L. sp.												E			E	
61		<i>Sanguisorba minor</i> Scop.							E	M			E				E	
62	Rubiaceae	<i>Galium</i> L. sp.	E							E		E				E		
63	Salicaceae	<i>Salix</i> L. sp.	M		E	M								E	M			

* ≥%45 Dominant (D), (%16-44) Sekonder (S), (%3-15) Minör (M), (<%3) Eser (E)

Kimyasal Analiz Sonuçları

Her ilçeden gelen 32 bal örneğinin, nem, Früktoz/Glikoz ve toplam fenolik madde miktarı değerleri Tablo 4'de verilmiştir. 32 adet bal örneğinin GC-MS ile kimyasal bileşen sonuçları ise Tablo 5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tunceli ballarında fiziksel analiz olarak % nem oranına bakılmıştır. Çalışmada 32 bal örneğinde minimum nem oranı %12,8, maksimum %16,8 ve ortalama %15,51 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4). Tunceli ballarında kimyasal analiz olarak şeker (früktoz ve glikoz) ve total fenolik oranına bakılmıştır. Çalışmada, früktoz değerleri 25,97-43,44 g/100g aralığında (ortalama: 32,28±3,32 g/100g), glikoz

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

değerleri; 21,84-45,6 g/100g aralığında (ortalama: 33,04±5,22 g/100g) olduğu tespit edilmiştir. F/G oranı minimum 0,83, maksimum 1,13 ve ortalama 0,97 olarak bulunmuştur (Tablo 4). Tunceli

ballarında toplam fenolik içeriği ise minimum 98,96±0,02 mgGAE/kg, maksimum 330,96±0,02 mgGAE/kg ve ortalama 143,46±0,21 mgGAE/kg olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Tunceli bal örneklerinin kimyasal analiz sonuçları
Table 4. Chemical analysis results of Tunceli honey samples

İLÇE	BAL NO	Nem (%)	Früktoz (g/100g)	Glikoz (g/100g)	Früktoz/Glikoz	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mgGAE/kg)
KIRKMEŞE						
KÖYÜ/PÜLÜMÜR	852 (T1)	15.6	31.38	33.35	0.94	149.02±0.03
ÇEMİŞGEZEK	853 (T2)	14.6	43.44	45.6	0.93	120.06±0.12
KARACA/HOZAT	854 (T3)	14.9	39.742	42.70	0.9	106.19±0.02
HOZAT-MERKEZ	855 (T4)	15.1	33.29	39.16	0.85	123.80±0.15
MERKEZ	856 (T5)	14.9	33.14	34.34	0.96	174.00±0.03
EĞRİYAMAÇ						
KÖYÜ/MERKEZ	857 (T6)	16.0	32.68	33.59	0.97	125.79±0.03
MERKEZ	858 (T7)	14.9	35.47	42.50	0.83	99.63±0.01
BURMAGEÇİT						
KÖYÜ/MERKEZ	859 (T8)	16.4	34.51	36.77	0.93	330.96±0.02
MERKEZ	860 (T9)	16.4	35.28	37.21	0.94	132.03±0.04
MERKEZ	861 (T10)	16.8	32.33	34.12	0.94	134.34±0.02
MERKEZ	862 (T11)	14.8	33.93	38.22	0.88	98.96±0.02
ÇILGA						
KÖYÜ/MERKEZ	863 (T12)	12.8	35.44	36.61	0.96	183.65±0.06
YAYIKOL						
KÖYÜ/NAZİMİYE	864 (T13)	16.8	31.39	33.22	0.94	130.18±0.07
NAZİMİYE	865 (T14)	15.2	34.21	35.73	0.95	141.72±0.05
NAZİMİYE	866 (T15)	15.6	33.49	35.06	0.95	154.39±0.03
OVACIK	867 (T16)	15.4	30.40	33.42	0.90	103.88±0.04
OVACIK	868 (T17)	16.7	31.37	29.44	1.0	128.57±0.04
OVACIK	869 (T18)	15.8	31.94	30.14	1.0	157.99±4.67
OVACIK	870 (T19)	14.6	31.37	29.44	1.0	127.61±0.03
OVACIK	871 (T20)	15.8	31.07	31.69	0.98	113.59±0.05
OVACIK	872 (T21)	15.3	30.28	31.09	0.97	102.19±0.02
OVACIK	873 (T22)	16.6	30.84	30.00	1.02	131.20±0.09
OVACIK	874 (T23)	15.3	30.70	28.35	1.08	127.43±0.03
OVACIK	875 (T24)	16.6	29.81	29.80	1.00	101.53±0.09
OVACIK	876 (T25)	15.4	30.84	29.01	1.06	118.13±0.03
OVACIK	877 (T26)	14.9	32.29	37.25	0.86	135.51±0.01
OVACIK	878 (T27)	15.4	31.13	28.38	1.09	131.66±0.04
PERTEK	879 (T28)	15.2	30.50	29.17	1.04	210.67±0.02
PÜLÜMÜR	880 (T29)	15.8	25.97	24.84	1.04	124.47±0.01
PÜLÜMÜR	881 (T30)	14.8	28.37	25.57	1.10	262.52±0.91
PÜLÜMÜR	882 (T31)	16.6	27.67	24.35	1.13	137.88±0.04
PÜLÜMÜR	883 (T32)	15.4	28.80	27.33	1.05	171.17±0.05
Ortalama Sonuç	-	15.51±0.84	32.28±3.32	33.04±5.22	0.97±0.07	143.46±0.21

Tunceli ballarında uçucu bileşenlerin tayinine Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) cihazı ile bakılmıştır. Yapılan analiz sonucunda ballarda aldehidler, alifatik asit ve esterleri, alkoller,

hidrokarbonlar, karbolik asit ve esterleri, ketonlar, terpenler, yağ asidi ve esterleri bileşik gruplarına ait bileşikler tespit edilmiştir (Tablo 5,6).

Tablo 5. 1-16 nolu Tunceli bal örneklerinin GC-MS kimyasal bileşen sonuçları

Table 5. GC-MS chemical compound results of Tunceli honey samples between 1 and 16

Bileşikler	852 (T1)	853 (T2)	854 (T3)	855 (T4)	856 (T5)	857 (T6)	858 (T7)	859 (T8)	860 (T9)	861 (T10)	862 (T11)	863 (T12)	864 (T13)	865 (T14)	866 (T15)	867 (T16)
Aldehidler	1.83	1.06	0.04	0.13	0.00	0.32	0.00	0.03	4.39	0.25	0.56	0.21	0.00	0.68	4.37	6.49
Alifatik asit ve esterleri	13.83	6.09	6.04	3.2	4.32	5.51	9.79	9.79	4.82	4.29	3.66	3.55	16.5	6.93	4.75	13.74
Alkoller	2,00	3,56	2,88	1,55	4,88	2,89	2,82	0,15	3,55	1,19	0,31	2,29	2,98	0,00	2,4	3,04
Hidrokarbonlar	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44	0.00	0.15
Karboksilik asit ve esterleri	26.27	23.85	49.85	41.61	37.46	62.28	51.43	35.91	47.68	48.84	38.41	33.44	18.27	19.12	50.85	38.97
Ketonlar	23.10	1.91	1.16	8.88	12.77	2.92	9.21	6.58	2.88	1.77	22.77	24.35	13.74	7.13	5.22	13.84
Terpenler	11.45	7.4	0.77	7.26	6.29	6.14	6.43	10.62	10.33	7.95	7.64	8.03	4.91	8.22	5.92	6.88
Yağ asitleri ve esterleri	14.73	18.46	12.18	20.72	19.95	14.03	18.06	24.72	17.85	13.78	13.6	9.17	33.38	22.79	7.83	8.93

Tablo 6. 17-32 nolu Tunceli bal örneklerinin GC-MS kimyasal bileşen sonuçları

Table 6. GC-MS chemical compound results of Tunceli honey samples between 17 and 32

Bileşikler	868 (T17)	869 (T18)	870 (T19)	871 (T20)	872 (T21)	873 (T22)	874 (T23)	875 (T24)	876 (T25)	877 (T26)	878 (T27)	879 (T28)	880 (T29)	881 (T30)	882 (T31)	883 (T32)
Aldehidler	0.92	4.38	1.98	1.63	10.20	2.73	2.27	3.05	2.65	7.53	4.27	5.35	2.50	15.03	7.69	0.12
Alifatik asit ve esterleri	9.70	1.61	1.22	2.55	5.33	18.10	8.93	5.01	6.92	0.73	0.00	42.24	3.46	0.00	0.00	0.00
Alkoller	1.68	0.73	2.31	3.89	10.68	4.46	1.05	8.55	5.03	5.68	0.00	3.60	4.68	0.00	0.00	21.69
Hidrokarbonlar	0.12	2.22	2.77	0.00	1.42	0.00	0.00	0.56	4.54	0.00	0.00	6.23	2.99	0.00	0.00	2.83
Karboksilik asit ve esterleri	52.47	12.77	44.48	49.34	18.29	34.95	45.77	25.28	41.08	41.70	2.33	9.80	31.47	0.00	0.00	7.67
Ketonlar	1.79	47.73	9.10	5.77	14.76	17.53	5.07	11.21	5.47	1.95	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Terpenler	4.07	5.5	9.38	6.19	0.00	2.95	8.06	6.36	3.88	4.93	0.00	0.00	4.20	0.00	0.00	0.00
Yağ asitleri ve esterleri	18.95	14.43	22.37	16.58	9.48	9.69	23.60	11.94	23.47	30.05	79.04	0.00	15.58	64.22	66.75	5.18

TARTIŞMA

Türkiye, coğrafik konumu ve sahip olduğu doğal bitki türü çeşitliliği nedeniyle Dünya ülkelerine kıyasla arıcılık konusunda oldukça avantajlı durumdadır. Fakat yapılan çalışmalar ve istatistiksel veriler ülkemizin bal verimi konusunda yeteri kadar iyi olmadığını ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada uluslararası bal standartları dahilinde geçerli teknikler kullanılmış olup Tunceli ballarının botanik haritası, bileşimi, kalite ve saflığının ortaya çıkarılması sağlanmıştır.

Uluslararası bal tebliğinde de belirtildiği gibi bala dışardan bir madde eklenemez ve içeriğindeki bir madde de dışarıya çıkartılamaz (Codex Alimentarius 2001). Bu madde göz önünde bulundurularak balların içeriğinde bulunan polenlerin filtrasyon işlemi sırasında bertaraf olması balın kalitesini etkilemektedir. Uluslararası kaynaklarda 10 gram balda bulunması gereken Toplam Polen Sayısı (TPS₁₀) belirtilmiştir. Louveaux v.d. (1978) ve Feller-Demalsy v.d. (1989)'ye göre 10 gram balda bulunan toplam polen sayısına göre ballar şu şekilde kategorize edilmiştir: <20000: Düşük kalitede ballar, 20 bin-100 bin: Normal ballar, 100 bin-500 bin: Zengin ballar, 500 bin-1 milyon: Çok zengin ballar, >1 milyon: Katkılı ballar. Buna göre Tunceli ballarında 10 gramda bulunan toplam polen sayısı ortalama 87126.91 olarak bulunmuş olup 20 bin ila 100 bin arasında yer alan normal ballar kategorisine

girmektedir (Louveaux v.d. 1978, Feller-Demalsy v.d. 1989). Ballardan 13 tanesi düşük, 11 tanesi normal, 7 tanesi zengin ve 1 tanesi de çok zengin polen kalitesine sahip ballar olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Balların içerisindeki polen kalitesinin oluşumunda çevrenin florası, arının polen toplama kabiliyeti ve arıcının balı filtre etmesi etkili olmaktadır. Filtrasyonda özellikle 0.2 mm'den küçük ağ gözlü süzgeç tercih edilmemesi polenlerin bertaraf edilmesinin önlenmesi açısından önemlidir (Bogdanov 2007). Kaplan ve İnceoğlu (2002) tarafından Konya balları ile yapılan çalışmada 15 tanesi düşük, 7 tanesi normal ve 2 tanesi çok zengin olarak bulunmuştur. Ardahan balları ile yapılan bir tez çalışmasında da 10 gramdaki toplam polen sayısı ortalama 21428 olarak normal bal sınırları arasında bulunmuştur (Güzel 2014). Aynı şekilde Türkiye'nin farklı illerinden toplanan 44 bal örneğinde de 10 gramdaki toplam polen sayısı ortalama 47859 olarak bulunmuş olup bu değer ile de ballar normal kalite sınır değerler arasında yer almaktadır (Bölükbaşı 2007). Analiz edilen 32 balın 7 tanesinin monofloral (bir adet; *Berberis crataegina* DC.- T13, bir adet *Hypericum scabrum* L.- T14, beş adet *Paracaryum cristatum* (Schreber) Boiss. balı-T18,21,24,27,28), diğerlerinin ise multifloral olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2,3). Melisopalinoljik analizler sonucunda, *Berberis crataegina*, *Hypericum scabrum* ve *Paracaryum cristatum* taksonlarının

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

polenlerine, bazı ballarda dominant oranlarda rastlanılırken, *Anthemis tricornis* Eig., *Astragalus* L. sp., *Berberis crataegina*, *Coronilla varia* L., *Epilobium hirsutum* L., *Helianthemum ledifolium* (L.) Miller, *Hypericum scabrum*, *Lotus corniculatus* L., *Paracaryum cristatum*, *Plantago lanceolata* L., *Potentilla argentea* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip., *Teucrium* L. sp., *Trifolium repens* L., *Onobrychis oxyodonta* Boiss., *Verbascum* L. sp. taksonlarına ait polenlere sekonder oranlarda rastlanmıştır. Bu sonuçlarda da görüldüğü gibi Tunceli ballarında dominant polen grubu oldukça az olup monofloral kaynaklı bal oranı fazla değildir. Sadece *Berberis crataegina*, *Hypericum scabrum* ve *Paracaryum cristatum* türlerinin, bazı ballarda dominant olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Balların büyük çoğunluğunun sekonder, minör ve eser oranlarda polen bulundurduğu bu nedenle de multifloral kaynaklı olduğu belirlenmiştir.

Uluslararası Bal Kodeksi (Codex Alimentarius, 2001) ve Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2020)'ne göre ballarda nem oranı en fazla %20 olmalıdır. Batu v.d. (2013)'nin yapmış olduğu bir çalışmada Tunceli ilinin Ovacık ve Hozat ilçelerinden temin edilmiş balların nem değerleri sırasıyla %15,55 ve %15,49 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada da tüm ballardaki nem değerleri standartlara uygun olarak bulunmuştur. Uluslararası Bal Kodeksi (Codex Alimentarius, 2001) ve Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2020)'ne göre çiçek ballarında früktoz/glikoz oranı 0,9 ile 1,4 arasında olmalıdır. Batu v.d. (2013)'nin Tunceli balları ile yapmış olduğu çalışmada, früktoz içeriği %39,63 ve %36,21; glikoz içeriği %29,97 ve %30,54; F/G oranı ise 1,32 ve 1,19 olarak belirlenmiş olup çalışmamız ile benzer sonuçlara sahiptir. Özgüven v.d. (2020) tarafından Tunceli balları ile yapılan bir çalışma ise balın nem içeriği %13,9; F/G oranı ise 1,43 olarak belirlenmiş olup F/G oranı çalışmamıza göre daha yüksek tespit edilmiştir. Can v.d. (2015) Türk balları yapmış olduğu bir çalışmada ise toplam fenolik madde içeriğini 160,2 ile 1200,4 mgGAE/kg arasında bulmuş olup çalışma değerlerimiz ile benzerlik göstermektedir.

Bal, farklı çiçeklerden gelen nektarlardaki aromalar nedeniyle çok sayıda uçucu bileşene sahiptir. Bu durum, balların botanik ile coğrafik orijin tayininde kullanılmaktadır (Dekebo v.d. 2018). Tunceli ballarında GC-MS analizi sonucunda aldehidler, alifatik asit ve esterleri, alkoller, hidrokarbonlar, karbolik asit ve esterleri, ketonlar, terpenler, yağ asidi ve esterleri bileşik gruplarına ait bileşikler tespit

edilmiştir (Tablo 5,6). İl genelinde, analiz edilen örneklerde yüksek oranda karboksilik asit ve esterleri ile yağ asidi ve esterleri gruplarına ait bileşikler tespit edilmiştir. Özkök v.d. (2016) tarafından çam ballarında yapılan GC-MS çalışmasında çalışmamızdakine benzer uçucu bileşenler tespit edilmiştir. Bu bileşenler aldehitler, alkoller, flavanonlar, hidrokarbonlar, aromatik asitler ve esterleridir. Malezya balları ile yapılan bir çalışmada da çalışmamıza benzer hidrokarbonlar, aldehitler, alkoller, ketonlar, terpenler ve furanlar tespit edilmiştir (Syazana Nurul v.d. 2013).

SONUÇ

Yapılan bu çalışma ile bir ildeki balların ilçe bazında bile bitkisel ve kimyasal içeriğinin oldukça değişkenlik gösterdiği ve yıldan yıla bu değişikliklerin "coğrafi işaret" çalışmaları için takip edilmesi gerektiği gösterilmiştir. Bu çalışma, Tunceli ilinde üretilen balın bilimsel açıdan değerlendirilmesine katkıda bulunmuş olup hem bölge arıcılığı hem de ülke ekonomisi ve yerel bal ile ilgili planlanan "coğrafi işaret" çalışmasına katkı sağlayacaktır.

Mali Kaynak: Bu çalışmanın maddi olarak desteklenmesini Tunceli Arı Yetiştiricileri Birliği sağlamıştır.

Yazar Katkıları: Bu çalışmada, AÖ, ÖGÇ, NM balların melissopalinojik ve kimyasal analizlerini, KS, GZ, ÇÖ arazi çalışmalarını, GZ bitkilerin teşhisini, AÖ makalenin yazımını ve KS çalışmanın organizasyonunu yapmıştır.

Çalışma Durumu: Yazarlar arasında anlaşmazlık yoktur.

Etik Belgesi: Bu çalışma için etik belgesi gerekli değildir.

Teşekkür

Bu çalışmanın maddi ve manevi olarak desteklenmesini sağlayan Tunceli Arı Yetiştiricileri Birliği'ne ve bölge arıcılarımıza teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Balcı, F. 1978. Ankara'da üretilen ballarla Ankara piyasasında satılan balların fiziki, kimyevi ve biyolojik özellikleri üzerinde araştırmalar, Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı Mesleki Yayınlar Serisi, Ankara.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Barcarola, R., Centeleghe, M., Zanatta, P., Cont, LS. 1998. GC-MS coupled with headspace sampling with reverse carrier flow in sampling step applied to honey characterization, In: 5th international symposium of hyphenated technique in chromatography. Bruges, Belgium, 11-21 p.
- Batu, A., Küçük, E., Çimen, M. 2013. Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz Bölgeleri Çiçek Ballarının Fizikokimyasal ve Biyokimyasal Değerlerinin Belirlenmesi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 8(1): 52-62.
- Bogdanov, S. 1997. Charakterisierung von schweizer sortenhonigen, *Agrarforschung* 4: 427-430.
- Bogdanov, S. 2002. Harmonised methods of international honey commusion, international honey commusion, pp. 1-62.
- Bogdanov, S. 2007. Authenticity of honey and other bee products: state of the art. *Bulletin USAMV-CN* 63: 64.
- Bölükbaşı, D. 2007. Ambalajlı Balların Melitopalnolojik, Kimyasal ve Organoleptik Analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Can, Z., Yıldız, Y., Şahin, H., Turumtay, AE., Silici, S., Kolaylı, S. 2015. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles, *Food Chemistry* 180: 133-141.
- Codex Alimentarius. 2001. Draft revised for honey at step 6 of the Codex Procedure. CX5/10.2, CL1998/12-S.
- Cuevas-Glory, LF., Pino, JA., Santiago, LS., Sauri-Duch, E. 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey, *Food Chemistry* 103: 1032-1043.
- Davis, PH. 1965. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 1., Edinburgh.
- Davis, PH. 1967. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 2., Edinburgh.
- Davis, PH. 1970. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 3., Edinburgh.
- Davis, PH. 1972. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 4., Edinburgh.
- Davis, PH. 1975. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 5., Edinburgh.
- Davis, PH. 1978. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 6., Edinburgh.
- Davis, PH. 1982. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 7., Edinburgh.
- Davis, PH. 1984. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 8., Edinburgh.
- Davis, PH. 1985. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 9., Edinburgh, U.K.
- Davis, PH., Mill, RR., Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 10, Edinburgh, U.K.
- Dekebo, A., Kwon, SY., Kim, DH., Jung, C. 2018. Volatiles analysis of honey by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): Comparison of SPME volatiles extraction methods, *Journal of Apiculture* 33(2): 117-128.
- Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delégue, MH., Doré, JC. 2004. Classification of monofloral honeys based on their quality control data, *Food Chemistry* 86: 305-312.
- Feller-Demalsy, MJ., Parent, J., Strachan, AA. 1989. Microscopic analysis of honeys from Manitoba, Canada. *Journal of Apicultural Research* 28: 41-49.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, MT. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, Türkiye.
- Güzel, F. 2014. Ardahan İli Ballarının Melitopalnolojik, Fiziksel Ve Kimyasal Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Hoerudin, D. 2004. Phenolic and Flavanoid Contents of Australian Honeys from Different Floral Sources, Master Thesis, Queensland University, Australia.
- Işık, Y. 2012. Bir Tutam Tunceli, Tunceli Valiliği. Anıt Matbaa, Ankara, 170s.
- Kaftanoğlu, O. 2010. Balın kalitesine etki eden faktörler ve kaliteli bal üretme yöntemleri,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Ballı Yazılar, metro kültür yayınları gastro dizisi-IV Haziran 2010, pp.75-85.
- Kaplan, A., İnceoğlu, Ö. 2002. Pollen analysis of Konya region honeys. *Sistemik Botanik Dergisi* 9: 101-109.
- Kerkvliet, JD., Shrestha M., Tuladhar, K. Manandhar, H. 1995. Microscopic detection of adulteration of honey with cane sugar and cane sugar products, *Apidologie* 26, 131-139.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978. Methods of Melissopalynology, *Bee World* 59: 139-157.
- Moar, NT. 1985. Pollen analysis of New Zealand honey, *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28: 38-70.
- Özgüven, M., Demircan, E., Özçelik, B. 2020. Çeşitli Yörelere Üretilen Çiçek Ballarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Türk Gıda Kodeksi'ne Uygunluğunun Değerlendirilmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 20: 321-326.
- Özkök, A., Sorkun, K., Salih, B. 2016. The Microscopic and GC-MS Analysis of Turkish Honeydew (Pine) Honey, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44(4): 375-383.
- Özkök, A., D'Arcy, B., Sorkun, K. 2010. Total Phenolic Acid and Total Flavonoid Content of Turkish Pine Honeydew Honey, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2(2): 65-71.
- Radovic, BS., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. 2001. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey, *Food Chemistry* 72: 511-520.
- Russmann, H. 1998. Hefen und Glycerin in Blütenhonigen– Nachweis einer Gärung oder einer abgestoppten Gärung, *Lebensmittelchemie* 52: 116-117.
- Soria AC., Martinez-Castro, I., Sanz, J. 2003. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Separation Science* 26: 793-801.
- Sorkun, K. 2002. Balda Nişasta Analizi, *Teknik Arıcılık* 78: 6-8.
- Sorkun, K. 2008. Türkiye'nin Nektarlı Bitkileri, Polenleri ve Balları, Palme yayıncılık, 341s.
- Sunay, AE. 2010. Balda Orijin tespiti konusunda bir tez çalışması. Ballı Yazılar, metro kültür yayınları gastro dizisi-IV Haziran 2010, 42-62.
- Syazana Nurul, MS., Gan, SH., Halim, AS., Shah, NSM., Gan, SH., Sukari, HA. 2013. Analysis of volatile compounds of Malaysian Tualang (*Koompassia excelsa*) honey using gas chromatography mass spectrometry. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2): 180-188.
- Tunceli ili coğrafyası, Türkiye Kültür Portalı. 2016. Son Erişim 11.04.2019.
- Türk Gıda Kodeksi-Bal Tebliği. 2020. Tebliğ No 2020/7, sayı 31107.
- Türk Patent ve Marka Kurumu. 2021. <https://www.ci.gov.tr/sayfa/co%C4%9Ffrafi-i%C5%9Faret-nedir>.
- Yıldırım, Ş. 1995. Flora of Munzur Dağları (Erzincan-Tunceli). *Ot Sistemik Botanik Dergisi*, 2(1): 1-78.
- Yoğunlu, A. 2011. Tunceli ekonomik değeri olan bitkiler raporu. Fırat Kalkınma Ajansı.
- Yüce Babacan, E., Eker, İ. 2017. Munzur Vadisi (Tunceli) ve yakın çevresinin geofit florası. *Bağbahçe Bilim Dergisi* 4(1): 31-49.
- Yüce Babacan, E., Vitek, V., Çakılcıoğlu, U. 2017. Contributions to the Flora of Tunceli (Turkey), *International Journal of Nature and Life Sciences (IJNLS)* 1(2): 39-66.
- White, JW., Winters, K. 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 72: 907-911.
- Wodehouse, RP. 1935. Pollen Grains, Mc Graw, Hill N. Y., 106-109 pp. <http://www.resimle.net/resim4363.html>.

Atıf/Citation: Özkök A, Ecem Bayram N. 2021. Kestane (*Castanea sativa*) Balı Örneklerinin Botanik Orijinlerinin Doğrulanması ve Toplam Polen Sayıları (Confirmation of botanical origin and total pollen numbers of chestnut (*Castanea sativa*) honey samples). U. Arı D./U. Bee J. 21: 54-65, DOI: 10.31467/uluaricilik.899782

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

KESTANE (*Castanea sativa*) BALI ÖRNEKLERİNİN BOTANİK ORİJİNLERİNİN DOĞRULANMASI VE TOPLAM POLEN SAYILARI

Confirmation of Botanical Origin and Total Pollen Numbers of Chestnut (*Castanea sativa*) Honey Samples

Aslı ÖZKÖK¹, Nesrin ECEM BAYRAM^{2*}

¹Hacettepe Üniversitesi, Arı ve Arı Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (HARÜM), 06800, Beytepe, Ankara, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0002-7336-2892; E-posta: asozkok@gmail.com.

^{2*}Bayburt Üniversitesi Aydıntepe Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, 69500, Aydıntepe, Bayburt, TÜRKİYE, ORCID No: 0000-0002-5496-8194, Yazışma Yazarı/Corresponding author: E-posta: ecem.nesrin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 19.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 09.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.899782

ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye'nin Zonguldak ilinin farklı lokasyonlarından toplanan bal örneklerinin (n=9) botanik orijinlerinin palinolojik analizle tespit edilmesi ve toplam polen sayılarının saptanması amaçlanmıştır. Ek olarak toplanan bal örneklerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde kestane balı numuneleri için verilen polen içeriği kriteri ile uyumluluğu tartışılmıştır. Melissopalinolojik analizler neticesinde bal örnekleri kestane balı (n=7), karışık çiçek balı (n=2) ve geven balı (n=1) olarak etiketlenmiştir. Kestane balı olarak tespit edilen örneklerin 10 gr baldaki toplam polen sayısı (TPS-10) 41722-647312 arasında saptanmış olup bu bal örneklerinin çok iyi, iyi ve normal kalitede bal örnekleri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar kestane balı olarak toplanan bal örneklerinin %33'ünün ulusal gıda kodeksinde kestane botanik orijinine sahip unifloral bal tipleri için rapor edilen minimum polen içeriğine sahip olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar özellikle ülkemizde diğer polifloral çiçek ballarına kıyasla daha yüksek fiyata satılan kestane gibi unifloral bal tipleri için botanik orijin tespit analizinin zorunlu hale getirilmesinin haksız rekabetin önlenmesi açısından ne denli önemli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, ülkemizde üretilen fakat minimum polen içeriği Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde belirtilmeyen lavanta ve çörekotu gibi farklı tipte unifloral çiçek balları için de melissopalinolojik çalışmaların yürütülerek polen içeriği değerlerinin belirlenmesi önemli görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Bal, Polen analizi, Kestane balı, Toplam polen sayısı, TPS-10

ABSTRACT

In this study, it was aimed to detect the botanical origins by palynological analysis and to determine the total pollen numbers of honey samples collected from different locations of Zonguldak, Turkey. In addition, the compatibility of the collected honey samples with the pollen content criterion given for the chestnut honey samples by the Turkish Food Codex Communiqué on Honey (No: 2020/7) has been discussed. As a result of melissopalynological analyzes, honey samples were labeled as chestnut honey (n = 7), mixed flower honey (n = 2) and astragalus honey (n = 1). Total pollen number in 10 g of

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

honey the samples (TPS-10) identified as chestnut honey was detected to be between 41722 - 647312, and it was determined that these honey samples were very good, good, and normal quality honey samples. In addition, the results obtained showed that 33% of honey samples collected as chestnut honey did not provide the minimum pollen content reported for unifloral honey types with chestnut floral origin in the national food codex. These results showed how important it is to make floral origin determination mandatory for unifloral honey types such as chestnut, which is sold at a higher price compared to other polyfloral flower honeys in our country, in terms of preventing unfair competition. For this reason, it is important to determine the pollen content values by conducting melissopalynological studies for different types of unifloral flower honey such as lavender and black seed, which are produced in our country but whose minimum pollen content is not specified in the Turkish Food Codex Communiqué on Honey (No: 2020/7).

Keywords: Honey, Pollen analysis, Chestnut honey, Total pollen number, TPN-10

EXTENDED ABSTRACT

Aim: In this study, the compatibility of honey samples collected from Zonguldak, Turkey with the minimum pollen content determined by the Turkish Food Codex Communiqué on Honey (No:2020/7) for unifloral chestnut honey and its quality based on total pollen count were evaluated.

Materials and Methods: 9 honey samples used in the study were obtained from beekeepers in Zonguldak province through Zonguldak Beekeepers Association (ZAYBİR) in 2020. Pollen analysis in honey was carried out according to Sorkun (2008) and Louveaux et al. (1978). The slide preparation for calculating the total pollen number in 10 g honey (TPS-10) was carried out according to Moar (1985) and Sorkun (2008).

Results and Discussion: Since honey is a natural nutrient that has been consumed by human beings for centuries, it is very important to determine the quality criteria of honey. At this point, melissopalynological analyses are performed, which are among the parameters that provide an idea about the quality of honey and enable the pollen grains in honey to be defined based on morphological data. Revised in 2020, in the Turkish Food Codex Communiqué on Honey (No: 2020/7), it was reported that in addition to many physicochemical and chemical criteria, floral origins of some unifloral honeys, including chestnut honey, should be verified through pollen analysis. This change has once again revealed the importance of pollen analysis in floral origin determination studies of honey. The results obtained from this study showed that the *Castanea sativa* pollen count

varied between 40.98-94.78% in other honey samples except for one sample. However, in a sample in which *Castanea sativa* pollen was not found, *Astragalus* spp. pollen was determined as dominant at 58.82%, as the floral origin of this honey sample was marked as astragalus (*Astragalus* spp.) honey. Besides, two samples were labeled as mixed flower honey rather than chestnut honey, as it contains less than 70% *Castanea sativa* pollen. Our results confirmed that the floral origin of 67% (n = 6) of the honey samples is unifloral chestnut honey, supporting the Turkish Food Codex Communiqué on Honey (No: 2020/7). Based on the TPS-10 value of honey samples, according to Louveaux et al. (1978) and Jose et al. (1989), honey samples are examined in five different groups which are: Group I (<20000), Group II (20000- 100000), Group III (100000--500000), Group IV (500000--1000000) and group V (> 1000000). Accordingly, the TPS-10 value of the honey sample number 2 with the highest chestnut pollen content (94.78%) was determined to be higher than the other honey samples (647 312) and was included in the Group IV category. Honey produced from plant sources with high pollen production is classified in this category (Paredes and Bryant 2020); and chestnut is among the plants with high pollen production (Özkırım 2018). However, the other three honey samples (3, 6 and 7) determined to be in the Group III category are the samples with the highest total pollen count following sample number 2. This indicates that the varieties and counts of plant species that contribute to honey as a source of pollen have a significant effect on the total pollen number. As a result, making pollen analysis mandatory by the relevant institutions for honey types to be labeled as unifloral honey in our country

is considered an important step. However, it is thought that it is important to consider the pollen density not only for the verification of unifloral honey types but also for the standardization of honey regarding the regions and the processes of obtaining geographical indications.

GİRİŞ

Türkiye, değişken coğrafik özellikleri, zengin bitki çeşitliliği ve ekonomik açıdan öneme sahip bal arısı ırkları nedeni ile arıcılık potansiyelinin yüksek olduğu ülkelerin başında gelmektedir (Güler ve Demir 2005). Ülkemizde özellikle kırsal kesimlerde geleneksel bir tarımsal aktivite olarak yürütülen arıcılık faaliyetleri sonucunda bal, polen, arı ekmeği, propolis, arı sütü, arı zehri, apilarnil ve bal mumu gibi ürünler elde edilmesine rağmen bu ürünlerin en bilineni ve dolayısıyla en çok üretimi yapıp tüketime sunulanı baldır. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne göre bal; "Bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının, bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı, doğası gereği kristallenebilen doğal ürünü" olarak tanımlanmaktadır. Bitki kaynağına göre bal, salgı balı ve çiçek balı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Pita-Calvo ve Vázquez 2017). Salgı balı "bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarından elde edilen balları" ifade eder (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği No:2020/7). Diğer yandan çiçek balının ham maddesini ise daima çiçekli bitkilerin nektarı oluşturmaktadır (Nicolson v.d. 2007). Balın kaynağındaki değişiklikler (nektar veya salgı balı olup olmadığı) balın kokusunu, tadını ve rengini önemli ölçüde etkilemekle birlikte bu değişiklikler temelde arılar tarafından bal üretmek için kullanılan bitki kaynağı ile ilişkilidir. Bununla birlikte, balın diğer fiziksel özellikleri ve kimyasal içeriği toplanan nektarın bitki kaynağı dışında, toplandığı coğrafik bölgenin iklimsel özelliklerine ve balın hasat mevsimine bağlı olarak da oldukça değişiklik göstermektedir (Biluca v.d. 2016, Bayram v.d. 2020, Machado v.d. 2020).

Bal üretiminde Dünya'da oldukça iyi bir sıralamada yer alan ülkemizde multifloral (polifloral) ve unifloral (monofloral) bal çeşitleri bulunmaktadır. Multifloral ballar genellikle üretildiği bölgenin (Anzer balı, Bayburt balı, Kars balı, Ardahan balı vb.) adı ile anılırken unifloral ballar ise dominant olarak kaynak aldığı bitkinin adı (kestane, lavanta, kekik vb.) ile anılmaktadır. Ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinde arıların nektar kaynağı olarak kullandığı narenciye, funda, pamuk, ayçiçeği, kestane ve ıhlamur gibi bitki kaynaklarından çeşitli unifloral çiçek balları üretilmektedir. Türkiye'de üretimi yapılan bazı unifloral bal tiplerinin ilgili bitkinin ismi ile etiketlenebilmesi için bu bitkinin polen tanesi ile minimum hangi oranda temsil edilmesi gerektiği T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2020 yılında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne eklenmiştir. Bu tebliğ kapsamında unifloral bal tipleri normal, yoğun ve az olan unifloral bal çeşitleri olmak üzere üç farklı grup altında sınıflandırılmıştır. Geven (*Astragalus* spp.), piren/püren (*Calluna vulgaris*, *Erica* spp.), kanola (*Brassica napus*), yonca (*Medicago sativa*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), üçgül (*Trifolium* spp.), hayıt (*Vitex* spp.) ve fazelya (*Phacelia tanacetifolia*) bitkileri normal unifloral (unifloral) türler olarak belirlenmiş olup bal örneklerinin bu bitkilerin adıyla anılabilmesi için en az %45 oranında ilgili bitkinin polenini içermesi gerektiği rapor edilmiştir (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği No:2020/7). Benzer şekilde kestane (*Castanea sativa*) ve okalıptüs (*Eucalyptus* spp.) yoğun olan unifloral türler olup bu tip ballar en az %70 adıyla anıldığı bitkinin polenini içermelidir (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği No:2020/7). Son olarak ise akasya (*Robinia pseudoacacia*), narenciye (*Citrus* spp.), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), kekik (*Thymus* spp., *Origanum* spp., *Tymbra* spp., *Coridathymus* spp.) ve ıhlamur (*Tilia* spp.) poleni az olan unifloral ballar sınıfında sınıflandırılmış olup akasya için %15, ıhlamur için %5 değerleri için ise %10 oranında ilgili bitkinin polen tanesiyle temsil edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği No:2020/7). Bu noktada, 2020 yılında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde, balların bitkisel kaynağının belirlenmesi için yapılan çalışmaların önemi bir kez daha vurgulanmıştır. Balın bitkisel kaynağının tespiti için günümüzde farklı teknikler kullanılmaya ve denenmeye başlansa da baldaki polen tiplerinin ışık mikroskobu aracılığıyla teşhisine

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

dayanan melissopalinojik analiz yaygın olarak kullanılmaktadır (Corvucci v.d. 2015, Hailu ve Belay, 2020). Melissopalinojik analiz sayesinde bala polen sağlayan bitkiler dolayısıyla balın bitkisel kaynağı belirlenmiş olur. Bununla birlikte polen analizi balların kristalizasyon hızları hakkında fikir sunabilir (Escuredo v.d. 2014). Ayrıca, polen analizi toksik etki oluşturabilecek bazı bal tiplerinin gıda güvenliği açısından değerlendirilmesinde de önemli bir rol oynar. Örneğin Türkiye’de özellikle Karadeniz bölgesinde üretimi yapılan tüketilmesi durumunda toksik etki yapabilen ormangülü (*Rhododendron* spp.) ballarının tanımlanmasında polen analizinden faydalanılmaktadır (Cagli v.d. 2009). Bununla birlikte, şekerle taşış yapılan ballarda toplam polen sayısı düşük olarak tespit edilir ki bu da ballara uygulanan melissopalinojik analizin faydaları arasında sayılabilir. Bu değerlendirmelerden de anlaşılacağı üzere, ballarda palinojik analiz balların kalitesinin farklı açılardan değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu

Şekil 1. Bal örneklerinin toplandığı lokasyonlar

Figure1. Map of the locations where honey samples are collected



*1: Devrek, Zonguldak; 2: Alaplı, Zonguldak; 3:Çaycuma, Zonguldak; 4: Merkez, Zonguldak; 5:Çaycuma Zonguldak; 6: Ereğli, Zonguldak; 7: Kilimli, Zonguldak; 8:Kozlu, Zonguldak; 9:Kozlu Zonguldak

Baldan polen ekstraksiyonu

Balda polen analizi Sorkun (2008) ve Louveaux v.d.(1978)'nin önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre bir cam baget yardımı ile iyice karıştırılan bal örneğinden 10 g alınarak cam

nedenle, bu çalışmada Türkiye'nin Zonguldak ilinden kestane balı olarak toplanan örneklerin polen analizleri yapılarak Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde verilen minimum polen içeriği ile uyumluluğu ve toplam polen sayılarına dayalı olarak kalitesi değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Bal örneklerinin toplanması ve saklanması

Çalışmada kullanılan ve kestane balı olarak toplanan 9 adet bal örneği 2020 yılında Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birliği (ZAYBİR) vasıtası ile Zonguldak ilinde bulunan arıcılardan temin edilmiştir. Cam şişelerde süzme bal şeklinde Hacettepe Üniversitesi Arı ve Arı Ürünleri Merkezi (HARÜM)'ne gönderilen bal örnekleri analizlere kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bal örneklerinin toplandığı noktaları temsil eden örneklem haritası Şekil 1'de sunulmuştur.

Ardından tütün dibinde kalan bir miktar çökelti bazik-fuksinli gliserin-jelâtin ile muamele edilerek alınan lam üzerine aktarılmıştır. Son olarak, lam, ısıtma tablasında 30-40°C'de ısıtılarak bazik fuksinli gliserin-jelâtinin erimesi sağlanmıştır. İğne ile lam üzerine erimiş bazik-fuksinli gliserin-jelâtin ile polenler karıştırılarak polen içeriğinin homojen şekilde dağılması sağlandıktan sonra lam üzerine 18x18 mm²'lik lamel kapatılmıştır. Ters çevrilen preparat yaklaşık 12 saat sonra incelemeye hazır hale gelmiştir.

Bal örneklerindeki polen tanelerinin teşhis edilmesi

Başlık 2.1.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan preparatlarda farklı bitki kaynaklarından gelen polen taneleri Leica DM500 marka ışık mikroskobu altında immersiyon objektif (X100) kullanılarak teşhis edilmiştir. Polenlerin teşhis edilmesi aşamasında farklı referans kaynaklarla (Sorkun 2008, <http://www.paldat.org/>) birlikte araştırmanın yürütüldüğü laboratuvarında bulunan bitkisel referanslardan hazırlanan polen preparatı kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Polen tanelerinin sayımı sırasında ise küçük boyuttaki polen tanelerini rahat ayırt edebilmek için X40'lik objektif kullanılmıştır. Preparatın sol üst köşesinden başlayarak toplamda 200 adet bitki poleninin sayımı ve beraberinde teşhisi gerçekleştirilmiştir. Polen tanelerinin sayımı bittikten sonra ilgili polen tanelerinin bulunma sıklığına göre dominant polen (≥%45), sekonder polen (%16-44), önemli minör polen (%3-15) ve minör polen (<3%) olarak sınıflandırma yapılmıştır (Louveaux v.d.1978).

Balda toplam polen sayısının belirlenmesi

10 g baldaki toplam polen sayısı (TPS-10)'nın hesaplanması için preparat hazırlama işlemi Moar (1985) ve Sorkun (2008) önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre, 10 g bal örneği cam deney tütüne aktarıldıktan sonra üzerine 20 mL distile su ile birlikte bir tanesinde 12542 adet *Lycopodium* spp. sporu bulunan tablet eklenmiştir. Daha sonra elde edilen bu karışım 45°C'lik su banyosunda 10-15 dk homojen hale gelinceye kadar bekletilmiştir. Tablet iyice eridikten sonra polenlerin ve sporların boyanmasını sağlayan birkaç damla bazik fuksin ilave edildikten sonra 3500 rpm'de 45 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra tüplerin süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tüpler ters çevrilerek suyunun iyice süzülmesi sağlanmıştır. Daha sonra tütün içerisine 0,1 mL kadar %50'lik gliserin ilave edilerek dipteki çökeltinin gliserin ile homojen bir biçimde karışması sağlanmıştır. Bu karışımdan pipetle 0,01 mL alınarak başka bir cam tüpe aktarılmış ve üzerine 0,09 mL %50'lik gliserin eklenmiştir. Son olarak elde edilen bu karışımdan 0,01 mL lam üzerine transfer edilmiş ve üzerine 18x18mm²'lik lamel kapatılarak, ışık mikroskobu altında incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Her preparat sol üst köşeden başlayarak mikroskopta taranmış bu alanda bulunan tüm polenler tür ayrımı yapmadan sayılmıştır. Daha sonra aynı preparatta tekrar sol üst köşeden başlanarak *Lycopodium* spp. sporlarının sayısı hesaplanmış ve 10 gram baldaki toplam polen sayısı aşağıdaki bağlantıya göre hesaplanmıştır;

$$TPS - 10 = \frac{\text{Sayılan polen} \times \text{Bir } Lycopodium \text{ tabletinde bulunan spor sayısı}}{\text{Sayılan } Lycopodium \text{ sporu sayısı}}$$

TPS-10 değeri baz alınarak Louveaux v.d. (1978) ve Jose v.d. (1989)'a göre bal örnekleri Grup I (<20000), Grup II (20000- 100000), Grup III (100000–500000), Grup IV (500000–1000000) ve grup V (>1000000) olmak üzere beş farklı grupta incelenmiştir.

İstatistik analiz

Bal örneklerini içermiş oldukları taksonlara göre ayırmak ve sınıflandırmak için hiyerarşik kümeleme analizi Minitab 19 istatistik yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Bal örneklerinde polenleri tespit edilen bitki taksonları

Zonguldak ilinin farklı lokasyonlarından elde edilen 9 adet bal örneğinde polen analizi yapılarak, her bala ait sonuçlar ayrı ayrı tespit edilmiştir. Tablo 1'de farklı bal örneklerinde tespit edilen 200 polen tanesinin dağılımı yüzde (%) olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bal örneklerinde *Castanea sativa* (%40,9-94,78), *Trifolium* spp. (%0,47-26,22), *Astragalus* spp. (%58,82),

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Onobrychis spp. (%4,16), *Hedysarum* spp. (%3,27), Apiaceae (%2,94-11,47), Rosaceae (%0,47-21,42), Asteraceae (%0,94-3,27), *Centaurea* spp. (%1,63-2,94), *Salix* spp. (%2,94-3,27), *Thymus* spp. (%2,94), Lamiaceae (%1,63), *Teucrium* spp. (%4,16), Liliaceae (%1,63-4,16), Cistaceae (%0,94-5,88), Ericaceae (%1,63-4,16), *Campanula* spp. (%2,94), *Plantago* spp. (%2,94-4,16), *Cephalaria* spp. (%2,85), *Epilobium* spp. (%2,85) ve *Geranium* spp. (%2,85) taksonlarına ait olan bitkilerin polenlerine farklı oranlarda rastlanmıştır.

Zonguldak yöresinde üretilen bal örneklerinde Tablo 2'de verilen taksonların görülme oranları

değerlendirildiğinde bal örneklerinde sırasıyla en yüksek oranda %100 (n=9) ve %88,9 (n=8) oranında Rosaceae ve *Castanea sativa* taksonlarına ait bitkilerin polenleri belirlenmiştir. Bal örneklerinde *Castanea sativa* poleni bir örnek hariç diğer bal örneklerinde %40,98-94,78 arasında polen oranı ile temsil edilmiştir. Bununla birlikte *Castanea sativa* polenin tespit edilmediği 5 nolu numunede *Astragalus* spp. poleni %58,82 oranında dominant olarak belirlendiği için bu bal örneğinin botanik orijini geven balı olarak işaretlenmiştir. Ek olarak, 1 ve 9 nolu bal örnekleri *Castanea sativa* polenini %70'ten az içerdiği için kestane balı olarak değil de karışık çiçek balı olarak işaretlenmiştir.

Tablo 1. Zonguldak ballarında tespit edilen taksonların polen spektrumu (%)

Table 1. Pollen spectrum of taxa identified in honey samples from Zonguldak province (%)

	Dominant polen (≥%45)	Sekonder polen (%16-44)	Minör polen (%3-15)	Eser polen (<%3)	Botanik Orijin (Botanical Origin)
1		<i>Castanea sativa</i> <i>Trifolium</i> spp.	<i>Hedysarum</i> spp. Apiaceae Rosaceae Asteraceae <i>Salix</i> spp.	<i>Centaurea</i> spp. Lamiaceae Liliaceae Cistaceae Ericaceae	Multifloral Çiçek balı
2	<i>Castanea sativa</i>			<i>Trifolium</i> spp. Rosaceae Asteraceae Cistaceae Ericaceae	Unifloral Kestane Balı
3	<i>Castanea sativa</i>			<i>Trifolium</i> spp. Rosaceae Ericaceae Cistaceae	Unifloral Kestane Balı
4	<i>Castanea sativa</i>	Rosaceae	<i>Trifolium</i> spp.		Unifloral Kestane Balı
5	<i>Astragalus</i> spp.	Rosaceae	Cistaceae	Apiaceae <i>Centaurea</i> spp. <i>Thymus</i> spp. <i>Campanula</i> spp. <i>Plantago</i> spp. <i>Salix</i> spp.	Unifloral Geven Balı
6	<i>Castanea sativa</i>		Rosaceae <i>Teucrium</i> spp. Cistaceae Ericaceae <i>Plantago</i> spp.		Unifloral Kestane Balı
7	<i>Castanea sativa</i>		<i>Trifolium</i> spp. Rosaceae	Asteraceae Cistaceae <i>Cephalaria</i> spp. <i>Epilobium</i> spp. <i>Geranium</i> spp.	Unifloral Kestane Balı
8	<i>Castanea sativa</i>		<i>Trifolium</i> spp. Rosaceae		Unifloral Kestane Balı
9		<i>Castanea sativa</i>	<i>Trifolium</i> spp. <i>Onobrychis</i> spp. <i>Hedysarum</i> spp. Rosaceae <i>Thymus</i> spp. Liliaceae Cistaceae		Multifloral Çiçek Balı

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 2. Zonguldak bölgesi ballarında tespit edilen taksonlara rastlanma sıklığı

Table 2. Frequency of occurrence of the taxa identified in the Zonguldak honey samples.

Takson/Taxon	Familya/Family	Taksonun rastlanma sıklığı/ Frequency of occurrence of the taxa (%)
<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae	88,9
<i>Trifolium</i> spp.	Fabaceae	77,8
<i>Astragalus</i> spp.	Fabaceae	11,1
<i>Onobrychis</i> spp.	Fabaceae	11,1
<i>Hedysarum</i> spp.	Fabaceae	22,2
Apiaceae	Apiaceae	22,2
Rosaceae	Rosaceae	100
Asteraceae	Asteraceae	33,3
<i>Centaurea</i> spp.	Asteraceae	22,2
<i>Salix</i> spp.	Salicaceae	22,2
<i>Thymus</i> spp.	Lamiaceae	22,2
Lamiaceae	Lamiaceae	11,1
<i>Teucrium</i> spp.	Lamiaceae	11,1
Liliaceae	Liliaceae	22,2
Cistaceae	Cistaceae	77,8
Ericaceae	Ericaceae	44,4
<i>Campanula</i> spp.	Campanulaceae	11,1
<i>Plantago</i> spp.	Plantaginaceae	22,2
<i>Cephalaria</i> spp.	Dipsacaceae	11,1
<i>Epilobium</i> spp.	Onagraceae	11,1
<i>Geranium</i> spp.	Geraniaceae	11,1

3.2. Bal örneklerinin toplam polen sayısı (TPS)

Bal örneklerin TPS-10 değerleri 22827- 647312 arasında tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu çalışmada Zonguldak ilinden toplanan bal örneklerinin TPS-10 değerleri incelendiğinde 5 adet bal örneğinin Grup

II'de (polen içeriği normal) , 3 adet bal örneğinin grup III'de (polen içeriği yüksek) ve 1 adet bal örneğinin ise Grup IV (polen içeriği çok yüksek)'de yer aldığı belirlenmiştir. TPS-10'unun ballara göre dağılımı ise Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Zonguldak ilinden toplanan bal örneklerinin TPS-10 değerleri

Table 3. TPS-10 value of honey samples from Zonguldak province

Örnek Kodu (Sample Code)	Sayılan polen tanesi (Counted pollen grain)	Markır olarak sayılan spor sayısı (Marker counted)	TPS-10 (TPN-10)	Gruplama (Category)	Değerlendirme (Evaluation)
1	62	100	22827	II*	Normal Kalitede Bal*
2	211	12	647312	IV***	Çok iyi kalitede bal***
3	37	8	170264	III**	İyi Kalitede Bal**
4	14	7	73628	II*	Normal Kalitede Bal*
5	39	50	28714	II*	Normal Kalitede Bal*
6	24	5	146707	III**	İyi Kalitede Bal**
7	35	4	322122	III**	İyi Kalitede Bal**
8	34	30	41722	II*	Normal Kalitede Bal*
9	24	10	88353	II*	Normal Kalitede Bal*

* TPS-10: 20000-100000 (Normal kalitede bal); ** TPS-10: 100000 500000 (İyi kalitede bal); ***TPS-10; 500000-1000000 (Çok iyi kalitede bal) (Sorkun 2008, Jose v.d. 1989)

TARTIŞMA

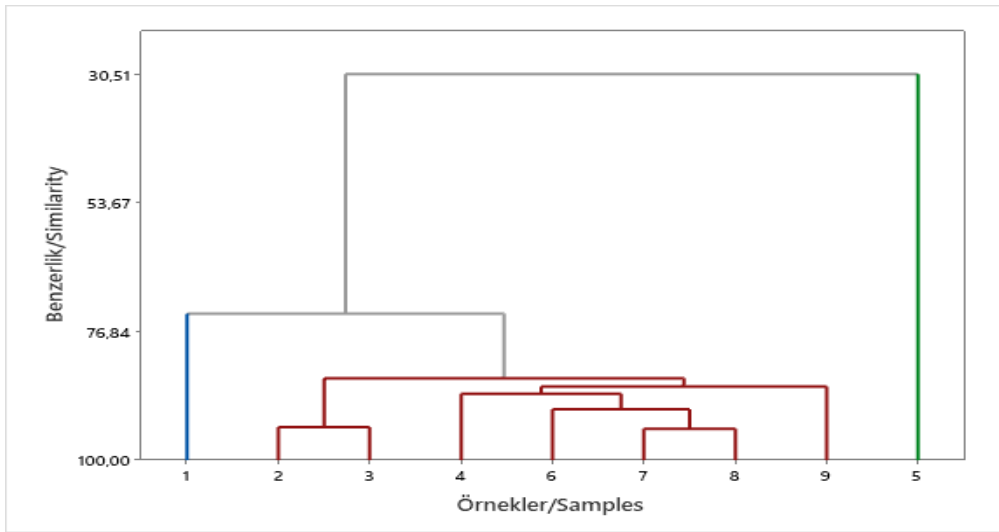
Günümüzde yüksek kalitede ve özellikleri iyi tanımlanmış gıda ürünlerine duyulan gereksinimin artması nedeniyle, balın da dahil olduğu tüm gıda ürünleri ticarileşmeden önce çok sayıda sertifika ve kalite kriterlerini karşılamak zorundadır (Devillers v.d. 2004). Bal besleyici değeri yüksek olması nedeniyle geleneksel bir gıda olarak kullanılmasının yanı sıra çeşitli hastalıklara karşı destekleyici tedavide de kullanılmaktadır. Bu nedenle de insanların tüketimine sunulan balların kalite parametrelerine uygun olması önemlidir (Hermanns v.d. 2020). Bu açıdan değerlendirildiğinde, özellikle ülkemizin belli bölgelerinde üretilen kestane gibi tıbbi özellikleri yüksek olan (Güneş v.d. 2017) bazı bal tiplerinin kalite kriterlerini karşılaması oldukça önem arz etmektedir. Türkiye'nin Bolu, Bursa, Çanakkale, Balıkesir, Giresun, Samsun, Rize ve Zonguldak gibi farklı illerinin florasında yoğun olarak dağılışı gösteren kestane bitkisi yüksek nektar verimi nedeniyle bal üretiminde arılar tarafından yoğun şekilde tercih edilmektedir. Bununla birlikte nektar verimine ek olarak Türkiye genelinde *Castanea sativa* bitkisinin polen verimi de oldukça yüksektir (Özkırım 2018). Bu nedenle kestane balı Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde yoğun unifloral türler yani yüksek oranda polen tanesiyle temsil edilen bal örnekleri arasında sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmanın yapılması ülkemizde üretilen ve kestane balı olarak etiketlenen bal örneklerinin botanik orijininin doğrulanmasında polen yoğunluğunun artık dikkate değer bir parametre olduğunun bir göstergesidir. Bu nedenle bu çalışmada Türkiye'nin Zonguldak ilinden toplanan kestane balı örneklerinin botanik kökenlerini ne oranda temsil ettikleri polen analizine dayalı olarak belirlenmiş ve örneklerin kestane balı olarak etiketlenebilmesi için Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde belirtilen limit değere (en az %70) olan uygunluğu araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ni destekler şekilde bal örneklerinin %67'sinin (n=6) botanik orijininin unifloral kestane balı olduğunu doğrulamıştır. Bunların dışında kalan 3 örnekte 1'inde (5 nolu örnek) *Castanea sativa* polenine rastlanmazken diğer iki örnekte (1 ve 9 nolu örnekler) ise sırasıyla %40,98 ve %62,5 oranında bu bitkinin poleni teşhis edilmiştir. Bu nedenle 70'in altında kestane poleni ile temsil edildiği belirlenen bu iki bal örneği kestane balı yerine karışık çiçek balı olarak değerlendirilmiştir. Nitekim yapılan literatür taramasında her iki bitkinin de bölge florasında yer

aldığı rapor edilmesine rağmen (TUBİVES, 2021; Sarıbaşı, 2008) 5 nolu bal örneğinde *Castanea sativa* poleninin tespit edilememesinin muhtemel sebebinin, kestane bitkisinin çiçeklenme periyodu geçen bitkisine göre daha kısa bir zamanda tamamlandığı için bu bal örneğinin ilgili bölgeye kestane bitkisinin çiçeklenme sezonu bittikten sonra getirilen arı kovanlarından üretildiği düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, polen analizinin tüketici mağduriyeti açısından da önemli olduğunu işaret etmektedir. Çünkü kestane balı antimikrobiyal ve antioksidan gibi farklı farmakolojik özellikleri (Güneş v.d. 2017) sebebiyle ülkemizde oldukça yoğun talep gören bir unifloral bal tipidir ve bu nedenle de diğer karışık çiçek ballarına kıyasla daha yüksek fiyatlara satılmaktadır. Nitekim minimum polen içeriği kriterini (en az %70) sağlamadığı halde sadece beyana dayalı olarak kestane balı etiketiyle satışa sunulan unifloral bal örnekleri tüketicilerin maddi olarak mağdur olmalarına sebep olabilir. Bu sebepten dolayı da bireysel olarak satışa sunulan bal örneklerinin de palinolojik analizinin yapılması ve botanik orijinlerinin doğrulanması önemlidir. Bu çalışmada, bal örneklerine katkı sağlayan bitki taksonlarının oranları baz alınarak yapılan kümeleme analizinde kestane poleni içeriğinin oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1). İlgili dendrogram incelendiğinde özellikle kestane poleni içermeyen 5 nolu örnek ile kestane polenini en düşük oranda içeren 1 nolu örneğin diğer numunelerden farklılık gösterdiği açıkça görülmektedir. Türkiye'nin Adapazarı ve Sinop illerinde üretilen bal örneklerinde yürütülen çalışmalarda da çalışmamıza benzer şekilde *Castanea sativa* poleni dominant olarak tespit edilmiştir (Erdoğan 2006 Özler 2015). Farklı bir çalışmada ise bal örneklerinde kestane polenin %92-97 arasında değişen bir dominantlık gösterdiği ve bunun dışında *Apiaceae*, *Trifolium* spp., *Medicago* spp. ve *Xanthium* spp. taksonlarına ait olan bitki polenlerinin teşhis edildiği belirtilmiştir (Temizer v.d. 2018). Özkök v.d. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise Türkiye'nin Artvin, Bartın, Kastamonu ve İstanbul illerinden toplanan kestane ballarında kestane poleni oranı %77,2 ila %98,5 arasında bulunmuştur. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar tıpkı bizim çalışmamızla benzer şekilde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'nde sunulan kriterleri karşılar şekilde kestane balının yoğun unifloral bir bal tipi olduğunu desteklemektedir. Fakat bazı çalışmalarda, kestane balı olarak isimlendirilen bal örnekleri yoğun unifloral (alt limit olarak en az %70 kestane poleni içeren bal)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

yerine normal unifloral bal olarak (alt limit olarak en az %45 kestane poleni içeren bal) sınıflandırılmıştır ki (Erkan Alkan, 2020) bu bal örneklerinin yeni revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne göre kestane balı olarak etiketlenmesi uygun değildir. Ek olarak Hırvatistan (Sabo v.d. 2011), İspanya (Rodríguez-Flores v.d. 2016) ve Sicilya (De Leonardis v.d. 2000) gibi farklı ülkelerde üretilen kestane ballarında kestane polenin bulunma sıklığının sırasıyla %21-97, %70,4-90,2 ve >%50 arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Silici ve Ülgen (2019) Bursa bölgesinden topladıkları bal örneklerinin

Castanea sativa poleni ile temsil edilme oranını %92,10 olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar ayrıca Zonguldak bölgesinden elde ettikleri bal örneğinin botanik orijinin *Tilia platyphyllos* poleniyle %41,43 oranında temsil edildiğini rapor etmişlerdir (Silici ve Ülgen 2019). Yukarıda bahsi geçen farklı çalışmaların sonuçlarıyla da desteklendiği gibi bizim çalışmamızda da aynı ilden elde edilmesine rağmen farklı lokasyonlarda üretilen kestane balı olarak tanımlanan örneklerin *Castanea sativa* poleni oranının (%71,42-94,78) oldukça farklılık gösterdiği görülmüştür.



Şekil 1. Zonguldak ilinden elde edilen bal örnekleri arasındaki benzerliğin dendrogramı

Figure 1. Dendrogram of similarity among the honey samples from Zonguldak province

Bal örneklerinin mikroskopik olarak değerlendirmesinde balların kalitesi ve kaynağı hakkında fikir veren bir diğer parametre bal örneklerinin toplam polen sayıdır. Toplam polen sayısı bakımından bal örnekleri üretildiği çiçek kaynaklarına ilişkin 5 farklı kategoride (Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V) sınıflandırılmaktadır (Paredes ve Bryant 2020, Jose v.d. 1989, Louveaux v.d. 1978). Paredes ve Bryant (2020)'a göre toplam polen sayıları bakımında bal örnekleri incelendiğinde genel olarak 10 g balda 20000'nin altında polen tanesi içeren bal örnekleri Grup I de yer alır. Grup I'de yer alan bal örnekleri genellikle az polen üreten bitki kaynaklarından üretilen balları, filtrelenmiş bal örneklerini, früktoz şurubuyla tağşiş edilmiş bal örneklerini veya salgı ballarını; Grup II' deki bal

örnekleri genel olarak normal düzeyde polen üretimine sahip olan farklı çiçek kaynaklarından üretilen balları; Grup III yüksek polen üretimine sahip olan bitki kaynaklarından üretilen bal örneklerini işaret edebileceği gibi petek gözlerinde saf polen tanelerinin bala karıştığı numuneleri; Grup IV ve V ise polen açısından son derece zengin olan birkaç çiçek kaynağından (örneğin *Myosotis sylvatica*, *Cynoglossum officinale* vb.) üretilen balları gösterir (Paredes and Bryant 2020). Ayrıca, Grup IV'te yer alan bal örnekleri için tağşişten şüphelenilebileceği ve bu nedenle bu bal örneklerinde ek kimyasal analizlerin yapılması gerektiği de rapor edilmiştir (Jose v.d. 1989, Sorkun 2008). Bizim çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde *Castanea sativa* poleni içeriği en yüksek oranda (%94,78) tespit

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

edilen 2 nolu bal örneğinin bu sonuca paralel olarak TPS-10 değeri de diğer bal örneklerinden daha yüksek (647312) olarak belirlenmiş olup Grup IV kategorisine eklenmiştir. Yüksek polen üretimine sahip bitki kaynaklarından üretilen ballar bu kategoride sınıflandırılmaktadır (Paredes ve Bryant 2020) ki kestanede yüksek polen üretimine sahip bitkiler arasındadır (Özkırım 2018). Bununla birlikte Grup III'te sınıflandırılan diğer üç bal örneği (3, 6 ve 7 nolu bal örnekleri) ise 2 nolu örneği takiben en yüksek TPS-10 değerine sahip numunelerdi. Bu durum, bala polen kaynağı olarak katkı sağlayan bitki türü çeşitlerinin ve oranlarının toplam polen sayısı üzerine önemli derecede etkili olduğunu işaret etmektedir. Benzer şekilde, %45'in üzerinde dominantlık gösteren bal örneklerinin kestane balı olarak sınıflandırıldığı bir çalışmada, bal örneklerinin TPS-10 değerleri 17380- 167772 arasında değişkenlik göstermiştir (Erkan Alkan, 2020). Ek olarak, Sakarya ilinin farklı lokasyonlarda üretilen 22 bal örneğinin TPS-10 değerleri 34472 -528061 olarak (Erdoğan v.d. 2006) ve Ankara'da üretilen *Castane sativa* polenin dominant olarak gözlemlendiğini bal örneğinin TPS-10 değeri 18848 olarak bizim çalışmamızdan daha düşük olarak rapor edilmiştir (Silici 2004). Ballardaki TPS-10 değerlerinin farklılık göstermesinin sebebi, farklı bölgelerin florasında yer alan bitki kaynaklarının farklılığı ile bu bitkilerin bala sağladığı katkının dominant, sekonder, minör ve eser oranlarda değişiklik göstermesi, arıların polen toplama becerisi, arıcıların balı işleme koşulları vb. nedenler gösterilebilir.

SONUÇ

Yüzyıllardır insanoğlu tarafından tüketilen doğal bir besin maddesi olması nedeniyle, balların kalite kriterlerinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu noktada Türkiye'de piyasaya arzı sağlanan balların bazı fizikokimyasal ve kimyasal parametreler açısından kalite kriterlerini sağlaması gerektiği ilgili kuruluşlar tarafından belirlenmiştir. Bununla birlikte, 2020 yılında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne yukarıda sayılan kriterlere ek olarak kestane balının da dahil olduğu bazı unifloral bal tipleri için polen analizi parametresi eklenmiştir. Yapılan bu değişiklik ballarda botanik orijin doğrulama çalışmalarında polen analizinin önemini bir kez daha ortaya çıkarmıştır. Bazı unifloral bal tipleri için Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne balların kalite

kriterleri arasına polen analizinin eklenmesinin doğru bir adım olduğu düşünülmekle birlikte, kapsamının genişletilmesine ihtiyaç vardır. Çünkü yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonuçlarında da görüleceği üzere, aynı bölgede üretilse bile, temelde arının tercih ettiği bitkisel kaynağın yoğunluğunun farklılığı nedeniyle hiçbir bal örneği bir diğeri ile aynı polen profiline dolayısıyla aynı içeriğe sahip değildir. Bu durum, zengin bitki çeşitliliğine sahip Türkiye'de oldukça farklı özellikleri olan unifloral bal tiplerinin üretildiğinin de bir göstergesidir. Bu nedenle, ülkemizde üretilen ve piyasada satılan lavanta, çörek otu, maydanoz, karaçalı ve karahindiba gibi farklı tipte unifloral bal tipleri için de polen profillemeye çalışmalarının yapılması ve bu bal tipleri için de Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No:2020/7)'ne limit değerler eklenmesi, haksız rekabetin önlenmesi ve tüketici haklarının korunması için gereklidir. Bu şekilde ülkemizde üretilen farklı unifloral bal tiplerinin bireysel özellikleri ortaya çıkarılarak daha yüksek katma değerli ürünler olarak satışına imkan tanınabilir. Çünkü unifloral bal tipleri sahip oldukları farklı aroma, renk ve birçok farklı biyoaktif özellikleri sebebiyle tüketiciler tarafından yoğun ilgi görmekte ve karışık çiçek ballarına kıyasla daha yüksek fiyatlara satılmaktadır.

Yazar Katkıları: *Fikir-* N.E.B., A.Ö; *Analiz ve/veya Yorum-* A.Ö, N.E.B.; *Literatür taraması-*N.E.B; *Makale yazımı-*N.E.B; *Eleştirel İnceleme-* A.Ö., N.E.B

Mali Kaynak: Bu çalışma Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birliği (ZAYBİR) tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Teşekkür

Bal örneklerinin toplanmasını ve gönderimini sağlayan Zonguldak İli Arı Yetiştiricileri Birliği (ZAYBİR) ile bölge arıcılarına ve melissopolinolojik analizlerin yapılmasını sağlayan Hacettepe Üniversitesi Arı ve Arı Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (HARÜM)'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Bayram, NE., Canlı, D., Gerçek, YC., Bayram, S., Çelik, S., Güzel, F., Morgili H., Oz, GC. 2020. Macronutrient and micronutrient levels and phenolic compound characteristics of unifloral

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- honey samples. *Journal of Food & Nutrition Research*, 59(4): 311-322.
- Biluca, FC., Braghini, F., Gonzaga, LV., Costa, ACO., Fett, R. 2016. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 50: 61-69, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>.
- Cagli, KE., Tufekcioglu, O., Sen, N., Aras, D., Topaloglu, S., Basar, N., Pehlivan, S. 2009. Atrioventricular block induced by mad-honey intoxication: confirmation of diagnosis by pollen analysis. *Texas Heart Institute Journal*, 36(4): 342.
- Corvucci, F., Nobili, L., Melucci, D., Grillenzoni, FV. 2015. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 169: 297-304, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.122>.
- De Leonardis, W., De Santis, C., Fichera, G., Fiumara, PMR., Longhitano, N., Zizza, A. 2000. Importance of *Castanea sativa* Mill, in honeys of central and north-eastern Sicily on the basis of the pollen grain analysis. *Ecologia mediterranea*, 26(1): 169-179, <https://doi.org/10.3406/ecmed.2000.1902>.
- Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delegue, MH., Dore, JC. 2004. Classification of unifloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86(2): 305-312, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.029>.
- Erdoğan, N., Pehlivan, S., Doğan, C. 2006. Pollen analysis of honeys from hendek-akyazı and kocaali districts of adapazarı province (Turkey). *Mellifera*, 6 (10-12): 20-27.
- Erkan Alkan, PE. 2020. Pollen analysis of chestnut honey in some provinces of the black sea region, Turkey. *Mellifera*, 20(2): 18-31.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, MC. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food chemistry*, 149: 84-90, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>.
- Güler, A., Demir, M. 2005. Beekeeping potential in Turkey. *Bee world*, 86(4): 114-119.
- Güneş, ME., Şahin, S., Demir, C., Borum, E., Tosunoğlu, A. 2017. Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Biochemistry*, 41(3): e12345, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12345>.
- Hailu, D., Belay, A. 2020. Melissopalynology and antioxidant properties used to differentiate *Schefflera abyssinica* and polyfloral honey. *Plos one*, 15(10): e0240868, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240868>.
- Hermanns, R., Mateescu, C., Thrasylvoulou, A., Tananaki, C., Wagener, FA., Cremers, NA. 2020. Defining the standards for medical grade honey. *Journal of Apicultural Research*, 59(2): 125-135, <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1693713>.
- <http://www.paldat.org/>, Erişim tarihi: 20.12.2020.
- Jose, MFD., Parent, J., Strachan, AA. 1989. Microscopic analysis of honeys from Manitoba, Canada, <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100819>.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978. International commission for bee botany of IUBS. Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59: 139-157, <https://doi.org/10.1080/0005772x.1978.11097714>.
- Machado, AM., Miguel, MG., Vilas-Boas, M., Figueiredo, AC. 2020. Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on unifloral honeys. *Molecules*, 25(2), 374, <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>.
- Moar, N. 1985. Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand journal of agricultural research* 28(1): 39-70, <https://doi.org/10.1080/00288233.1985.10426997>.
- Nicolson, SW., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.). 2007. *Nectaries and nectar* (Vol. 4). Dordrecht: Springer, <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5937-7>.
- Özkırım, A. 2018. Beekeeping in Turkey: Bridging Asia and Europe. In *Asian Beekeeping in the 21st Century* (pp. 41-69). Springer, Singapore, https://doi.org/10.1007/978-981-10-8222-1_2.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Özkök, A., Özenirler, Ç., Canlı, D., Mayda, N., Sorkun, K. 2018. Unifloral Features of Turkish Honeys According to Mellissopalynologic, Total Phenolic Acid and Total Flavonoid Content. *Gazi University Journal of Science*, 31(3): 713-723.
- Özler, H. 2015. Melissopalynological analysis of honey samples belonging to different districts of Sinop, Turkey. *Mellifera*, 15(1): 1-11.
- Paredes, R., Bryant, VM. 2020. Pollen analysis of honey samples from the Peruvian Amazon. *Palynology*, 44(2): 344-354, <https://doi.org/10.1080/01916122.2019.1604447>.
- Pita-Calvo, C., Vázquez, M. 2017. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59: 79-87, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.015>.
- Rodríguez-Flores, S., Escuredo, O., Seijo, MC. 2016. Characterization and antioxidant capacity of sweet chestnut honey produced in North-West Spain. *Journal of Apicultural Science*, 60(1): 19-30, <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0002>.
- Sabo, M., Potocnjak, M., Banjari, I., Petrovic, D. 2011. Pollen analysis of honeys from Varaždin County, Croatia. *Turkish Journal of Botany*, 35(5): 581-587, doi:10.3906/bot-1009-86.
- Sarıbaşı, M., Kaplan, A. 2008. Contribution on the flora of Zonguldak/Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 1(1): 40-65.
- Silici, S. 2004. Physicochemical and palynological analysis of honey samples belonging to different regions of Turkey. *Mellifera*, 4(7):44-50.
- Silici, S., Ülgen, N. 2019. Bioactive Properties of Blossom and Honeydew Honeys. *Mellifera*, 19(2): 43-54.
- Sorkun, K. 2008. Türkiye'nin Nektarlı bitkileri, polenleri ve balları. Ankara, Türkiye.
- Temizer, İK., Güder, A., Temel, F. A., Cüce, H. 2018. Antioxidant activities and heavy metal contents of *Castanea sativa* honey. *Global NEST Journal*, 20(3), 541-550, <https://doi.org/10.30955/gnj.002628>.
- TÜBİVES, 2021, <http://www.tubives.com/>, Erişim tarihi: 08.04.2021.
- Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/07). <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>.

Atıf/Citation: Bir S, Kekeçoğlu M, 2021. Arıcılık Faaliyetleri Etkisi Altında Düzce Bal Arısı Popülasyonlarındaki Varyasyonların Morfometrik Yöntem İle Araştırılması (The Investigation of Variations in Düzce Honey Bee Populations Under The Influence of Beekeeping Activities by Using Morphometric Method). U. Arı D./U. Bee J. 21:66-82, DOI: 10.31467/uluaricilik.904776

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ARICILIK FAALİYETLERİ ETKİSİ ALTINDA DÜZCE BAL ARISI POPÜLASYONLARINDAKİ VARYASYONLARIN MORFOMETRİK YÖNTEM İLE ARAŞTIRILMASI

The Investigation of Variations in Düzce Honey Bee Populations Under The Influence of Beekeeping Activities by Using Morphometric Method

Songül BİR¹, Meral KEKEÇOĞLU^{2,3*}

¹Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD, 81620-Konuralp yerleşkesi, Düzce/Türkiye, ORCID No: 0000-0002-4116-4138,

²Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 81620-Konuralp yerleşkesi, Düzce/Türkiye, ORCID No: 0000-0002-2564-8343, Yazışma Yazarı/Corresponding author: E-posta:meralkekecoglu@duzce.edu.tr

³Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (DAGEM), 81620-Konuralp yerleşkesi, Düzce/Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 19.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.904776

ÖZ

Bu çalışmanın amacı Batı Karadeniz’ de yer alan orman gülü, kestane florası ve Yığılca ekotipi ile arıcılıkta öne çıkan Düzce ili bal arısı biyolojik çeşitliliğinin mevcut durumunu ortaya koymaktır. Bu kapsamda Düzce İline ait ilçelerde yerel üreticiler tarafından kurulmuş arılıklardan toplanan 1440 işçi arı örneği geometrik morfometrik yöntemle incelendi. BAB BsPro200 programı kullanılarak, örneklerin sağ ön kanatlarına 19 landmark yerleştirildi. Landmarkların koordinatlarına göre açı, uzunluk ve indeks değerlerini içeren toplamda 31 morfometrik karakterin ölçümü otomatik olarak elde edildi. Bu morfometrik karakterlerin bireysel verileri ve koloni ortalamaları Diskriminant Fonksiyon Analizi (DFA) ile değerlendirilerek gruplar arası varyasyonlar belirlendi. Diskriminant Fonksiyon Analizi (DFA)’ne göre Merkez, Akçakoca ve Cumayeri ilçeleri koordinat düzlemi üzerinde birbirlerinden ve diğer ilçelerden belirgin olarak ayrıldı. Gümüşova-Çilimli ve Kaynaşlı-Yığılca ilçelerine ait grup merkezlerinin ikili gruplar şeklinde üst üste çakıştığı ve Gölyaka İlçesi ile yakın kümelenedikleri gözlemlendi. Koloni ortalamaları baz alınarak popülasyonlar arasındaki mahalanobis uzaklıklarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramında; Akçakoca, Yığılca, Merkez, Çilimli ve Gümüşova birlikte gruplanırken, Cumayeri, Gölyaka ve Kaynaşlı ise birlikte ayrı bir grup oluşturdu. Bu çalışma sonuçları Düzce merkez ve ilçelerinin ana arı ticareti ve göçer arıcılık faaliyetlerinden etkilendiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Apis mellifera* L, Biyoçeşitlilik, Morfometri, Düzce

ABSTRACT

The aim of this study is to reveal the current situation of honey bee biological diversity in Düzce province, which stands out in beekeeping with *Rhododendron* flora, chestnut flora and Yığılca ecotype in the Western Black Sea. In this context, geometric morphometric analyzes were carried out on 1440 worker honey bee samples collected from apiaries established by local producers in the districts of Düzce Province. By using the BAB BsPro200 program, landmark markings were made on the right

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

front wings of the prefixes, and datasets were obtained from 31 morphological character measures, including angle, length and index values of 19 different wing veining regions. Discriminant function analysis (DFA) was applied on individual data and colony averages, intra and intergroup variations were determined. According to the discriminant function analysis (DFA), Merkez, Akçakoca and Cumayeri districts differed significantly from each other and from other districts on the coordinate plane. It was observed that the group centers of Gümüşova-Çilimli and Kaynaşlı-Yığılca districts overlapped in two groups and clustered close to Gölyaka district. According to the UPGMA dendrogram created based on the colony averages of the districts; while Akçakoca, Yığılca, Merkez, Çilimli and Gümüşova were grouped together, Cumayeri, Gölyaka and Kaynaşlı formed a different group together. The results of this study showed that the center and districts of Düzce were affected by queen bee trade and migratory beekeeping activities.

Key words: *Apis mellifera*, Biodiversity, Morphometry, Düzce

EXTENDED ABSTRACT

Aim: Düzce is one of the prominent provinces of Turkey with its plant flora, mainly of chestnut and rhododendrons, and the Yığılca ecotype which has adapted to this flora. In many studies since 2007, the difference of Düzce / Yığılca honeybee ecotype has been mentioned. However, previous studies do not cover all districts of Düzce province. In this study, it was aimed to compare the Yığılca honeybee with Düzce in general by making a detailed sampling covering all districts of Düzce province, and to reveal whether the honeybee biodiversity of Düzce province has been affected morphometrically by uncontrolled beekeeping activities in recent days.

Material-method: A total of 1440 worker bee samples were studied from 24 apiaries and 72 colonies, covering 7 districts and the center of Düzce. By making landmark marking on the right front wings of the prefixes, a total of 31 morphological characters including angle, length and index values of 19 different wing veining regions were automatically measured with the BAB BsPro200 program. According to the obtained colony averages and individual data, data files were prepared and the relations of the populations with each other were evaluated using Discriminant Function Analysis (DFA) in the SPSS.15 package program. In addition, univariate analysis of variance (ANOVA) was performed in the SPSS package program to determine which characters are important in separating the populations. In addition, the UPGMA dendrogram was drawn by based on mahalanobis distance (D2).

Results: Discriminant function analysis was performed in terms of measured characters, taking into account colony averages and individual data. In the scatter plot drawn according to colony averages,

the first two functions explain 68.0% of the total variation, while in the scatter plot drawn according to individual data, the first two discriminant functions explain 79.8% of the total variation. The DA and PDK characters, which constitute the first two functions according to the colony averages, were found to be important characters in separating the populations. According to individual data, DA, PDK, K19, B4 characters were determined as important characters in separating populations. When 31 morphological characters were compared with ANOVA considering the colony averages, it was found that all districts differ from each other in terms of at least one character ($P < 0.05$). In terms of M17 and L13 characters, Cumayeri, RI, C, and DİU are Yığılca in terms of characters, and Akçakoca by DA and PDK characters.

Due to the discriminant function analysis, the centers of Gölyaka, Çilimli and Kaynaşlı districts are closer to each other than other districts and group members are intertwined. The group centers of Yığılca and Gölyaka districts are separate from each other and the group members are partially intertwined. The group centers of the Merkez, Akçakoca, Gümüşova and Cumayeri districts are separated from each other and from other districts and clustered around the group centers. In the scatter plot drawn, according to the individual data, group centers of Gümüşova-Çilimli, Kaynaşlı-Yığılca districts were overlapped, while Gölyaka clustered close to them. Individuals separated from the group center of Cumayeri district from other districts partially mixed with other provinces. The group centers of Merkez and Akçakoca districts separated from other provinces and individuals partially mixed with other districts and with each other. On the other hand, according to the UPGMA dendrogram, Akçakoca, Yığılca, Merkez, Çilimli and Gümüşova were

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

grouped together, while Cumayeri, Gölyaka and Kaynaşlı formed another group.

Conclusion: As clearly demonstrated in the scatter plot drawn according to individual data and colony averages, there were districts in honey bee populations in Düzce. The results of this study show that the center and districts of Düzce were affected by queen bee trade and migratory beekeeping activities. In order to prevent this situation, it is necessary to arrange legal measures urgently, to carry out migratory beekeeping activities in a controlled manner, and to expand the use of indigenous queen bees, especially within the geographical boundaries where there are different subspecies.

GİRİŞ

Bal arıları ilk kez Linnaeus (1758) tarafından *Apis mellifera* olarak tür düzeyinde sınıflandırılmıştır. Ruttner (1988) morfometrik verilere dayanarak 27 alttür tanımlamıştır. Günümüzde ise; morfometri ve mtDNA verilerine dayanarak yapılan çalışmalar sonucu alttür sayısı 29'a çıkarılmıştır (Ruttner 1988, 1992, Sheppard v.d. 1997, Sheppard ve Meixner 2003, Arias ve Sheppard 2005, Meixner v.d. 2011, Rahimi v.d. 2017, Rahimi v.d. 2018). Bugün için tanımlanan 29 alttürün yaklaşık %20 si Anadolu'da bulunmaktadır. Anadolu'nun Asya, Avrupa ve Afrika kıtaları arasında kavşak teşkil etmesi, coğrafik yapısı ve zengin bitki çeşitliliği bal arısı biyolojik çeşitliliğinin de zengin olmasını sağlayan nedenlerdendir.

Anadolu bal arısı biyolojik çeşitliliği ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar standart morfometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, Bodenheimer (1941) tarafından başlatılmıştır. Bodenheimer (1941) Türkiye'de 7 farklı bal arısı ekotipi olduğundan bahsetmiş, Maa (1953) ise 4 farklı ırkın doğal olarak yayılış gösterdiğini ileri sürmüştür. Settar (1983) tarafından Ege bölgesi için yapılan ayrıntılı çalışma sonuçlarına göre; Ege ve Marmara Bölgeleri'ne ait bal arısı popülasyonlarının bazı morfometrik karakterler bakımından Anadolu arısına yakın özellikler taşımasına rağmen, kısmen Anadolu arısından ayrıldığı bildirilmiştir. Ruttner (1988) tarafından az sayıda işçi arı örneğine dayalı morfometrik çalışmalarda Kuzeydoğu Anadolu'da *A. m. caucasica*, Güneydoğu Anadolu'da *A. m. meda*, Güneyde Hatay (Antakya) yöresinde *A. m. syriaca*, Anadolu'nun geri kalan kısmında ise *A. m.*

anatoliaca'nın yayılış gösterdiği ortaya konmuştur. Anadolu'da yayılış gösteren bu alt türlerin tanımlanmasına ilişkin ilk çalışmalar bacak, kanat ve dil uzunlukları ve tergit genişliği gibi klasik morfometrik karakterlerin ölçümüne dayanmaktadır (Settar 1983, Ruttner 1988, Karacaoğlu ve Fıratlı 1998, Gençer ve Fıratlı 1999, Güler ve Kaftanoğlu 1999a, b, c, Kandemir v.d. 2000, 2005, Güler 2000, Güler v.d. 2002, Güler ve Bek 2002, Kekeçoğlu v.d. 2007, Güler ve Toy 2008, Kekeçoğlu v.d. 2009, Kekeçoğlu ve Soysal 2010, Güler 2010, Güler v.d. 2013, Koca ve Kandemir 2013). Son yıllarda ise kanat üzerindeki damarların kesişim noktalarına yerleştirilen landmark tabanlı geometrik morfometrik ölçümler zaman ve işgücü bakımından avantajları nedeniyle daha fazla tercih edilir hale gelmiştir (Kekeçoğlu v.d. 2007, Kekeçoğlu 2018, Kambur ve Kekeçoğlu 2018a, b). Günümüzde morfometrik yöntemlere ek olarak mtDNA analizlerine yönelik genetik çalışmalar Trakya'da *A. m. carnica*'nın yayılış gösterdiğine işaret etmektedir (Smith 1997, Palmer v.d. 2000, Kandemir v.d. 2000, 2005, Ünal ve Özdiil 2018).

Türkiye'nin zengin bitki florası bölgelere bağlı olarak değişen farklı iklimatik yapısı nedeniyle belirtilen beş ırkın yanı sıra, morfolojik ve genetik özellikleri bakımından özelleşmiş lokal ekotipler de ortaya çıkmıştır. Muğla, Düzce/Yığılca, Trakya ve Efe ekotipleri bunlardan bazılarıdır (Kekeçoğlu 2010). Morfolojik ve genetik özelleşmelerin yanı sıra bal arısı ırk ve ekotipleri bazı fizyolojik ve davranış uyumları da göstermektedirler (Faria ve Gonçalves 2013). Bu uyumlar arasında en göze çarpanı bal verimidir. Yapılan çalışmalarda Düzce/Yığılca ekotipinin Anadolu ve Kafkas arısından daha yüksek bal verimine sahip olduğu, erken ilkbahar gelişiminin Anadolu ve Kafkas arısından daha iyi olduğu ortaya konmuştur (Gösterit v.d. 2012, 2016). Trakya ekotipinin Türkiye'de bulunan diğer arı ırklarına göre daha sakin olduğu; çam sezonuna uyum sağlamış olan Muğla ekotipinin ise Anadolu arısının bir ekotipi olduğu bildirilmiştir (Güler ve Kaftanoğlu 1999c). Söz konusu bu farklı özellikler bal arısı ve sürdürülebilir çevre açısından geleceğin güvencesidir ve korunmalıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ülkemiz bal arısı biyoçeşitliliğinin göçer arıcılık faaliyetleri, ticari ana arı temini ve kontrolsüz arıcılık uygulamalarından önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir (Kambur ve Kekeçoğlu 2018a, b, Kekeçoğlu 2018). Özellikle farklı ırk ve ekotiplerin bulunduğu lokasyonlarda

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

arıcılık faaliyetlerinin daha kontrollü yapılması, koruma alanlarına yabancı ırkların sokulmaması gerekmektedir. Düzce kestane ve orman gülü ağırlıklı bitki florası ve bu flora uyum sağlamış Yiğilca ekotipi ile öne çıkan illerimizden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Düzce/Yiğilca arısının davranış özellikleri bakımından farklılıklar taşıyan ve küçük bir alan içerisinde lokalize olmuş bir popülasyon olduğu ifade edilmektedir (Kekeçoğlu 2007, 2009, Tozkar 2020, Karabağ 2020). Mevcut çalışmaların çoğunluğu, Düzce'nin Yiğilca ilçesinden toplanmış az sayıda örneğe dayalı analizlerden ibarettir. Bu çalışmada Düzce ilinin tüm ilçelerini kapsayacak şekilde ayrıntılı bir örnekleme yapılmış, Düzce/Yiğilca arısı ile diğer ilçelerdeki bal arısı popülasyonları arasındaki farklılıklar ve Düzce bal arısı biyoçeşitliliğinin kontrolsüz arıcılık

faaliyetlerinden ne ölçüde etkilendiğinin morfometrik veriler ışığında ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Düzce il merkezi ve ilçelerine ait (Akçakoca, Gümüşova, Yiğilca, Gölyaka, Çilimli, Kaynaşlı ve Cumayeri) toplamda 24 arılık belirlendi. Her bir arılıktan 3'er koloni olacak şekilde toplam 72 koloniden, kovan önünden 20 örnek toplandı ve toplanan örnekler %96'lık alkol içerisinde laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen örnekler +4 derecede muhafaza edildi. Örneklerin toplandığı lokasyonlara ait koordinatlar, koloni ve birey sayıları tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Örneklerin toplandığı lokalitelere ait koordinatlar, koloni ve birey sayıları.

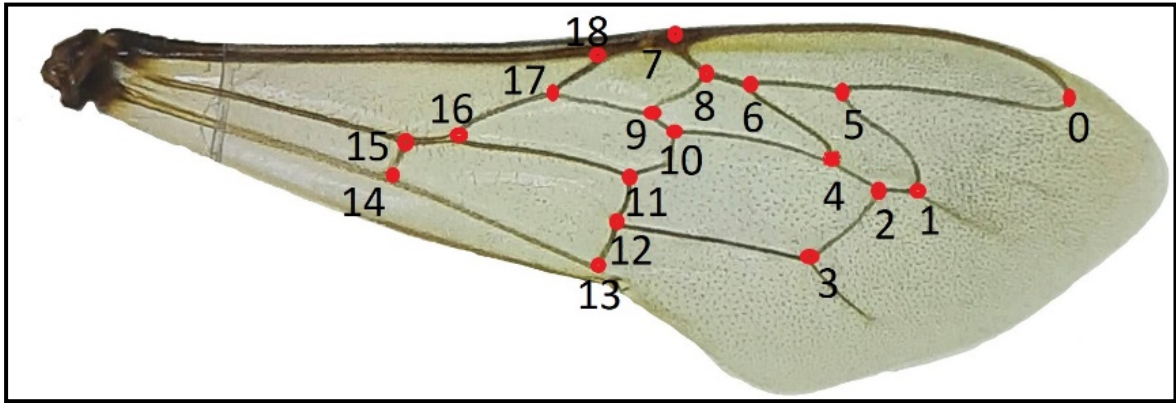
İlçe	Lokalite	X	Y	Koloni sayısı	Analiz edilecek işçi arı sayısı
Gümüşova	Dereköy	N40.80964	E30.92073	3	3 x 20
Gümüşova	Yeşilyayla	N40.79773	E30.87136	3	3 x 20
Gümüşova	Yongalık	N40.82239	E30.92320	3	3 x 20
Akçakoca	Hacı Yusufklar	N41.0502	E31.0534	3	3 x 20
Akçakoca	Çayağzı	N41.09576	E31.21917	3	3 x 20
Akçakoca	Akkaya	N41.09979	E31.25345	3	3 x 20
Çilimli	Dikmeli köyü	N40.85380	E31.08308	3	3 x 20
Çilimli	Esenli	N40.87066	E31.10318	3	3 x 20
Çilimli	Yenivakıf	N40.89919	E31.09790	3	3 x 20
Gölyaka	Çamlıbel	N40.74606	E31.02555	3	3 x 20
Gölyaka	Çayköyü	N40.75654	E30.93483	3	3 x 20
Gölyaka	Esenmahalle	N40.78412	E30.99457	3	3 x 20
Kaynaşlı	Darıyeri	N40.74993	E31.33587	3	3 x 20
Kaynaşlı	Çele Yakınları	N40.77360	E31.29051	3	3 x 20
Kaynaşlı	Eskiköy	N40.4605	E31.1946	3	3 x 20
Merkez	Kutlu Köyü	N40.77173	E31.15909	3	3 x 20
Merkez	Tokuşlar	N40.87954	E31.19171	3	3 x 20
Merkez	Orhangazi	N40.5438	E31.1009	3	3 x 20
Cumayeri	Tepeköyü	N40.88360	E31.01536	3	3 x 20
Cumayeri	Yukarıavlıyan	N40.89713	E30.94878	3	3 x 20
Cumayeri	Taşlık köyü	N40.5246	E30.5414	3	3 x 20
Yiğilca	Hoşafıoğlu köyü	N40.5638	E31.2337	3	3 x 20
Yiğilca	Merkez	N40.5738	E31.2631	3	3 x 20
Yiğilca	Kırık köyü	N40.5445	E31.2300	3	3 x 20
Toplam				72	1440

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

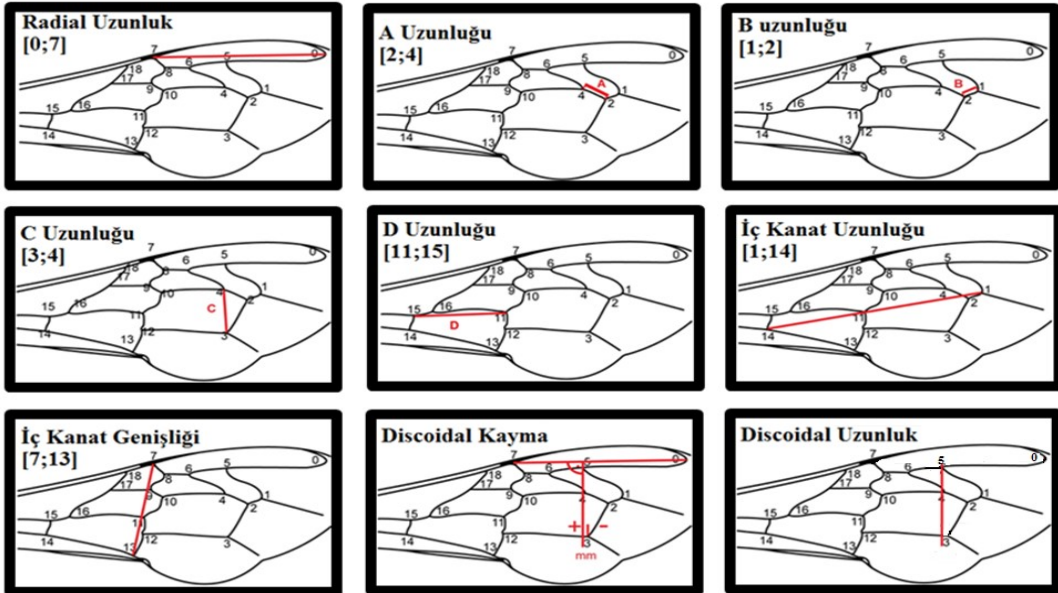
Morfometrik Analizler

Toplanan örneklerin sağ ön kanat preparatları her koloniden 20 örnek, 72 koloniden toplam 1440 örnek olacak şekilde hazırlandı (72x20=1440). Preparatların mikroskop altında resimleri çekildikten sonra bilgisayar ortamında bir klasör oluşturuldu. Daha sonra BAB BsPro200 Görüntü İşleme Ve Analiz programında her bir kanat üzerinde şekil 1'de gösterildiği gibi 19 landmark işaretlemesi yapıldı.

Referans kanat işaretlemesi yapıldıktan sonra diğer kanatların landmark işaretlemesi program tarafından otomatik olarak yapılmaktadır. Program uzunluk, indeks ve açı ölçümlerine ilişkin veri dosyalarını landmark işaretlemesine dayalı olarak otomatik olarak oluşturmaktadır. Landmarkların koordinatlarına göre program tarafından otomatik olarak ölçümü yapılan 31 morfometrik karakterin kanat üzerindeki yerleri şekil 2, 3 ve 4'te verilmiştir.

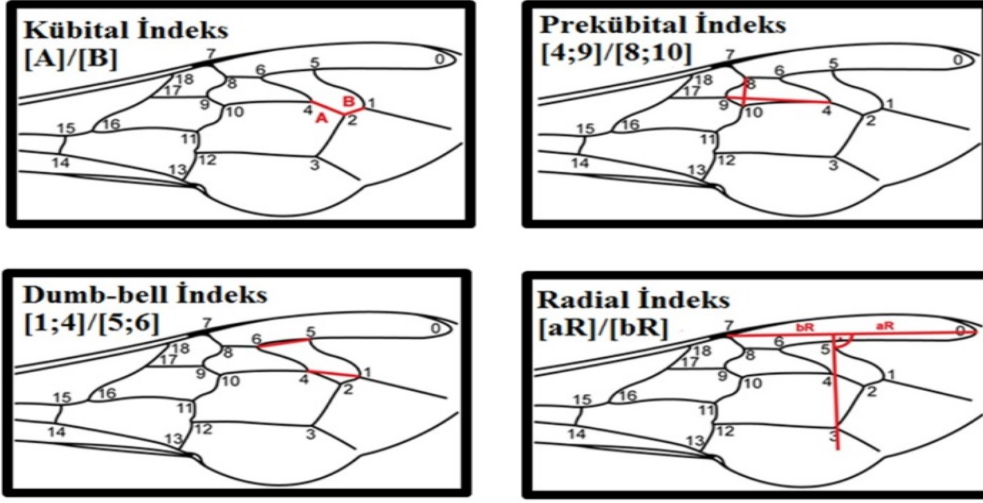


Şekil 1. Sağ Ön kanat üzerinde işaretlenen 19 landmarkın pozisyonu.

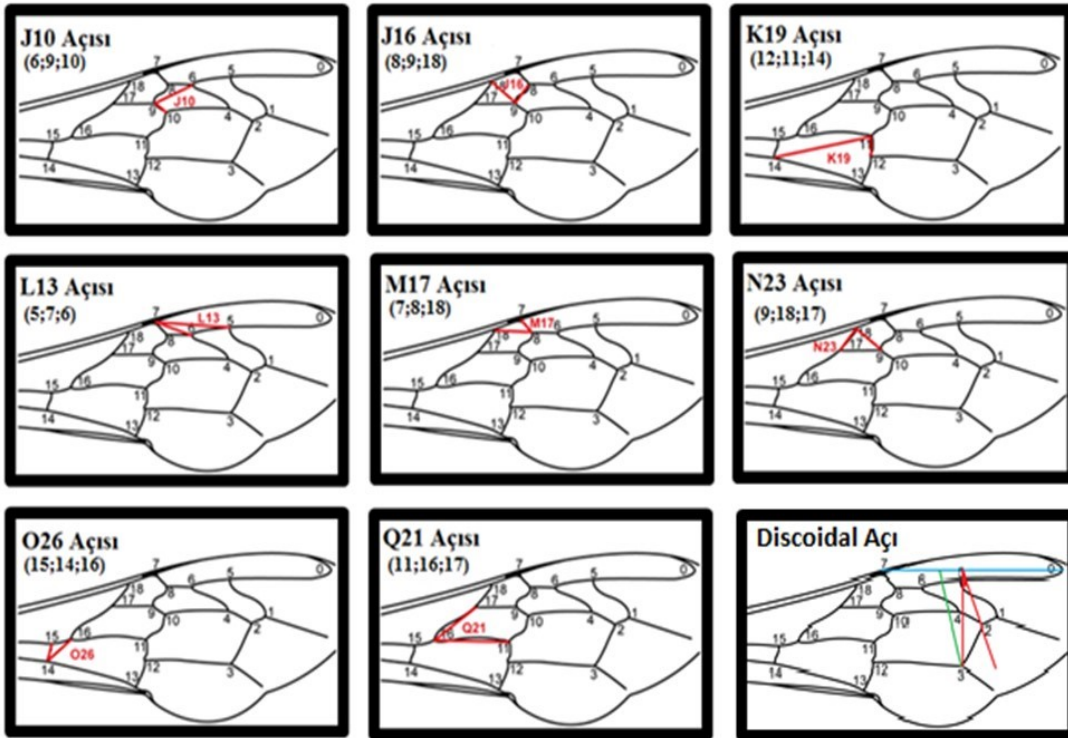


Şekil 2. Standart morfometri kapsamında değerlendirilen uzunluk karakterlerinin kanat şekli üzerinde gösterilmesi (Kambur 2017).

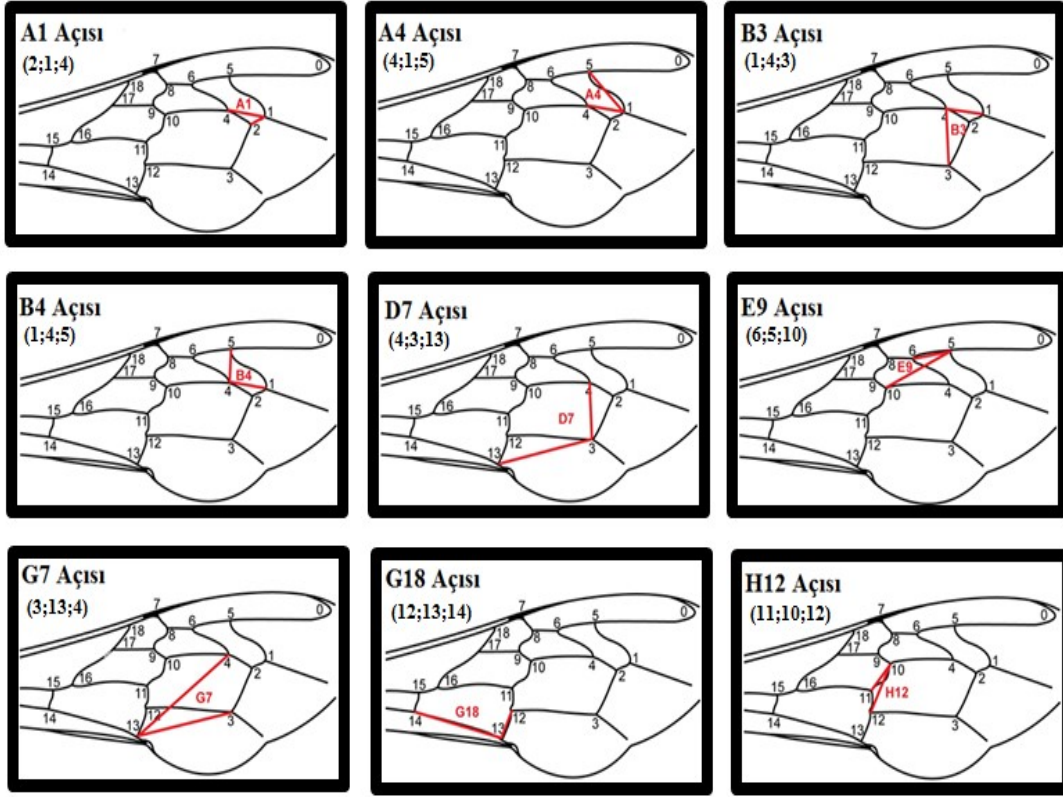
ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 3. Standart morfometri kapsamında değerlendirilen indeks karakterlerinin kanat şekli üzerinde gösterilmesi (Kambur 2017).



ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 4. Standart morfometri kapsamında değerlendirilen açı karakterlerinin kanat şekli üzerinde gösterilmesi (Kambur 2017).

İstatistiksel Analizler

Her bir kanat üzerindeki landmark işaretlemelerine dayalı program tarafından otomatik olarak oluşturulan 31 morfometrik karakter için bireysel veriler ve koloni ortalamaları bazında iki ayrı excel dosyası hazırlandı. SPSS-15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programında Diskriminant Fonksiyon Analizi (DFA) ile popülasyonların birbirlerinden farklılıkları gerek bireysel veriler gerekse koloni ortalamaları bazında değerlendirildi. Aynı zamanda SPSS paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA)/Tukey testi yapılarak popülasyonları ayırmada hangi karakterlerin önemli olduğu belirlendi. Ayrıca mahalalanobis uzaklığı (D2) hesaplanarak UPGMA (Sneath ve Sokal 1973) dendrogramı çizildi.

BULGULAR

Düzce ilinin merkez ve 7 ilçesine ait bal arısı popülasyonları 31 morfometrik karaktere göre değerlendirilmiş olup, tanımlayıcı istatistikleri (genel ortalamaları, standart hataları, minimum ve maksimum değerleri) açı (Tablo 2), uzunluk (Tablo 3), indeks (Tablo 4) için olmak üzere 3 ayrı kategoride verilmiştir.

Ön kanatta belirlenen 18 açı karakterleri incelendiğinde, A1 (26,07) ve G18 (93,37) için en yüksek değerler Gümüşova; A4 (35,66), N23 (96,17) ve O26 (43,10) için en yüksek değerler Akçakoca; B3(78,52), B4(102,18), D7(101,38), L13(15,78) ve M17(43,97) için en yüksek değerler Gölyaka; E9(20,37), G7(29,51) ve DA(16,59) için en yüksek değerler Merkez' de; H12 (18,36) ve J16 (96,97) için

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

en yüksek değerler Çilimli; J10 (59,09) ve Q21(37,91) için en yüksek değerler Yığılca ve K19(81,60) için en yüksek değer Cumayeri'nde tespit edildi (Tablo 2).

Ön kanada ait uzunluk değerleri incelendiğinde; Discoidal uzunluk (DİU) için en yüksek değer Yığılca (1,73), en düşük değer Akçakoca (1,62); radial uzunluk (RU) için en yüksek değer Yığılca (3,53), en düşük değer Gümüşova (3,41); A uzunluğu (A) için en yüksek değer Çilimli (0,58), en düşük değer Gölyaka (0,52); B uzunluğu (B) için en yüksek değer Yığılca (0,28), en düşük değer Akçakoca, Çilimli ve Gümüşova (0,25); C uzunluğu (C) için en yüksek değer Yığılca (0,96), en düşük değer Akçakoca (0,88); D uzunluğu (D) için en yüksek değer Kaynaşlı (1,99), en düşük değer Gümüşova (1,92); iç kanat uzunluğu (İKU) için en yüksek değer Yığılca (4,54), en düşük değer Gümüşova (4,42); iç kanat genişliği (İKG) için en yüksek değer Yığılca (2,13), en düşük değer Akçakoca (2,01) ilçeleri için belirlendi (Tablo 3).

Her ilçe için en yüksek ve en düşük indeks değerleri incelendiğinde; Kübital indeks (Kİ) için en yüksek değer Çilimli (2,39), en düşük değer Gölyaka (2,02); prekübital indeks (PKİ) için en yüksek değer Çilimli ve Gölyaka (2,76), en düşük değer Yığılca (2,65); dumb-bell indeks (DBİ) için en yüksek değer Gümüşova (1,03), en düşük değer Akçakoca ve Merkez (0,91); radial indeks (Rİ) için en yüksek değer Yığılca (1,77), en düşük değer Akçakoca (1,67); pozitif yönde disscoidal kayma (PDK) için en yüksek değer Merkez (0,49), en düşük değer Çilimli (0,34) ilçelerinde bulundu (Tablo 4).

Düzce ilini temsilen, 31 standart morfometrik karakterin ortalama değerleri hesaplandı. Buna göre karakterlerin; A1; 24,28, A4; 33,75, B3; 77,31, B4; 99,55, D7; 99,21, E9; 19,73, G7; 25,40, G18; 89,32, H12; 17,08, J10; 55,26, J16; 94,04, K19; 77,63, L13; 14,64, M17; 41,14, N23; 92,26, O26; 40,72, Q21; 37,34, DA; 12,98, Kİ; 2,17, PKİ; 2,73, DBİ; 0,95, Rİ; 1,71, PDK; 0,39, DİU; 1,67, RU; 3,46, A; 0,55, B; 0,26, C; 0,91, D; 1,96, İKU; 4,47, İKG; 2,07 değerlerini aldıkları tespit edildi.

Tablo 2. Ön kanat açılarının ilçeler bazında ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerleri

7			A1	A4	B3	B4	D7	E9	G7	G18	H12
İL	Koloni sayısı	Birey sayısı (N)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)
Akçakoca	9	180	23,67±0,30 (22,24-24,81)	35,66 ±0,48 (33,88-37,66)	78,08 ±0,33 (76,72-79,96)	95,98 ±0,77 (93,02-100,77)	98,33 ±0,45 (96,95-101,33)	19,28 ±0,24 (17,61-20,12)	24,28 ±0,14 (23,43-24,84)	87,84 ±0,60 (85,28-90,54)	17,31 ±0,33 (16,31-19,14)
Cumayeri	9	180	22,77 ±0,50 (20,57-25,32)	34,74 ±0,50 (32,73-37,16)	77,76 ±0,70 (73,91-79,94)	97,32 ±0,87 (94,00-100,68)	99,86 ±0,49 (98,19-102,03)	20,34 ±0,14 (19,43-20,82)	25,45 ±1,49 (23,24-37,32)	87,62 ±0,54 (85,17-90,09)	16,81 ±0,19 (15,98-17,62)
Çilimli	9	180	24,10 ±0,37 (22,36-25,49)	33,26 ±0,27 (32,51-34,95)	76,10 ±0,39 (74,77-77,95)	99,17 ±0,61 (97,18-102,97)	97,96 ±0,45 (96,13-99,64)	19,93 ±0,31 (18,71-21,48)	24,84 ±0,14 (24,22-25,58)	91,23 ±0,52 (88,42-92,78)	18,36 ±0,19 (16,99-18-94)
Gölyaka	9	180	23,21 ±0,56 (20,07-25,37)	34,05 ±0,35 (32,10-35,60)	78,52 ±0,75 (75,72-82,02)	102,18 ±0,80 (98,65-104,35)	101,38 ±0,49 (99,65-103,70)	18,36 ±0,17 (17,58-19,07)	24,02 ±0,18 (23,23-24,68)	86,46 ±0,34 (84,49-87,52)	15,50 ±0,29 (14,52-17,26)
Gümüşova	9	180	26,07 ±0,30 (24,87-27,83)	32,74 ±0,36 (30,78-34,10)	76,56 ±0,58 (74,51-79,21)	102,14 ±0,74 (98,98-104,78)	97,45 ±0,61 (94,86-100,09)	19,92 ±0,41 (18,55-22,21)	25,08 ±0,89 (23,69-32,11)	93,37 ±1,02 (88,22-97,06)	17,18 ±0,31 (15,76-18,37)
Kaynaşlı	9	180	24,83 ±0,40 (22,92-26,43)	32,73±0,27 (31,34-33,77)	78,32 ±0,64 (76,35-81,54)	101,63 ±0,69 (97,98-104,98)	101,03 ±0,56 (99,30-104,40)	19,78 ±0,12 (19,22-20,29)	24,67 ±0,77 (23,40-30,80)	90,87 ±0,29 (89,74-92,45)	18,35 ±0,34 (16,72-19,88)
Merkez	9	180	24,92 ±1,35 (18,50-29,16)	34,74 ±0,21 (33,90-35,91)	76,83 ±0,38 (74,82-78,32)	96,63 ±0,46 (93,75-99,10)	99,04 ±0,47 (96,39-100,82)	20,37 ±0,18 (19,62-21,44)	29,51 ±2,10 (23,75-37,79)	89,46 ±0,51 (87,48-92,59)	17,02 ±0,10 (16,46-17,51)
Yığılca	9	180	24,66 ±0,33 (23,47-26,81)	32,10 ±0,33 (30,59-37,66)	76,30 ±0,36 (74,78-77,77)	101,35 ±0,80 (97,69-105,19)	98,67 ±0,36 (97,40-100,42)	19,83 ±0,16 (18,94-20,57)	25,38 ±0,15 (24,40-25,90)	87,62 ±0,58 (85,54-91,25)	16,09 ±0,36 (14,47-18,16)
Ortalama	72	1440	24,28 ±0,24 (18,50-29,16)	33,75 ±0,18 (30,59-37,66)	77,31 ±0,21 (73,91-82,02)	99,55 ±0,38 (93,02-105,19)	99,21 ±0,23 (94,86-104,40)	19,73 ±0,11 (17,58-22,21)	25,40 ±0,39 (23,23-37,79)	89,32 ±0,33 (84,49-97,06)	17,08 ±0,14 (14,47-19,88)
			J10	J16	K19	L13	M17	N23	O26	Q21	DA
İL	Koloni sayısı	Birey sayısı (N)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)	X ± Sx (Min.-Max.)
Akçakoca	9	180	57,45±0,87 (52,41-61,98)	95,59±0,49 (93,12-97,50)	74,54±0,70 (71,76-77,71)	15,06±0,30 (13,51-16,44)	42,41±0,69 (40,02-45,88)	96,17±1,01 (92,86-100,97)	43,10±0,69 (39,06-45,75)	36,55±0,20 (35,57-37,42)	13,89±0,28 (12,43-15,43)
Cumayeri	9	180	51,88±0,48 (49,64-54,14)	93,46±0,51 (91,82-96,03)	81,60±0,41 (78,93-82,69)	12,35±0,14 (11,73-12,89)	37,26±0,42 (35,30-39,22)	90,73±0,42 (88,34-92,03)	42,26±0,86 (37,01-44,51)	37,67±0,32 (36,59-39,62)	13,42±0,19 (12,65-14,25)
Çilimli	9	180	53,00±0,59 (49,51-56,28)	96,97±0,61 (94,40-98,58)	78,96±0,36 (77,06-80,52)	14,91±0,14 (14,23-15,53)	40,91±0,46 (38,92-43,35)	92,43±0,69 (90,39-96,57)	40,52±0,27 (39,16-41,65)	37,42±0,36 (35,69-39,37)	11,54±0,18 (10,94-12,64)
Gölyaka	9	180	54,11±0,35 (52,66-56,04)	92,51±0,57 (90,33-95,21)	76,34±0,60 (74,36-80,34)	15,78±0,16 (15,35-16,93)	43,97±0,24 (42,94-45,06)	91,49±0,35 (89,87-93,17)	42,99±0,39 (41,67-45,36)	37,29±0,29 (36,35-38,65)	13,38±0,15 (12,62-14,05)
Gümüşova	9	180	53,00±0,59 (49,51-56,28)	93,27±0,45 (21,02-95,49)	77,77±0,58 (74,98-79,88)	14,25±0,13 (13,68-14,98)	41,47±0,57 (39,11-44,44)	89,62±0,38 (87,42-91,34)	38,73±0,42 (35,98-40,36)	37,46±0,24 (36,37-38,21)	10,85±0,27 (9,63-13,28)
Kaynaşlı	9	180	55,21±0,49 (52,79-57,24)	96,34±0,34 (94,35-97,66)	79,52±0,53 (78,15-82,81)	14,31±0,21 (13,10-15,05)	39,63±0,41 (37,83-41,22)	92,08±0,29 (91,08-93,59)	39,47±0,38 (38,20-41,37)	37,02±0,21 (36,26-38,18)	11,89±0,29 (11,71-13,19)
Merkez	9	180	57,71±0,69 (54,03-60,37)	91,09±0,70 (87,10-94,12)	75,96±0,26 (75,01-77,49)	15,06±0,15 (14,50-15,88)	43,57±0,47 (41,56-45,91)	90,92±0,71 (87,06-93,66)	39,91±0,41 (37,78-42,41)	37,37±0,25 (36,31-38,52)	16,59±0,17 (15,66-17,11)
Yığılca	9	180	59,09±0,62 (56,35-61,79)	93,09±0,13 (92,33-93,54)	76,39±0,63 (74,45-80,98)	15,40±0,17 (14,61-16,00)	39,92±0,48 (38,08-41,88)	94,15±0,60 (90,10-95,62)	38,73±0,68 (34,93-41,45)	37,91±0,38 (36,45-40,31)	12,28±0,28 (15,62-13,50)
Ortalama	72	1440	55,26±0,36 (48,90-61,98)	94,04±0,28 (87,10-99,58)	77,63±0,31 (71,76-82,81)	14,64±0,13 (11,73-16,93)	41,14±0,29 (35,30-45,91)	92,26±0,31 (87,06-100,97)	40,72±0,27 (34,93-45,75)	37,34±0,10 (35,57-40,31)	12,98±0,21 (9,63-17,11)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1. Ön kanat uzunluklarının ilçeler bazında ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerleri (mm).

İL	Koloni sayısı	Birey sayısı (N)	DIU X ± Sx (Min.-Max.)	RU X ± Sx (Min.-Max.)	A X ± Sx (Min.-Max.)	B X ± Sx (Min.-Max.)	C X ± Sx (Min.-Max.)	D X ± Sx (Min.-Max.)	İKU X ± Sx (Min.-Max.)	İKG X ± Sx (Min.-Max.)
Akçakoca	9	180	1,62±0,01 (1,60-1,64)	3,46±0,01 (3,34-3,52)	0,56 ±0,0 (0,53-0,58)	0,25 ±0,00 (0,24-0,27)	0,88 ±0,00 (0,86-0,90)	1,97 ±0,01 (1,89-2,02)	4,44 ±0,01 (4,37-4,49)	2,01 ±0,01 (1,97-2,04)
Cumayeri	9	180	1,65±0,01 (1,61-1,68)	3,44±0,02 (3,33-3,50)	0,55 ±0,01 (0,53-0,58)	0,27 ±0,00 (0,26-0,28)	0,89 ±0,00 (0,86-0,90)	1,96 ±0,01 (1,87-1,99)	4,44 ±0,02 (4,31-4,57)	2,07 ±0,01 (2,01-2,11)
Çilimli	9	180	1,67±0,00 (1,66-1,68)	3,44±0,02 (3,33-3,51)	0,58 ±0,01 (0,55-0,62)	0,25 ±0,00 (0,23-0,26)	0,91 ±0,00 (0,89-0,92)	1,96 ±1,01 (1,86-2,00)	4,47 ±0,02 (4,33-4,52)	2,06 ±0,00 (2,04-2,08)
Gölyaka	9	180	1,66±0,01 (1,63-1,70)	3,44±0,01 (3,40-3,49)	0,52 ±0,01 (0,48-0,54)	0,26 ±0,00 (0,25-0,27)	0,89 ±0,01 (0,87-0,92)	1,97 ±0,01 (1,97-2,00)	4,43 ±0,02 (4,37-4,57)	2,06 ±0,01 (2,02-2,10)
Gümüşova	9	180	1,68±0,01 (1,63-1,78)	3,41±0,01 (3,37-3,46)	0,56 ±0,01 (0,53-0,64)	0,25 ±0,00 (0,24-0,26)	0,90 ±0,01 (0,88-0,96)	1,92 ±0,01 (1,89-1,95)	4,42 ±0,02 (4,35-4,54)	2,06 ±0,01 (2,03-2,13)
Kaynaşlı	9	180	1,69±0,01 (1,67-1,73)	3,51±0,02 (3,41-3,56)	0,55 ±0,01 (0,52-0,58)	0,26 ±0,00 (0,25-0,28)	0,91 ±0,01 (0,89-0,93)	1,99 ±0,01 (1,94-2,02)	4,53 ±0,01 (4,48-4,58)	2,10 ±0,01 (2,08-2,15)
Merkez	9	180	1,63±0,00 (1,61-1,66)	3,45±0,01 (3,40-3,52)	0,55 ±0,01 (0,50-0,58)	0,27 ±0,00 (0,25-0,28)	0,90 ±0,00 (0,88-0,92)	1,97 ±0,01 (1,92-2,02)	4,46 ±0,01 (4,48 -4,59)	2,07 ±0,00 (2,05-2,08)
Yığılca	9	180	1,73±0,00 (1,71-1,75)	3,53±0,01 (3,48-3,59)	0,57 ±0,01 (0,55-0,60)	0,28 ±0,00 (0,23-0,29)	0,96 ±0,01 (0,93-0,98)	1,98 ±0,01 (1,94-2,01)	4,54 ±0,01 (4,48-4,59)	2,13 ±0,00 (2,12-2,14)
Ortalama	72	1440	1,67±0,00 (1,60-1,78)	3,46±0,01 (3,33-3,59)	0,55 ±0,00 (0,48-0,64)	0,26 ±0,00 (0,23-0,29)	0,91 ±0,00 (0,86-0,98)	1,96 ±0,00 (1,86-2,02)	4,47 ±0,01 (4,31-4,59)	2,07 ±0,00 (1,97-2,15)

Tablo 2; Ön kanat indekslerinin ilçeler bazında ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerleri.

İL	Koloni sayısı	Birey sayısı (N)	Kİ X ± Sx (Min.-Max.)	PKİ X ± Sx (Min.-Max.)	DBİ X ± Sx (Min.-Max.)	Rİ X ± Sx (Min.-Max.)	PDK X ± Sx (Min.-Max.)
Akçakoca	9	180	2,30 ±0,04 (2,06-2,44)	2,72 ±0,03 (2,64-2,91)	0,91 ±0,01 (0,87-0,95)	1,67±0,01 (1,64-1,69)	0,40±0,01 (0,36-0,45)
Cumayeri	9	180	2,05 ±0,02 (1,96-2,15)	2,75 ±0,01 (2,68-2,80)	0,97 ±0,01 (0,93-1,03)	1,70±0,01 (1,66-1,73)	0,40±0,01 (0,37-0,42)
Çilimli	9	180	2,39 ±0,05 (2,24-2,63)	2,76 ±0,03 (2,68-2,89)	0,98 ±0,01 (0,94-1,02)	1,70±0,00 (1,69-1,71)	0,34±0,01 (0,32-0,38)
Gölyaka	9	180	2,02 ±0,03 (1,86-2,13)	2,76 ±0,02 (2,70-2,83)	0,92 ±0,01 (0,87-0,96)	1,71±0,01 (1,66-1,74)	0,40±0,01 (0,37-0,41)
Gümüşova	9	180	2,29 ±0,05 (2,10-2,47)	2,74 ±0,02 (2,64-2,84)	1,03 ±0,02 (0,93-1,17)	1,70±0,01 (1,66-1,80)	0,32±0,01 (0,28-0,36)
Kaynaşlı	9	180	2,13 ±0,04 (1,94-2,37)	2,70 ±0,02 (2,70-2,90)	0,94 ±0,01 (0,93-0,98)	1,73±0,01 (1,71-1,77)	0,36±0,01 (0,33-0,40)
Merkez	9	180	2,09 ±0,04 (1,91-2,31)	2,70 ±0,01 (2,67-2,77)	0,91 ±0,01 (0,83-0,94)	1,72±0,00 (1,70-1,74)	0,49±0,01 (0,46-0,51)
Yığılca	9	180	2,10 ±0,04 (1,98-2,27)	2,65 ±0,01 (2,58-2,72)	0,96 ±0,01 (0,94-0,98)	1,77±0,01 (1,74-1,79)	0,38±0,01 (0,33-0,42)
	72	1440	2,17 ±0,02 (1,86,2,63)	2,73 ±0,02 (2,58-2,91)	0,95 ±0,01 (0,83-1,17)	1,71±0,00 (1,64-1,80)	0,39±0,01 (0,28-0,51)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

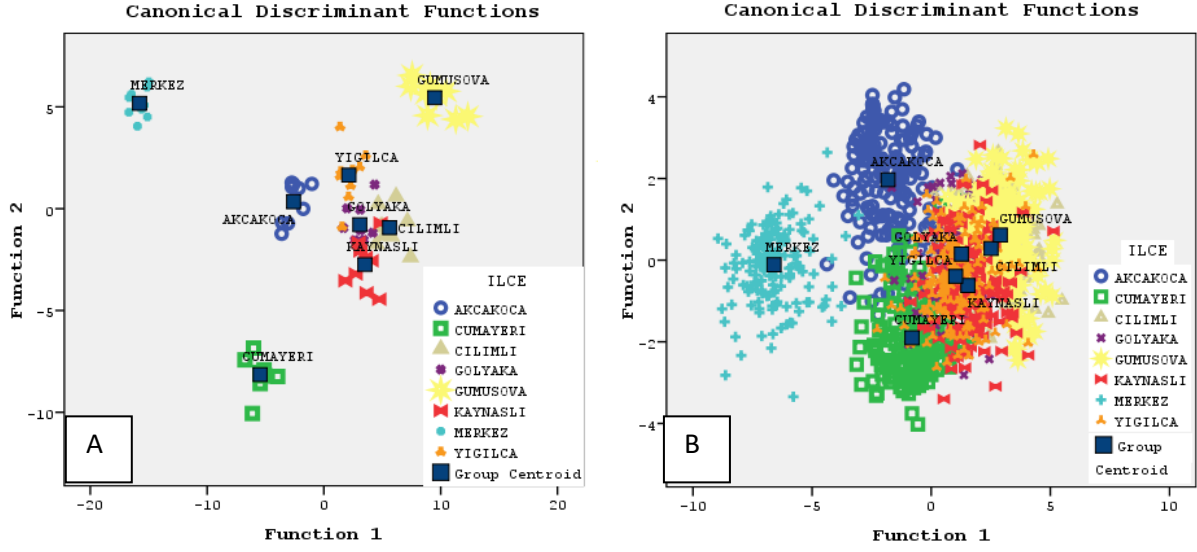
Ölçümü yapılan karakterler bakımından koloni ortalamaları ve bireysel veriler dikkate alınarak diskriminant fonksiyon analizi yapılmıştır. Koloni ortalamalarına göre çizilen iki boyutlu serpilme diyagramında ilk iki diskriminant fonksiyonu toplam varyasyonun %68,0'ini açıklarken bireysel verilere göre çizilen iki boyutlu serpilme diyagramında ilk iki diskriminant fonksiyonu toplam varyasyonun %79,8'sini açıklamaktadır. Koloni ortalamalarına göre ilk iki fonksiyonu oluşturan DA ve PDK karakterleri popülasyonları ayırmada önemli karakterler olarak bulunmuştur. Bireysel verilere göre ise DA, PDK, K19, B4 karakterleri popülasyonları ayırmada önemli karakterler olarak belirlenmiştir (Tablo 5). Bal arısı örneklerinin koloni ortalamaları dikkate alınarak iki boyutlu ortamda dağılımını incelemek amacıyla varyasyonun %68,0'ini açıklayan ilk iki diskriminant fonksiyonuna göre iki boyutlu serpilme diyagramı çizildi. Diyagrama göre tüm ilçelerin grup merkezleri birbirinden ayrılmıştır (Şekil 5/A). Şekil 5/A incelendiğinde Gölyaka, Çilimli ve Kaynaşlı ilçelerinin merkezleri diğer ilçelere göre birbirlerine

daha yakın konumlanmış olup grup üyeleri iç içe geçmiştir. Yığılca ve Gölyaka ilçelerinin grup merkezleri birbirinden ayrı ve grup üyeleri kısmen iç içe geçmiştir. Merkez, Akçakoca, Gümüşova ve Cumayeri ilçelerinin grup merkezleri birbirlerinden ve diğer ilçelerden ayrılmış ve grup merkezleri etrafında kümelenmiştir. Bireysel verilere göre çizilen iki boyutlu serpilme diyagramında ise Gümüşova-Çilimli, Kaynaşlı-Yığılca ilçelerinin grup merkezleri çakışmış, Gölyaka ise onlara yakın kümelenmiştir. Cumayeri ilçesinin grup merkezi diğer ilçelerinden ayrılmış bireyler kısmen diğer illerle karışmıştır. Merkez ve Akçakoca ilçelerinin grup merkezleri diğer illerden ve birbirlerinden ayrılmış bireyleri kısmen diğer ilçelerle ve birbirleriyle karışmıştır (Şekil 5/B).

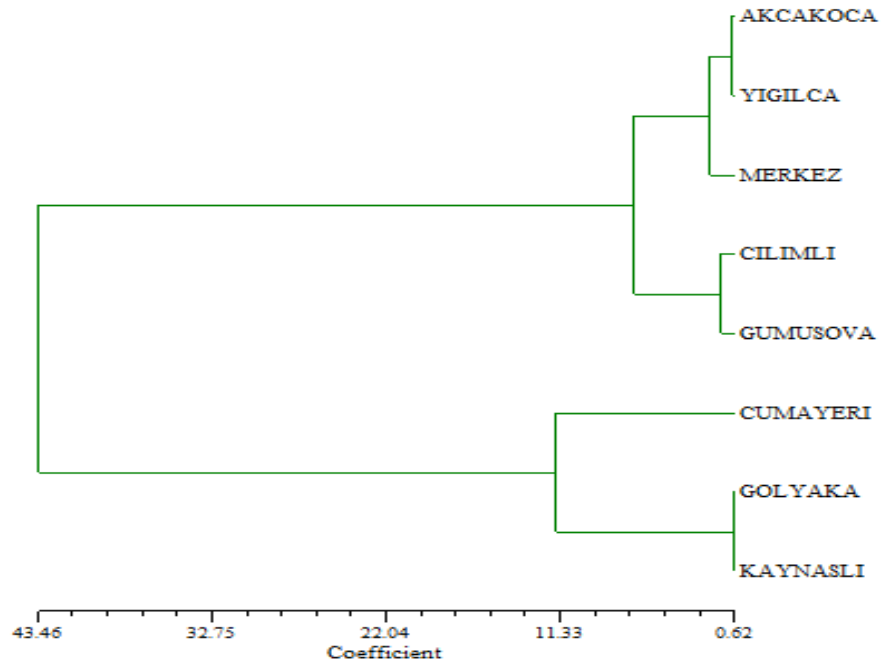
Koloni ortalamaları baz alınarak popülasyonlar arasındaki mahalanobis uzaklıklarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramında ise; Akçakoca, Yığılca, Merkez, Çilimli ve Gümüşova birlikte gruplanırken, Cumayeri, Gölyaka ve Kaynaşlı ise birlikte bir grup oluşturdu (Şekil 6).

Tablo 3. Geometrik morfometrik karakterlerin il popülasyonları düzeyinde koloni ortalamaları(a) ve bireylere(b) göre belirlenen fonksiyon sayıları ve bu fonksiyonları ifade eden değerler.

Fonksiyon sayısı	Özdeğer	Varyasyon değeri (%)	Kümülatif değeri (%)	Kanonikal korelasyon	Wilks' Lambda	Ki-kare	df	Önem düzeyi (P)
1a	60,983	51,9	51,9	,992	,000	874,781	217	,000
1b	8,441	70,8	70,8	,946	,008	6901,365	231	,000
2a	18,947	16,1	68,0	,975	,000	662,248	180	,000
2b	1,072	9,0	79,8	,719	,073	3716,773	192	,000
3a	15,032	12,8	80,8	,968	,000	508,106	145	,000
3b	1,872	7,3	87,1	,683	,151	2683,368	155	,000
4a	9,541	8,1	88,9	,951	,001	365,214	112	,000
4b	0,631	5,3	92,4	,622	,282	1793,951	120	,000
5a	7,398	6,3	95,2	,939	,009	243,918	81	,000
5b	0,481	4,0	96,4	,570	,460	1100,329	87	,000
6a	3,945	3,4	98,5	,893	,074	134,329	52	,000
6b	0,256	2,1	98,6	,452	,682	543,048	56	,000
7a	1,745	1,5	100,0	,797	,364	52,009	25	,001
7b	0,167	1,4	100,0	,379	,857	219,590	27	,000



Şekil 5. (A) Koloni ortalamalarına göre popülasyonların iki boyutlu serpilme diyagramı (B) Bireysel verilere göre popülasyonların iki boyutlu serpilme diyagramı.



Şekil 6. Popülasyonların UPGMA dendrogramı

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 5'te koloni ortalamaları incelendiğinde 7 fonksiyondan 7'si de önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 7 diskriminant fonksiyondan birincisi toplam varyasyonun %51,9'unu, ikinci fonksiyon %16,1'ini açıklamaktadır. Birinci fonksiyonda discodial açığı ve pozitif yönde discodial kayma, üçüncü fonksiyonda J16 ve B4 açıları, dördüncü fonksiyonda C ve D uzunlukları, iç kanat genişliği ve uzunluğu, radial indeks, radial uzunluk, discodial uzunluk, beşinci fonksiyonda dumb-bell indeks, L13, M17, O26, E9, K19, A4 ve A1, altıncı fonksiyonda B uzunluğu, prekübital indeks, N23, G18, J10 ve H12 açıları, yedinci fonksiyonda kübital indeks, A uzunluğu, D7, Q21 ve G7 açıları ayırt edici karakterler olarak belirlendi.

31 morfometrik karakter, koloni ortalamaları dikkate alınarak ANOVA ile karşılaştırıldığında en az bir karakter bakımından tüm ilçelerin birbirinden farklılığı önemli ($P < 0,05$) bulunmuştur. M17 ve L13 karakterleri bakımından Cumayeri, Rİ, C, ve DİU karakterleri bakımından Yığılca, İKG karakteri bakımından Akçakoca, DA ve PDK karakterleri bakımından Merkez diğer ilçelerden ayrılmıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada ANOVA'ya göre en az bir karakter bakımından popülasyonlar birbirinden önemli düzeyde farklı bulunmuştur ($P < 0,05$). M17 ve L13 karakterleri bakımından Cumayeri, Rİ, C ve DİU karakterleri bakımından Yığılca, İKG karakteri bakımından Akçakoca, DA ve PDK karakterleri bakımından Merkez diğer ilçelerden ayrılmıştır. Yapılan önceki çalışmalarda bazı karakterler (scutellum rengi; A4, B4 ve AREA6) Türkiye'de doğal olarak bulunan ırk ve ekotipleri ayırt etmede önemli morfometrik belirteçler olarak belirlenmiştir (Güler v.d. 2012, Gür v.d. 2018). Kekeçoğlu (2007) ise kübital indeks (CI) ve ön kanat uzunluğu karakterlerinin önemli belirteçler olduğunu bildirmiştir. Kekeçoğlu (2007)'nin Düzce/Yığılca için kübital indeks (2,282) değeri bu çalışmada bulunan kübital indeks değerinden (2,10) daha yüksek bulunmuştur. Gür v.d. (2018) ile uyumlu olarak, bu çalışmada B4 açısının popülasyonları ayırmada önemli bir karakter olduğu belirlenmiştir. Güler v.d. (2010), B4 damar açısının önemine değinmiş, B4 açısının 105 ve üzerinde değer alması durumunda popülasyonun *A. m. carnica* irkine ait olacağını vurgulamıştır. Bu çalışma kapsamında arıcılarla yapılan görüşmelerde Gümüşova ilçesinde faaliyetlerini sürdüren iki arıcının yurt dışından *A. m.*

carnica'ya ait ticari ana arı getirdikleri bilgisine ulaşılmıştır. Gümüşova ilçesi için B4 karakterinin 102,14 açığı taşıması, Güler v.d. (2010)'nin bildirdiği değer ile uyuşmamaktadır. Güler v.d. (2010) aynı çalışmada A4 değerine de vurgu yapmış, A4 değeri "33 ve üzeri ise *A. m. caucasica*, altında ise değildir" değerlendirmesini yapmıştır. Düzce ili ilçeleri için bu değeri karşılaştırdığımızda Gümüşova, Kaynaşlı ve Yığılca 33'ün altında, diğer ilçeler ise 33'ün üzerinde A4 değeri taşımaktadır.

Gür v.d. (2018) Trakya ve Yığılca bal arısı popülasyonlarını 19 landmarka göre karşılaştırdığı çalışmada, A4, B4 ve AREA6 karakterlerinin Trakya bal arısı popülasyonları ile Yığılca bal arısı popülasyonunu ayırt etmede güçlü karakterler olduğunu bildirmiştir. Yığılca için bildirilen A4 değeri (33,90) bu çalışmada bulunan A4 değerinden büyük bulunurken, B4 değeri (100,10) daha küçüktür.

Kambur ve Kekeçoğlu (2018b) çalışmada Türkiye'nin farklı ırk ve ekotiplerini temsil edecek şekilde 32 lokasyondan aldıkları bal arısı örneklerini 31 morfometrik karaktere göre karşılaştırmışlardır. İki boyutlu serpilme diyagramında diğer popülasyonlardan belirgin biçimde ayrılan Ardahan iline ait örneklerde DA ve PDK karakterleri bakımından en yüksek değerlere sahip olduğunu, Gaziantep'ten alınan arı örneklerinin İKU ve DİU karakterlerinin en düşük ortalamaya sahip olduğunu bildirmiştir. Kambur ve Kekeçoğlu (2018b) DA ve PDK karakterlerinin popülasyonları ayırmada en önemli belirteçler olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada birinci fonksiyonu oluşturan DA ve PDK karakterlerinin en yüksek Düzce/Merkez' de bulunmuş ve iki boyutlu serpilme diyagramında merkez diğer ilçelerden uzakta kümelenmiştir. Bu bulgular Kambur ve Kekeçoğlu (2010)'nun bulgularını destekler niteliktedir. DA ve PDK karakterleri popülasyonları ayırt etmede güçlü karakterler olarak değerlendirilebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bireysel verilere ve koloni ortalamalarına göre çizilen iki boyutlu serpilme diyagramında Düzce ilinin Merkez, Akçakoca, Cumayeri ve Gümüşova ilçelerinin bal arısı popülasyonları diğer ilçelerden ayrı gruplar oluşturdu. Örnek toplama esnasında arıcılarla yapılan bireysel görüşmelerde bölgeye uyum sağlamış yerel ırk ve ekotipler haricinde dışarıdan ana arı temin edildiği bildirilmiştir. Yerel arıcılardan alınan bilgiler ile uyumlu olarak morfolojik

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

analiz sonuçlarında da Düzce'nin Yığılca, Kaynaşlı, Gölyaka, Çilimli ilçeleri hariç diğer ilçelerine farklı arı ırklarına ait ana arı sokulduğunu gösteren bulgulara ulaşılmıştır. Bu sonuçlar doğal popülasyonlarda görülen farklılaşmalardan ziyade ekonomik kaygı temelli "verimli ana arı/verimli koloni" eldesine yönelik olarak farklı kaynaklardan ana arı temininden kaynaklanan farklılıklardır. Farklı ırk ve ekotipleri ile zengin bal arısı biyoçeşitliliğine sahip olan ülkemizde, genetik çeşitliğin bozulmaması ve korunması için acilen yasal önlemlerin alınması, göçer arıcılık faaliyetlerinin kontrollü olarak yapılması, özellikle de farklı alttürlerin bulunduğu coğrafik sınırlar içerisinde yöreye özgü ana arı kullanımının zorunlu hale getirilmesi gerekmektedir.

Mali Kaynak: Bu çalışma birinci yazara ait yüksek lisans tez çalışmasının bir parçası olup, Düzce Üniversitesi BAP- 2020.05.01.1071 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

Yazar Katkıları: SB, araştırma çalışmalarının yapılması, referansların okunması, makalenin yazımı; MK makalenin yazımı ve kontrolü.

Etik Durumu: Bu araştırma için etik kurul belgesi gerekli değildir.

Teşekkür: Bu eserin hazırlanması aşamasında makaleyi okuyarak düzeltmelere katkı veren Dr. Öğr. Üyesi Münir UÇAK'a ve Uzman Biyolog Tuğçe ÇAPRAZLI'ya teşekkür ederim.

KAYNAKÇA

- Arias, MC., Sheppard, W.S. 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae; Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 25-35. Doi:10.1016/j.ympev.2005.02.017
- BAB BsPro200 GeoMorf yazılımı, görüntü işleme ve analiz sistemi http://www.bab.com.tr/prgdis.php?prog_id=b smorf&dilsec=1.
- Bodenheimer, FS. 1941. Studies on the honeybee and beekeeping in Turkey, 1th ed., Ankara, Turkey: Merkez Ziraat Mücadela Enstitüsü.
- Faria, LRR., Gonçaves, RB. 2013. Abiotic correlates of beee diversity and composition along eastern Neotropics. *Apidologie* 44: 457-562. Doi: 10.1007/s13592-013-0205-x.

- Gençer, HV., Fıratlı, Ç. 1999. Orta Anadolu ekotipleri (*A.m. anatoliaca*) ve Kafkas ırkı (*A.m. caucasica*) bal arılarının morfolojik özellikleri. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 23(3): 103-107.
- Gösterit, A., Kekeçoğlu, M., Çıkılı, Y. 2012. Yığılca yerel bal arısının bazı performans özellikleri bakımından Kafkas ve Anadolu bal arısı ırkı melezleri ile karşılaştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 7: 107-114. ISSN 1304-9984.
- Gösterit, A., Çıkılı Y., Kekeçoğlu M. 2016. Determination of annual colony development of the Yığılca local honeybee in Turkey and comparison with *Apis mellifera caucasica* and *A. m. anatoliaca* Hybrids. *Pakistan Journal of Zoology* 48: 195-199.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O. 1999a. Türkiye'deki önemli bal arısı ırk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri-I. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 23(3): 565-575.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O. 1999b. Türkiye'deki önemli bal arısı ırk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri-II. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 23(3): 571-575.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O. 1999c. Türkiye'deki önemli bal arısı (*Apis mellifera* L.) ırk ve ekotiplerinin morfolojik karakterler açısından ilişkilerinin diskriminant analiz yöntemiyle saptanması. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*. 23: 565-575.
- Güler, A. 2000. The effects of narrowed area and additional feeding on some physiological characteristics of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 24: 1-6.
- Güler, A., Akyol, E., Gökçe, M., Kaftanoğlu, O. 2002. Artvin ve Ardahan yöresi bal arıları (*Apis mellifera* L.)'nın bazı morfolojik özellikler yönünden ilişkilerinin belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 26: 595-603.
- Güler, A., Bek, Y. 2002. Forewing angles of honey bee (*Apis mellifera*) samples from different regions of Turkey. *Journal Of Apicultural Research* 41(2): 43-49. D: 10.1080/00218839.2002.11101067.
- Güler, A., Bek, Y., Yeniar, H. 2010. The importance of morphometric geometry on discrimination of Carniolan (*Apis mellifera carnica*) and Caucasian (*A. m. caucasica*) honey bee subspecies and in determining their

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- relationship to Thrace region bee genotype. *Journal of the Kansas Entomological Society* 83(2): 154-162. Doi: 10.2317/JKES0702.20.1.
- Güler, A., Bıyık, S., Güler, M. 2013. Batı Karadeniz Bölgesi bal arılarının (*Apis mellifera* L.) morfolojik karakterizasyonu. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences* 28(1): 39-46. Doi:10.7161/anajas.2013.281.39.
- Gür, D., Soysal, Mİ., Kekeçoğlu, M. 2018. Trakya Ve Yığılca bal arılarının (*Apis mellifera* L., 1758) morfometrik yöntemlerle karşılaştırılması. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty* 15(02).
- Kandemir, I., Kence, M., Kence A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera*) population of Turkey. *Apidologie* 31: 343-356. Doi: 10.1051 / apido: 2000126.
- Kandemir, I., Kence, M., Kence A. 2005. Morphometric and electrophoretic variation in different honeybees (*Apis mellifera*) population. *Genet. Molec. Biol.* 29: 885-890.
- Karabağ, K., Tunca, Rİ., Sevim, ET., Doğaroğlu, T. 2020. Otuz polimorfik mikro uydu işaretçisi açısından Anadolu'daki bal arılarının mevcut genetik durumu. *Türkiye Entomoloji Dergisi* 44(3): 333-346. Doi: <http://dx.doi.org/10.16970/entoted.678808>
- Karacaoğlu, M., Fıratlı, Ç. 1998. Bazı bal arısı ekotipleri (*Apis mellifera anatoliaca*) ve melezlerinin özellikleri: 1. Morfolojik özellikler. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 22: 17-21.
- Kambur, M. 2017. Türkiye bal arısı (*Apis mellifera* L.) biyoçeşitliliğinin geometrik morfometrik yöntemler ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Düzce.
- Kambur, M., Kekeçoğlu, M. 2018a. The loss of genetic diversity on native Turkish honey bee (*Apis mellifera* L.) subspecies. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences* 33: 73-84. Doi: 10.7161/omuanajas.337798.
- Kambur, M., Kekeçoğlu, M. 2018b. The current situation of Turkey honey bee (*Apis mellifera* L.) biodiversity and conservations studies. *Biological Diversity and Conservation* 11(1): 105-119. Doi: 10.13140/RG.2.2.12203.54568.
- Kekeçoğlu, M., Bouga, Mİ., Soysal İ., Harizanis, P. 2007. Morphometrics as a tool for the study of genetic variability of honey bees. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 4(1): 7-15.
- Kekeçoğlu, M. 2010. Honey bee biodiversity in Western Black Sea and evidence for a new honey bee ecotype in Yığılca Province. *BİBAD*. 3(1): 73-78. ISSN: 1308-3961.
- Kekeçoğlu, M., Soysal, Mİ. 2010. Genetic diversity of bee ecotypes in Turkey and evidence for geographical differences. *Romanian Biotechnological Letters* 15(5): 5646-5653.
- Kekeçoğlu, M. 2018. Morphometric divergence of anatolian honey bees through loss of original traits: A dangerous outcome of Turkish apiculture. *Sociobiology* 65(2): 232-243. Doi: 10.13102/sociobiology.v65i2.1895.
- Koca, AÖ., Kandemir İ. 2013. Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 37(2): 205-210. Doi:10.3906/zoo-1104-10.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Salviae Holmiae* Stockholm.
- Maa, TC. 1953. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honeybees (Hym.). *Treubia* 21: 525-640.
- Meixner, MD., Leta, A.M., Koeniger, N., Fuchs, S. 2011. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*—*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie* 42(3): 425-437. Doi: 10.1007/s13592-011-0007-y.
- Palmer, M. Smith, DR. and Kaftanoğlu, O. 2000. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mt-DNA. *The J. of Heredity* 91(1): 42-46. Doi: 10.1093/heder/91.1.42.
- Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zareei, L., Jamali, S. 2017. Morphometric diversity and phylogenetic relationships among Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations using morphological characters. *Sociobiology* 64(1): 33-41. Doi: 10.13102/sociobiology.v64i1.1179.
- Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L., Jamali, S. 2018. Genetic variation in Iranian honey bees, *Apis mellifera meda* Skorikow, 1829, (Hymenoptera: Apidae) inferred from PCR-RFLP analysis of two mtDNA gene

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- segments (COI and 16S rDNA). *Sociobiology* 65(3): 482-490. Doi: 10.13102/sociobiology.v65i3.2876.
- Ruttner, F. 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees, 1th ed., Berlin, Germany: Springer.
- Ruttner, F. 1992. Naturgeschichte der Honigbienen, Ehrenwirth Verlag, München.
- Settar, A. 1983. Ege Bölgesi Arı Tipleri Ve Gezgin Arıcılık Üzerine Araştırmalar, Doktora tezi, Ege Ziraat Araştırma Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Sheppard, WS., Arias, MC., Grech, A. and Meixner, MD. 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie* 28: 287-293. Doi: 10.1051 / apido: 19970505.
- Sheppard, WS. and Meixner, MD. 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie* 34(4): 367-375. Doi: 10.1051 / apido: 2003037.
- Smiths, DR., Slaymaker, A., Palmer, M., Kaftanoğlu O. 1997. Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie* 28: 269-274. Doi: 10.1051 / apido: 19970503.
- Sneath, PHA., Sokal, RR. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman, San Francisco.
- SPSS 15.0 (SPSS for Windows, Release 15.0) (2005). Standard Version, SPSS Inc., (www.SPSS.com.tr.)
- Ünal, G. & Özdil, F. 2018. Genetic characterization of Thrace honey bee populations of Turkey: restriction and sequencing of inter cytochrome C oxidase I-II (CoxI-CoxII) genes. *Journal of Apicultural Research* 57(2): 213-218. DOI: 10.1080/00218839.2018.1426347.
- Tozkar, CÖ. 2020. Genetic structure of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) subspecies based on tRNA^{Leu}-COX2 and ND5 regions of mtDNA. *Applied Ecology And Environmental Research* 18(2):2269-2284. Doi: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_22692284.

DERLEME / REVIEW

THE ROLE OF HONEY IN PEDIATRIC TREATMENTS IN SRI LANKAN SIDDHA MEDICINE

Sri Lanka Siddha Medicine'de Pediatrik Tedavilerde Balın Rolü

Pholtan Rajeev Sebastian RAJAMANO HARAN^{1,2}, Saravanan VIVEKANANDARAJAH SATHASIVAMPILLAI^{3,4*}

¹ Eastern Provincial Herbal Garden Management Center, Trincomalee, Sri Lanka

² Department of Siddha Toxicology, The Tamil Nadu Dr. M.G.R. Medical University, Chennai, INDIA, ORCID No: 0000-0001-9341-5843, Email address: drsprajeev@gmail.com

³ KnowledgeLink Group, Inc., Waltham, MA 02451, USA.

⁴Boigai Institute, Batticaloa, SRI LANKA, ORCID No: 0000-0002-5938-0509, Corresponding Author: e-mail: vivekanandarajahs@yahoo.co.uk

Geliş Tarihi / Received: 31.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted:05.02.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.851567

ABSTRACT

Honey is used as food and for the treatment of indigenous medicines worldwide, also in Sri Lanka for a long time. Siddha Medicine is one of the four indigenous medicines currently practiced in Sri Lanka and is generally practiced in the Eastern and Northern Provinces of Sri Lanka. This study aims to explore and highlight the use of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. Preparations used to treat pediatric disorders were obtained from standard Sri Lankan textbooks used in Siddha Medicine degree programs at universities in Sri Lanka [Pararasaseharam (Part Two) and Seharasasehara Treatment]. A total of 30 preparations were identified using honey as an ingredient or adjuvant. Honey is generally used to treat indigestion and disorders associated with the digestive system. This is the first study on the role of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. This work identified, analyzed, and documented the use of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine.

Keywords: *Sri Lanka, Siddha Medicine, honey, pediatric treatments*

ÖZ

Bal, gıda olarak ve dünya çapında yerli ilaçların tedavisinde ve ayrıca Sri Lanka'da uzun süredir kullanılmaktadır. Siddha Medicine şu anda Sri Lanka'da uygulanmakta olan dört yerli ilaçtan biridir ve genellikle Sri Lanka'nın Doğu ve Kuzey İllerinde uygulanmaktadır. Bu çalışma, Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde balın kullanımını araştırmayı ve vurgulamayı amaçlamaktadır. Pediyatrik bozuklukları tedavi etmek için kullanılan hazırlıklar, Sri Lanka'daki [Pararasaseharam (İkinci Kısım) ve Seharasasehara Tedavisi] üniversitelerindeki Siddha Tıp derecesi programlarında kullanılan standart Sri Lanka ders kitaplarından elde edildi. Bir bileşen veya yardımcı madde olarak bal kullanılarak toplam 30 preparat tanımlandı. Bal genellikle hazımsızlık ve sindirim sistemi ile ilgili rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılır. Bu, Sri Lanka Siddha Medicine'de balın pediatrik tedavilerdeki rolü üzerine yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmada, Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde balın kullanımını belirlendi, analiz edildi ve belgelendi.

Anahtar Kelimeler: *Sri Lanka, Siddha Medicine, bal, pediatrik tedaviler*

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaçlar ve Hedefler: Bu çalışma, Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde balın kullanımını araştırmayı ve vurgulamayı amaçlamaktadır. Ayrıca, bu sistematik inceleme, Sri Lanka balıyla ilgili gelecekteki farmakolojik araştırmalar için faydalı olacaktır.

Balın tedavideki rolü: Sri Lankan Siddha Medicine pediatrik tedavilerinde balın müstahzar adı, tedavisi, ilacın türü, yardımcı ve referansı dahil bilgiler Tablo 1'de listelenmiştir. Çeşitli pediatrik bozukluklar için toplam 72 preparat iki kaynaktan da listelenmiştir: (Ponniappillai 2016, Ponniappillai 2000). Ancak bal, 72 preparatın 30'unda bir bileşen veya yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bal belirli bir preparatta bir bileşen olarak kullanılırsa, bu preparasyonda bir adjuvan olarak kullanılmaz ve bunun tersi de geçerlidir. Dolayısıyla bu, müstahzarlarda kullanılan diğer maddelerle karşılaştırıldığında, balın temel olarak pediatrik tedavilerde kullanılan tek madde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bu bilgiler balın Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde yer alan en önemli madde olduğunu ortaya koymaktadır. Tedavilerin çoğu (16 preparat ve adjuvan) Ponniappillai'de (2016), ardından Ponniappillai'de (2000) tanımlanmıştır.

Ayrıca bal, çoğunlukla pediatrik tedavilerde yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Öncelikle toz preparatlarla bir adjuvan olarak ve ardından haplar olarak kullanılır. Buna ek olarak, bal genellikle tonik ve kaynatmada bir bileşen olarak kullanılır, ardından pediatrik tedavilerde haplar ve tozlar gelir. Bal genellikle pediatrik bozukluklarda hazımsızlık, ishal, kızarıklık, ateş ve öksürüğü tedavi etmek için kullanılır. İnsan vücudu sistemleri açısından, genellikle sindirim, solunum, deri, iskelet, kas, sinir ve kardiyovasküler sistemlerle ilişkili bozuklukları tedavi etmek için kullanılır. Yukarıda bahsedildiği gibi, balın anti-enflamatuar, antibakteriyel, yara iyileştirme ve antifungal aktivite çalışmaları, eklem hastalığı, kızarıklık ve öksürük dahil olmak üzere Sri Lanka Siddha Tıbbında pediatrik tedavilerde kullanımına dair bilimsel kanıt sağlar. Modern tıpta pediatrik tedavide balın kullanıldığı birçok klinik araştırma mevcuttur. Bu çalışmalar, balın Siddha tıbbı da dahil olmak üzere geleneksel ilaçlar üzerindeki iyileştirici etkilerinin bilimsel kanıtlarını sağlar. Örneğin, pediatrik klinik çalışmalar öksürük, yaralar, solunum yolu enfeksiyonları, bacaklarda

kronik venöz ülserler, iltihaplı, hasarlı cilt, herpes, gastroenterit, yetersiz beslenme, yanıklar, mukozit, dehidratasyon ve diş çekimi yaralarının iyileştirici etkilerini göstermiştir (Abdel-Naby Awad ve Hamad, 2018, Abdulrhman v.d. 2011, Abdulrhman v.d. 2010, Aly v.d. 2017, Haffejee ve Moosa, 1985, Konuk Sener ve diğerleri 2019, Mokhtari v.d. 2019, Paul, 2012, Shaaban v.d. 2010, Shadkam v.d. 2010, Simon v.d. 2006).

Sonuç: Bu, Sri Lanka Siddha Medicine'de balın pediatrik tedavilerdeki rolü üzerine yapılan ilk çalışmadır. Bal, Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde hayati bir rol oynar. Ancak bu preparatlarla bilimsel kanıt sağlamak için herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, bilimsel kanıtların yanı sıra güvenlik ve etkililik amaçları sağlamak için daha fazla in vitro, in vivo ve klinik deneyler yapılmalıdır. Bu çalışmada, Sri Lanka Siddha Medicine'de pediatrik tedavilerde balın kullanımını belirlendi, analiz edildi ve belgelendi. Ek olarak, bu çalışma, Sri Lanka Siddha Tıbbında pediatrik tedavilerde bal içeren preparatlar ve yardımcıların daha ileri farmakolojik çalışmalarını için temel sağlar.

INTRODUCTION

In Sri Lanka, 132 bee species belonging to four families (*Apidae*, *Megachilidae*, *Halictidae*, and *Colletidae*) were documented (Wijesekara 2001). Sri Lanka hosts three species of bees: *Apis dorsata* Fabricius (sourced in the district of Matale), *Apis florea* Fabricius (sourced in the districts of Kandy, Puttalam, Matale, Matara, and Trincomalee), and *Apis cerana* Fabricius (sourced in the districts of Badulla and Galle) (Punchihewa 1994, Wijesekara 2001). Honey is used as food and medicine in indigenous medicines globally also, in Sri Lanka for a long time. The taste of honey varies depending on the types of flowers from which nectar is collected. Plants of families such as *Asteraceae*, *Fabaceae* (*Mimosa pudica* L.; *Vachellia leucophloea* (Roxb.) Maslin, Seigler & Ebinger; *Tephrosia purpurea* (L.) Pers.; *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.; *Acacia auriculiformis* A.Cunn. ex Benth.; and *Cassia fistula* L.), *Asteraceae* (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray; *Wollastonia biflora* (L.) DC.; and *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski), *Myrtaceae* (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), *Acanthaceae* (*Strobilanthes lupulina* Nees), *Malvaceae*, and

DERLEME / REVIEW

Poaceae are the primary sources of pollen and nectar for honeybees in Sri Lanka (Silva et al., 2018).

Honey consists mainly of water and sugars such as fructose, glucose, and sucrose. It also contains folate, niacin, pantothenic acid, riboflavin, vitamin C, pyridoxine, proteins, minerals, pinocembrin, hesperetin, quercetin, chrysin, apigenin, galangin, kaempferol, ellagic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, and caffeic acid (Allsop and Miller 1996, Eteraf-Oskouei and Najafi 2013, Zumla and Lulat 1989). Scientific studies have revealed that honey includes anti-inflammatory, antioxidant, wound healing, antidiabetic, antibacterial, and antifungal activities (Aljadi and Kamaruddin 2004, Al-Mamary et al. 2002, Al-Waili 2005, 2004, 2003, Al-Waili and Boni 2003, Asadi-Pooya et al. 2003, Bansal et al. 2005, Beretta et al. 2005, Bilsel et al. 2002, Blasa et al. 2006, Brady et al. 1996, Chepulis 2007, Chua et al. 2013, Efem 1988, Frankel et al. 1998, Gheldof and Engeseth 2002, Jeffrey and Echazarreta 1996, Meda et al. 2004, Molan 1999, Obaseiki-Ebor and Afonya 1984, Olaitan et al. 2007, Schramm et al. 2003, Shimazawa et al. 2005, Yaghoobi et al. 2008).

Siddha Medicine is one of the four indigenous medicines currently practiced in Sri Lanka and is commonly practiced in the Eastern and Northern Provinces of Sri Lanka (Weragoda 1980). Siddha Medicine originated in South India in the time from 10,000 to 4,000 B.C. (Siddha National Institute, 2016). A total of 4,448 diseases have been listed in Siddha Medicine (Government of Kerala, 2011). The treatments offered in Siddha Medicine are individual and are based on age, sex, physical state, diet, lifestyle, environment, habitat, habits, patient, physiological structure, weather, mental state, and appetite (Ministry of Ayurveda, Yoga, and Naturopathy, Unani, Siddha, and Homoeopathy, 2017). The raw materials used for Siddha medicinal preparations come from plants, animals, metals, minerals, and marine organisms. In addition to these types of raw materials, honey is also widely used in a variety of preparations in Siddha Medicine (Siddha National Institute, 2016). Seven types of honey are

used in Siddha medicinal preparations, including hill honey, tree branch honey, tree hole honey, anthill honey, domestic honey, fresh honey, and old honey (Parasuraman and Perumal, 2020).

This study aims to explore and highlight the use of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. Furthermore, this systematic review would be useful for future pharmacological research on Sri Lankan honey.

Preparations used for the treatment of pediatric disorders obtained from the Sri Lankan standard university textbooks used in Siddha Medicine degree programs in Sri Lanka: Pararasaseharam (Part Two) [Pararasasharam (Irendaam Paaham)] (Ponniappilai 2016) and Seharasashahara Treatment [Seharasashahara Vaiththiyam] (Ponniappilai 2000). Only preparations involving honey as an ingredient or adjuvant taken into account in this study.

The role of honey in treatments

The information, including the name of the preparation, treatment for, type of medication, preparation/adjuvant, and reference of the use of honey in Sri Lankan Siddha Medicine pediatric treatments are listed in Table 1. A total of 72 preparations for various pediatric disorders are listed in both sources: Ponniappilai (2016) and Ponniappilai (2000). However, honey is used as an ingredient or adjuvant in 30 of the 72 preparations. Also, if honey is used as an ingredient in a particular preparation, then it is not used as an adjuvant with that preparation, and vice versa. Hence, this shows that honey is the only substance mainly used in pediatric treatments, compared to other substances used in the preparations. Therefore, this information reveals that honey is the most important substance involved in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. Most of the treatments (16 preparations and adjuvants) were identified in Ponniappilai (2016), followed by Ponniappilai (2000).

Table 1: Use of honey in pediatric treatments**Tablo 1:** Pediatrik tedavilerde bal kullanımı

Name of preparation	Treatment for	Type of medication	Preparation / adjuvant	Reference
Akkarahaara Sanjeevi Maaththirai	Fever	Pill	Adjuvant	P
Akkarahaara Kulihai	Diarrhea, fever, coma	Pill	Adjuvant	P
Athisaara Piththath Thool	Dysentery	Powder	Adjuvant	S
Iraththa Piththam	Blood disorders	Powder	Adjuvant	S
Uraththa Piththa Vaathath Thool	Indigestion, joint disorders	Powder	Adjuvant	S
Elaathi Maaththirai	Fever, indigestion	Pill	Adjuvant	P
Ongaalaththuk Kasaayam	Nausea, vomiting	Decoction	Preparation	P
Karappaan Patrpam	Skin rashes	Powder	Adjuvant	S
Karappaan Piththath Thool	Skin lesion	Powder	Adjuvant	S
Kasththoorimiruththiyaathi Maaththirai	Cough	Pill	Adjuvant	P
Kiranthi Vaathath Thool	Joint diseases, skin rashes	Powder	Adjuvant	S
Kumaran Velkanda llehiyam	Cough, vomit	Tonic	Preparation	S
Koolppaada llehiyam	Cough	Tonic	Preparation	S
Sayapiththath Thool	Tuberculosis, indigestion	Powder	Adjuvant	S
Sittramattik Kulihai	Indigestion	Pill	Adjuvant	P
Suravikkatroot	Fever, hiccough	Powder	Adjuvant	S
Suwarkakkorosanai Maaththirai	Fever, indigestion, diarrhea	Pill	Adjuvant	P
Suvasa Piththath Thool	Respiratory disorders	Powder	Adjuvant	S
Suwasaththitru Enaathik Kulihai	Asthma	Pill	Preparation	S
Neermaanthath Thool	Indigestion	Powder	Preparation	P
Paravaichchsuraththitruk Kasaayam	Fever	Decoction	Preparation	P
Perungaayak kulihai 1	Indigestion, diarrhea, fever, cough	Pill	Adjuvant	P
Perungaayak kulihai 2	Indigestion, diarrhea	Pill	Adjuvant	P
Paanthasannikkuk kulihai	Indigestion, coma	Pill	Adjuvant	P
Miruththiyaathik Kulihai	Indigestion, fever	Pill	Adjuvant	P
Vaathapatrpath Thool	Joint diseases	Powder	Adjuvant	S
Vaayvu Vikkatroot	Hiccough	Powder	Adjuvant	S
Vikkat Silettumath Thool	Hiccough	Powder	Adjuvant	S
Virana Piththath Thool	Wounds	Powder	Adjuvant	S
Venkaayak Kulihai	Abdominal distension, indigestion, diarrhea	Pill	Adjuvant	P

Abbreviations: P: (Ponniappillai, 2016); S: (Ponniappillai, 2000)

Kısaltmalar: P: (Ponniappillai, 2016); S: (Ponniappillai, 2000)

DERLEME / REVIEW

In addition, honey is mainly used as an adjuvant in pediatric treatments. It is used primarily as an adjuvant with powdered preparations followed by pills. In addition, honey is often used as an ingredient in tonic and decoction, followed by pills and powders in pediatric treatments. Honey is usually used to treat indigestion, diarrheic, rash, fever, and cough in pediatric disorders. In terms of human body systems, it is generally used to treat digestive, respiratory, integumentary, skeletal, muscular, nervous, and cardiovascular systems-associated disorders. As mentioned above, anti-inflammatory, antibacterial, wound healing, and antifungal activity studies of honey provide scientific evidence of its use in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine, including joint disease, rash, and cough. There are several clinical trials available using honey in pediatric treatment in modern medicine. These studies provide scientific evidence of the healing effects of honey on traditional medicines, including Siddha medicine. For example, pediatric clinical studies have shown healing effects of cough, wounds, respiratory infections, chronic venous ulcers of the legs, inflammatory, damaged skin, herpes, gastroenteritis, malnutrition, burns, mucositis, dehydration, and tooth extraction wounds (Abdel-Naby Awad and Hamad, 2018, Abdulrhman et al. 2011, 2010, Aly et al. 201, Haffejee and Moosa, 1985, Konuk Sener et al. 2019, Mokhtari et al. 2019, Paul, 2012, Shaaban et al. 2010, Shadkam et al., 2010, 2010, Simon et al. 2006).

This is the first study on the role of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. Honey plays a vital role in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. However, no study has been conducted to provide scientific evidence with these preparations. Therefore, further *in vitro*, *in vivo*, and clinical trials should be conducted to provide scientific evidence as well as safety and efficacy purposes. This work identified, analyzed, and documented the use of honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine. In addition, this work provides the basis for further pharmacological studies of preparations and adjuvants that involve honey in pediatric treatments in Sri Lankan Siddha Medicine.

Source of Finance

This work received no funding.

Contributions of all Authors

Both authors contributed equally.

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest in this study.

Acknowledgement

The authors are thankful to their family members for their vital support to complete this work.

REFERENCES

- Abdel-Naby Awad OG., Hamad AH. 2018. Honey can help in herpes simplex gingivostomatitis in children: Prospective randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Am J Otolaryngol.* 39:759-763.
- Abdulrhman, MA, Mekawy, MA, Awadalla, MM, Mohamed, AH. 2010. Bee honey added to the oral rehydration solution in treatment of gastroenteritis in infants and children. *J Med Food.* 13: 605-609.
- Abdulrhman, MA., Nassar, MF., Mostafa, HW., El-Khayat, ZA., Abu El Naga, MW. 2011. Effect of honey on 50% complement hemolytic activity in infants with protein energy malnutrition: a randomized controlled pilot study. *J Med Food.* 14: 551-555.
- Aljadi, AM., Kamaruddin, MY. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* 85: 513-518, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00596-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00596-4).
- Allsop, KA., Miller, JB. 1996. Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. *Br. J. Nutr.* 75: 513-520, <https://doi.org/10.1079/bjn19960155>.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., Al-Habori, M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr. Res.* 22: 1041-1047, [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00406-2).
- Al-Waili, NS. 2003. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and

- blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. *J. Med. Food* 6: 135–140, <https://doi.org/10.1089/109662003322233549>.
- Al-Waili, NS. 2004. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food*. 7: 210–222, <https://doi.org/10.1089/1096620041224139>.
- Al-Waili, NS., Boni, NS. 2003. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J. Med. Food* 6: 129–133, <https://doi.org/10.1089/109662003322233530>.
- Aly H., Said RN., Wali IE. 2017. Medically graded honey supplementation formula to preterm infants as a prebiotic: A randomized controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 64 :966–970.
- Asadi-Pooya, AA., Pnjehshahin, MR., Beheshti, S. 2003. The antimycobacterial effect of honey: an *in vitro* study. *Riv. Biol.* 96: 491–495.
- Bansal, V., Medhi, B., Pandhi, P., 2005. Honey - a remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmandu Univ. Med. J. (KUMJ)* 3: 305–309.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R., 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 533: 185–191, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>.
- Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., Turkoglu, U., 2002. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig. Surg.* 19: 306–311, <https://doi.org/10.1159/000064580>.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, MP., Albertini, MC., Piatti, E., 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 97: 217–222, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.039>.
- Brady, NF., Molan, PC., Harfoot, CG. 1996. The Sensitivity of Dermatophytes to the Antimicrobial Activity of Manuka Honey and Other Honey. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2: 471–473, <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb00540.x>.
- Chepulis, LM., 2007. The effect of honey compared to sucrose, mixed sugars, and a sugar-free diet on weight gain in young rats. *J. Food Sci.* 72: S224–229, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00286.x>.
- Chua, LS., Rahaman, NLA., Adnan, NA., Eddie Tan, TT. 2013. Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *J. Anal. Methods Chem.* 2013: 8, <https://doi.org/10.1155/2013/313798>.
- Efem, SE. 1988. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *Br. J. Surg.* 75: 679–681, <https://doi.org/10.1002/bjs.1800750718>.
- Eteraf-Oskouei, T., Najafi, M. 2013. Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iran J. Basic Med. Sci.* 16: 731–742.
- Frankel, S., Robinson, GE., Berenbaum, MR. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apic. Res.* 37: 27–31, <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100951>.
- Gheldof, N., Engeseth, NJ. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3050–3055, <https://doi.org/10.1021/jf0114637>.
- Government of Kerala. 2011. About Siddha [WWW Document]. URL <http://www.ism.kerala.gov.in/index.php/about-sidha.html> (accessed 12.26.20).
- Haffejee, IE., Moosa, A. 1985. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 290 :1866–1867.
- Jeffrey, A., Echazarreta, C. 1996. Medical uses of honey. *Rev. Biomed.* 7.
- Konuk Sener D., Aydin M., Cangur S., Guven E. 2019. The effect of oral care with chlorhexidine, vitamin E and honey on

DERLEME / REVIEW

- mucositis in pediatric intensive care patients: A randomized controlled trial. *J Pediatr Nurs.* 45: e95-e101.
- Meda, A., Lamien, CE., Millogo, J., Romito, M., Nacoulma, OG. 2004. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.* 95: 103–107, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.016>.
- Ministry of Ayurveda, Yoga and Naturopathy, Unani, Siddha, and Homoeopath. 2017. Diagnosis and Treatment [WWW Document]. URL <https://main.ayush.gov.in/about-the-systems/siddha/diagnosis-and-treatment> (accessed 12.26.20).
- Mokhtari S., Sanati I., Abdolahy S., Hosseini Z. 2019. Evaluation of the effect of honey on the healing of tooth extraction wounds in 4- to 9-year-old children. *Niger J Clin Pract.* 22:1328-1334.
- Molan, PC. 1999. Why honey is effective as a medicine. *Bee World.* 80: 80–92, <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099430>
- National Institute of Siddha. 2016. About Siddha Medicine [WWW Document]. URL <https://nischennai.org/siddhamedicine.html> (accessed 12.26.20).
- Obaseiki-Ebor, EE., Afonya, TC. 1984. *In vitro* evaluation of the anticandidiasis activity of honey distillate (HY-1) compared with that of some antimycotic agents. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 283–284, <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1984.tb04373.x>.
- Olaitan, PB., Adeleke, OE., Ola, IO, 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.* 7: 159–165, <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>.
- Parasuraman, S., Perumal, P. 2020. Siddha, an Indigenous Medical System of Peninsular India. Springer, Singapore.
- Paul IM., Beiler J., McMonagle A. 2007. Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 161: 1140-6.
- Paul, IM. 2012. Therapeutic options for acute cough due to upper respiratory infections in children. *Lung.* 190: 41-44.
- Ponniappillai, I., 2016. Pararasaseharam (Second Part)–பரராசசேகரம் (இரண்டாம் பாகம்) [Pararasaseharam (Irendaam Paaham)]. Provincial Department of Indigenous Medicine, Northern Province, Jaffna.
- Ponniappillai, I., 2000. Seharasasehara Treatment–(Seharasasehara Vaiththiyam)-செகராசசேகர வைத்தியம். Provincial Department of Indigenous Medicine, Northern Province, Jaffna.
- Punchihewa, RWK., 1994. Beekeeping for honey production in Sri Lanka. Sri Lanka Department of Agriculture, Peradeniya.
- Schramm, DD., Karim, M., Schrader, HR., Holt, RR., Cardetti, M., Keen, CL. 2003. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1732–1735, <https://doi.org/10.1021/jf025928k>.
- Shaaban, SY., Abdulrhman, MA., Nassar, MF., Fathy, RA. 2010. Effect of honey on gastric emptying of infants with protein energy malnutrition. *Eur J Clin Invest.* 40 :383-387.
- Shadkam MN., Mozaffari-Khosravi H., Mozayan MR. 2010. A comparison of the effect of honey, dextromethorphan, and diphenhydramine on nightly cough and sleep quality in children and their parents. *J Altern Complement Med.* 16: 787-93.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., Hara, H. 2005. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2: 201–207, <https://doi.org/10.1093/ecam/neh078>.
- Silva, H., Seneviratne, R., Gunawardana, M., Jayasinghe, C. 2018. Pollen Analysis of Natural Bee Honeys from Different Regions of Sri Lanka. *J. Food Agric.* 11: 23, <https://doi.org/10.4038/jfa.v11i1.5200>.
- Simon A., Sofka K., Wiszniewsky G. 2006. Wound care with antibacterial honey (Medihoney) in pediatric hematology-oncology. *Support Care Cancer.* 14: 91-7.
- Weragoda, PB. 1980. The traditional system of medicine in Sri Lanka. *J. Ethnopharmacol.* 2: 71–73, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(80\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(80)90033-1).

DERLEME / REVIEW

- Wijsekara, A. 2001. An Annotated List of Bees (*Hymenoptera: Apoidea: Apiformis*) of Sri Lanka. *Tijdschr. Entomol.* 144: 145–158, <https://doi.org/10.1163/22119434-99900063>.
- Yaghoobi, N., Al-Waili, N., Ghayour-Mobarhan, M., Parizadeh, SMR., Abasalti, Z., Yaghoobi, Z., Yaghoobi, F., Esmaili, H., Kazemi-Bajestani, SMR., Aghasizadeh, R., Saloom, KY., Ferns, GA. 2008. Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. *Sci. World J.* 8: 463–469, <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.64>.
- Zumla, A., Lulat, A. 1989. Honey - a remedy rediscovered. *J. R. Soc. Med.* 82: 384–385.

Citation/Atf: Manouchehri A, Shakib P, Biglaryan F, Nazer M, Darvishi M, 2021. The Most Important Medicinal Plants Affecting Bee Stings: A Systematic Review Study (Arı sokmalarını etkileyen önemli şifalı bitkiler: Sistematik derleme çalışması). U. Arı D./U. Bee J. 21: 91-103, DOI: 10.31467/uluaricilik.887370

DERLEME / REVIEW

THE MOST IMPORTANT MEDICINAL PLANTS AFFECTING BEE STINGS: A SYSTEMATIC REVIEW STUDY

Arı Sokmalarını Etkileyen Önemli Şifalı Bitkiler: Sistematik Derleme Çalışması

Aliasghar MANOUCHEHRI¹, Pegah SHAKIB², Fakher BIGLARYAN³, Mohammadreza NAZER⁴, Mohammad DARVISHI^{5,6*}

¹Department of Internal Medicine, Shahid Beheshti Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, IRAN, ORCID No: 0000-0003-1741-9791, E-posta: drmanouchehri@yahoo.com

²Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, IRAN, ORCID No: 0000-0003-3525-226X, E-posta: shakib.pegah@yahoo.com

³Master of Clinical Psychology and Head of the Health Department of Chalous Police, NAJA, Mazandaran, IRAN ORCID No. 0000-0003-3392-1108, E-posta: bigglarian@ymail.com

⁴Department of Infectious Diseases, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, IRAN, ORCID No: 0000-0002-8894-8191, E-posta: dr_nazer@yahoo.com

⁵Infectious Diseases and Tropical Medicinal Research Center (IDTMRC), AJA University of Medical Sciences, Tehran, IRAN ORCID No: 0000-0003-0332-2489

^{6*}Department of Aerospace and Subaquatic Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, IRAN, Corresponding Author: E-posta: darvishi1349@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 28.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 17.03.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.887370

ABSTRACT

Bee stings are one of the most common insect bites. In some insects, including bees, the sting, along with the venom gland, is separated from the bees' body after the bite and remains at the site of the bite. Bee stings are associated with symptoms such as redness of the skin, itching, allergic reactions causing infection, headache, dizziness, nausea, chest pain, suffocation, breathing difficulty, and paralysis of the bite area. This review study was conducted to identify Iranian medicinal plants for the treatment of bee stings. It was used to review articles in Iranian ethnobotanical sources and articles. Keywords such as bee sting, bee sting, medicinal plants, ethnobotany, identification of medicinal plants and Iran were used. Databases such as ISI Web of Science, PubMed, Scopus, ISC, ISID, Magiran and Google Scholar were used to review articles and resources. Medicinal plants such as *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Ruta graveolens* L., *Allium sativum*, *Heliotropium ramosissimum*, *Allium cepa* L., *Taraxacum officinale* L., *Rosa canina* L., *Petroselinum crispum*, *Verbascum songaricum* Schrenk., *Vitex pseudonegundo*, *Ment eriophora* DC., *Peganum harmala* L., *Citrullus colocynthis*, *Ocimum basilicum*, *Curcuma longa* were among the most important medicinal plants used in Iranian ethnobotanical sources to treat bee stings. The most common plant families used for bee stings include *Asteraceae* and *Lamiaceae*. Also, the most plant organs used in bee stings included leaves (37%), shoots (20%) and flowers (14%). This study lists a number of plants that have been introduced in different parts of Iran as a treatment and antidote against bee stings and bee stings. This study introduces a number of herbs that are used in different parts of Iran as a treatment against bee stings. We believe that the plants can be used as herbal remedies and antidotes against bee stings. Lack of natural, useful and effective drugs for the treatment of bites leads to the expansion of research on effective and natural drugs for patients with bites.

Keywords: Bee sting, Medicinal plants, Folk remedy, Traditional medicine, Honey bee

ÖZ

Arı sokmaları en yaygın böcek ısırıklarından biridir. Arılar da dahil olmak üzere bazı böceklerde, zehir beziyle birlikte sokma, ısırılmadan sonra arıların vücudundan ayrılır ve ısırık yerinde kalır. Arı sokmaları ciltte kızarıklık, kaşıntı, enfeksiyona neden olan alerjik reaksiyonlar, baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, göğüs ağrısı, boğulma, nefes almada zorluk ve ısırık bölgesinde felç gibi semptomlarla ilişkilidir. Bu inceleme çalışması, arı sokmalarının tedavisi için İran şifalı bitkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. İran etnobotanik kaynaklarında ve makalelerinde yer alan makaleleri gözden geçirmek için kullanıldı. Arı sokması, arı sokması, şifalı bitkiler, etnobotanik, şifalı bitkilerin tanımlanması ve İran gibi anahtar kelimeler kullanılmıştır. Makaleleri ve kaynakları gözden geçirmek için ISI Web of Science, PubMed, Scopus, ISC, ISID, Magiran ve Google Scholar gibi veritabanları kullanıldı. *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Ruta graveolens L.*, *Allium sativum*, *Heliotropium ramosissimum*, *Allium cepa L.*, *Taraxacum officinale L.*, *Rosa canina L.*, *Petroselinum crispum*, *Verbascum songaricum Schrenk.*, *Vitex pseudonegundoora*, *Ment à.*, *Peganum harmala L.*, *Citrullus colocynthis*, *Ocimum basilicum*, *Curcuma longa*, İran etnobotanik kaynaklarında arı sokmalarını tedavi etmek için kullanılan en önemli şifalı bitkiler arasındadır. Arı sokmalarında kullanılan en yaygın bitki aileleri arasında Asteraceae ve Lamiaceae bulunur. Ayrıca arı sokmalarında en çok kullanılan bitki organları yapraklar (%37), sürgünler (%20) ve çiçeklerdir (%14). Bu çalışma, İran'ın farklı bölgelerinde arı sokmalarına ve arı sokmalarına karşı bir tedavi ve panzehir olarak tanıtılan bir dizi bitkiyi listeliyor. Bu çalışma, İran'ın farklı bölgelerinde arı sokmalarına karşı bir tedavi olarak kullanılan bir dizi bitkiyi tanıtmaktadır. Bitkilerin bitkisel ilaç ve arı sokmalarına karşı panzehir olarak kullanılabilmesine inanıyoruz. Isırıkların tedavisi için doğal, yararlı ve etkili ilaçların bulunmaması, ısırıkları olan hastalar için etkili ve doğal ilaçlar üzerine araştırmaların genişlemesine yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Arı sokması, Şifalı bitkiler, Halk ilaçları, Geleneksel tıp, Bal arısı

GENİŞLETİLMİŞ TÜRKÇE ÖZET

Giriş: Arı sokmaları en yaygın böcek ısırıklarından biridir. Arılar da dahil olmak üzere bazı böceklerde, zehir beziyle birlikte sokma, ısırılmadan sonra arıların vücudundan ayrılır ve ısırık yerinde kalır. Arı sokmaları ciltte kızarıklık, kaşıntı, enfeksiyona neden olan alerjik reaksiyonlar, baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, göğüs ağrısı, boğulma, nefes almada zorluk ve ısırık bölgesinde felç gibi semptomlarla ilişkilidir. Arı sokmaları çok acı verici ve can sıkıcıdır. Ancak acının yanı sıra kişinin sağlığını da tehlikeye atabilir. Sokmanın yeri çok önemlidir. Örneğin arı sokmaları gözlerde çok tehlikelidir. Arı sokmalarına verilen tepkiler ayrıca zehir miktarına ve bağışıklık tepkisine bağlıdır. Giren zehirin miktarı çoklu ısırıklardan kaynaklanıyorsa, vücuda çok fazla zehir girmişse ve arı ısırılan kişi, solunum problemleri veya ısırık bölgesinde şiddetli ve hızlı şişlikle karşılaşacak ve bu komplikasyonu tedavi etmek için derhal harekete geçmesi gerekecek ve diğerleri, 1995; King ve diğerleri, 1993). Arı sokmalarının yüksek insidansı nedeniyle ve arı sokmalarını tedavi etmek için özel bir ilaç bulunmadığından veya kullanılan ilaçların birçok yan etkisi olduğundan, arı sokmalarında kullanılabilecek

daha az yan etkiye sahip doğal bir ilaç kaynağı kullanmak çok önemli olabilir.

Metodoloji: Bu inceleme, İran'ın kaynaklarında ve makalelerindeki makaleleri gözden geçirmek için yazılmıştır. Bu çalışmada arı sokması, arı sokması, şifalı bitkiler, etno-botanik, şifalı bitkilerin tanımlanması ve İran gibi anahtar kelimeler kullanılmıştır. Makaleleri ve kaynakları gözden geçirmek için ISI Web of Science, PubMed, Scopus, ISC, ISID, Magiran ve Google Scholar gibi veritabanları kullanıldı. Makale girme kriteri, bahsedilen anahtar kelimelerdi ve makaleleri çalışmanın dışında tutma kriteri, her makalenin metninde arı sokmasını önleyici etkiye sahip bitkilerin olmamasıydı.

Bulgular: Buna göre 47 makale arandı ve bulundu ve Üç makalenin tam metin versiyonu bulunamadı. Kaldırılan iki yinelenen makale vardı. Son olarak, 44 makale literatür taraması için gözden geçirildi. 44 makaleden sadece 12'si arı sokmalarının tedavisi için etnobotanik bilgi içeriyordu. *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Ruta graveolens L.*, *Allium sativum*, *Heliotropium ramosissimum*, *Allium cepa L.*, *Taraxacum officinale L.*, *Rosa canina L.*, *Petroselinum crispum*, *Verbascum songaricum Schrenk* gibi şifalı bitkiler, *Vitex pseudonegundoora*

DERLEME / REVIEW

DC, Ment., Peganum harmala L, Citrullus colocynthis, Ocimum basilicum, Curcuma longa, İran etnobotanik kaynaklarında arı sokmalarını tedavi etmek için kullanılan en önemli şifalı bitkiler arasındadır. Arı sokmalarında kullanılan en yaygın bitki aileleri arasında Asteraceae ve Lamiaceae bulunur. Ayrıca arı sokmalarında en çok kullanılan bitki organları yapraklar (%37), sürgünler (%20) ve çiçeklerdir (%14). Arı zehri vücuda zarar verir. Bu yaralanma genellikle ısırığın yakınındaki alanla sınırlıdır ve bazı durumlarda hayatı tehdit edebilecek sistemik ve tehlikeli komplikasyonlara neden olur. Alerjik reaksiyonlar bunları içerir. En tehlikeli ve ölümcül alerjik reaksiyonların yanı sıra ölümlerin çoğu, ısırılmadan sonraki ilk saat içinde meydana gelir. Bunu gidermek ve tedavi etmek için önce arı sokması çıkarılmalı ve iltihabı gidermek için bir buz torbası kullanılmalıdır. Ayrıca kaşıntı ve alerjileri önlemek için antihistaminikler alın. Ağrıyı hafifletmek için ağrı kesiciler tavsiye edilir. Bununla birlikte, kimyasal tedavilerin yan etkileri vardır, bu nedenle uygun bir çözüm olarak doğal ilaçlar kullanılabilir.

Sonuç: Bu çalışma, İran'ın farklı bölgelerinde arı sokmalarına ve arı sokmalarına karşı bir tedavi ve panzehir olarak tanımlanan bazı bitkileri listeliyor. Bu çalışma, İran'ın farklı bölgelerinde arı sokmalarına karşı bir tedavi olarak kullanılan bir dizi bitkiyi tanıtmaktadır. Bitkilerin bitkisel ilaç ve arı sokmalarına karşı panzehir olarak kullanılabilmesine inanıyoruz. Isırıkların tedavisi için doğal, yararlı ve etkili ilaçların bulunmaması, ısırıkları olan hastalar için etkili ve doğal ilaçlar üzerine araştırmaların genişlemesine yol açmaktadır.

INTRODUCTION

Although many insects cause problems with human bites, the insects that are most likely to cause medical problems include bees, common bees, and ants (Oliveira et al., 2007). Among all the insect bites, bee stings should be avoided. Bee stings by themselves may not be a problem, but multiple stings, such as when a beehive falls on a person, can be fatal (Oliveira et al., 2007). Many people are also allergic to bee venom. When bees or wild bees bite, they inject their venom under the surface of the skin. In this case, severe pain, local swelling and redness occur. The pain caused by a bee sting may last for hours or even a day or two (Schumacher et al., 1995; King et al., 1993). Complications of bee stings are red, swollen, itchy, and sometimes painful

(Whitfield et al., 2006; Harpur et al., 2012; Oxley et al., 2020). Bee stings can sometimes cause allergic reactions in some people. Bee stings can also be infected by scratching. Headache, dizziness, nausea, chest pain, suffocation, and difficulty breathing are other symptoms of a bee sting. Also, if the bite is in the ear area, it can cause the toxin to enter the facial nerve, which is located just below the surface of the skin, and cause paralysis of that area of the face (Whitfield et al., 2006; Harpur et al., 2012; Oxley et al., 2020; Bloch et al., 2010). In the treatment of bee stings, it is necessary to pay attention to the fact that there is no specific antidote for bee venom and the treatment depends on the severity of the patient's symptoms. In many cases, they are able to control these allergic reactions (Hoover et al., 2018). Chemical treatments for bee stings include the use of antibiotics, painkillers, and antihistamines, including promethazine, hydroxyzine, loratadine, cetirizine, fexofenadine, or diphenhydramine to prevent allergies and pain (Chen et al., 2016). Among these, one of the treatments used in the treatment of bee stings is the use of complementary medicine (Chen et al., 2016). Indigenous knowledge and traditional medicine can be considered as a part of the unique culture of each land culture (Moayeri et al., 2016; Bahmani et al., 2019; Asfaw and Fentahun, 2020). That knowledge is the findings that have been obtained through experience to adapt to the specific environmental conditions of the ecosystem and have gradually become part of the social and productive systems. Numerous studies have shown that medicinal plants contain antioxidants and effective substances that have many beneficial effects on health and are used for a variety of diseases (Moayeri et al., 2016; Bahmani et al., 2019; Abbasi et al., 2016; Eftekhari, 2020; Zangeneh et al., 2019; Mahdavi et al., 2019; Valadi et al., 2010; Baharvand-Ahmadi et al., 2015).

Bee stings are very painful and annoying. But apart from the pain, it can also endanger a person's health. The location of the sting is very important. For example, bee stings are very dangerous in the eyes. Reactions to bee stings also depend on the amount of venom and the immune response. If the amount of venom entering is due to multiple bites, a lot of venom has entered the body and the bee bite person will face respiratory problems or severe and rapid swelling at the site of the bite and needs immediate action to treat this complication (Schumacher et al., 1995; King et al., 1993). Due to the high incidence of bee stings and since there is no specialized drug to

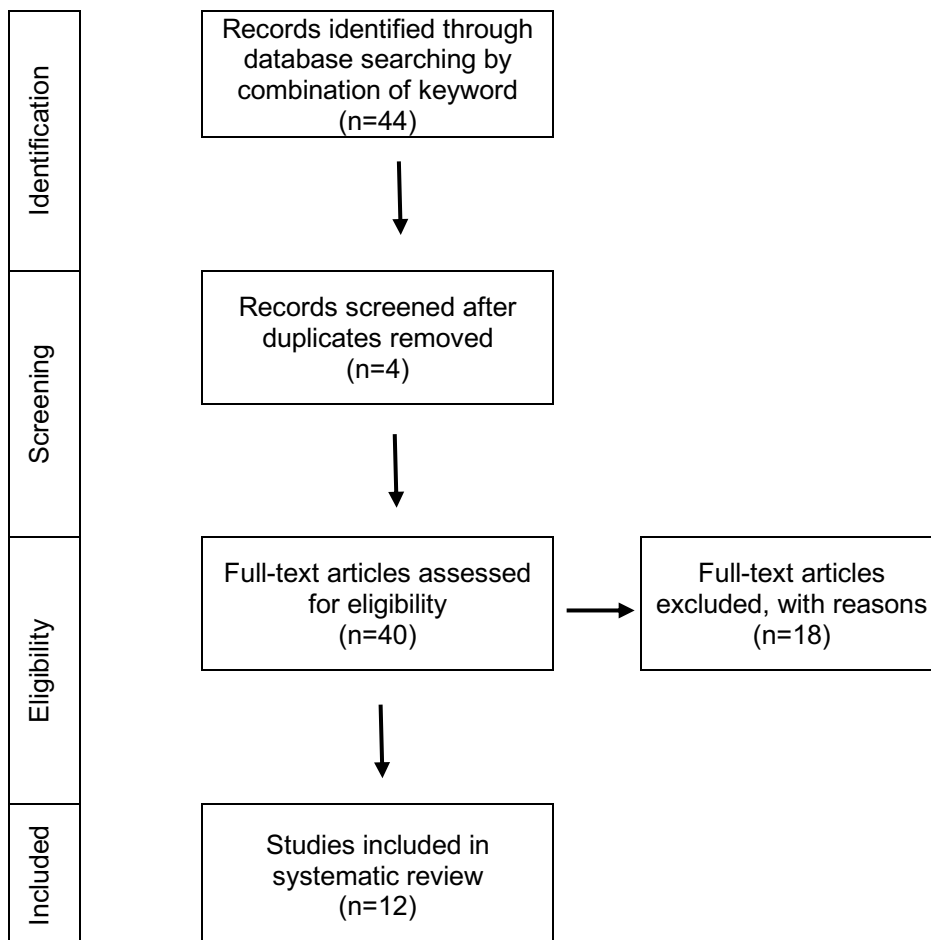
treat bee stings or the drugs used have many side effects, so using a natural source of medicine with fewer side effects that can be used in bee stings can be very important.

METHOD FOR REVIEW

The present review is written to review articles in the sources and articles of the racial people of Iran. In this study, keywords such as bee sting, bee sting, medicinal plants, ethnobotany, identification of medicinal plants and Iran were used. Databases such as ISI Web of Science, PubMed, Scopus, ISC,

ISID, Magiran and Google Scholar were used to review articles and resources. The criterion for entering articles was the mentioned keywords and the criterion for excluding articles from the study was the absence of plants with anti-bee sting effect in the text of each articles. Accordingly, 47 articles were searched and found. Three articles also lacked full text. There were two duplicate articles that were removed. Finally, 44 articles were reviewed for literature review. Out of 44 articles, only 12 articles contained ethnobotanical information for the treatment of bee stings. The flow chart of the search strategy and the inclusion and exit criteria of the articles are specified in Figure. 1.

Figure 1. The criteria and the number of entry and exit articles



DERLEME / REVIEW

RESULTS

In different regions of Iran, such as northern Iran (northeast Persian Gulf), southern of Iran (Khuzestan, Behbahan, Fasa, Kazerun, Abadeh), eastern Iran (Sistan, Mashhad, Khash), western Iran (Dehloran and Abdanan) and central Iran (regions Central Iran, Jandagh) A group of plants used to treat bee stings. A review of Iranian ethnobotanical sources showed that medicinal plants such as *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Ruta graveolens* L., *Allium sativum*, *Heliotropium ramosissimum*, *Allium*

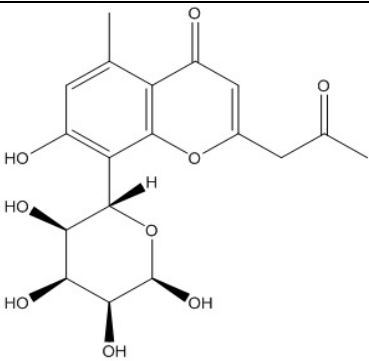
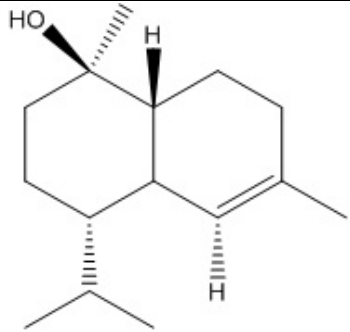
cepa L., *Taraxacum officinale* L., *Rosa canina* L., *Petroselinum crispum*, *Verbascum songaricum* Schrenk, *Vitex pseudonegundo*, *Mentha piperit*, *Achillea eriophora* DC., *Peganum harmala* L., *Citrullus colocynthis*, *Ocimum basilicum*, *Curcuma longa* and also some other plants are among the most important medicinal plants used in Iranian ethnobotanical sources to treat bee stings. The list of plants, families, organs used, and the respective city is given in Table 1 and bioactive compounds, chemical/Molecular formula and figure of medicinal plants affecting bite on Table 2.

Table 1. Medicinal plants affecting bite and additional information about the organ used, Persian name, region used

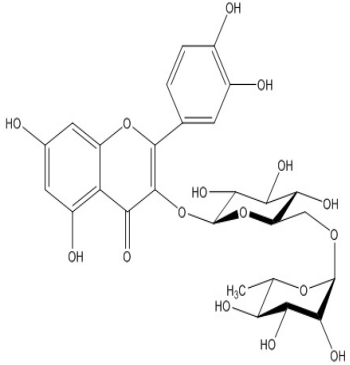
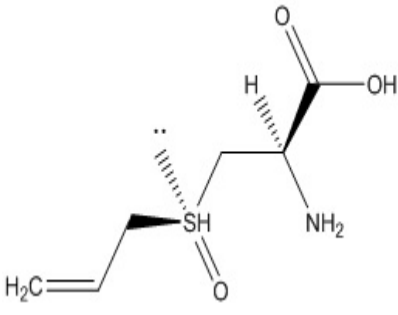
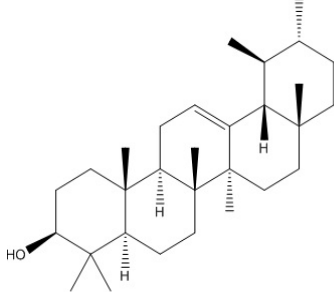
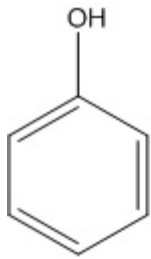
Scientific names	Ffamily	Persian name	Organ used	Region used	Bioactive compounds	Chemical formula
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	Alovera	Leaves	Behaman (Razmjoue et al., 2017)	Aloesin	C ₁₉ H ₂₂ O ₉
<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae Pot marigold	Pot marigold	flowers	Behaman (Razmjoue et al., 2017)	α-cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	Common rue	Aerial organs	Behaman (Razmjoue et al., 2017)	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
<i>Allium sativum</i>	Amaryllidaceae	Garlic	Onion	Jandagh (Ghasemi Dehkordi et al., 2012)	Alliin	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S
<i>Heliotropium ramosissimum</i>	Boraginaceae	Aftabparaste porshkhe	Leaves	Jandagh (Ghasemi Dehkordi et al., 2012)	β-amyrin	C ₃₀ H ₅₀ O
<i>Allium cepa</i> L.	Amaryllidaceae	Piaz	Onion	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	Phenol	C ₆ H ₅ OH
<i>Taraxacum officinale</i> L.	Asteraceae	Dandelion	flowers	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	Phenol	C ₆ H ₅ OH
<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	Dog rose	Fruits	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	Oleanolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	Parsley	Leaves	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	Coumarin	C ₉ H ₆ O ₂
<i>Verbascum songaricum</i> Schrenk.	Scrophulariaceae	Benje mari	Aerial organs	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	Butanoic acid	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
<i>Vitex pseudonegundo</i>	Verbenaceae	Bangrou	Leaves and flowers	Khuzestan (Khodayari et al., 2012)	1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	Mentha longifolia var. asiatica	Leaves	Northeast Persian Gulf (Rajaei et al., 2012)	Menthol	C ₁₀ H ₂₀ O
<i>Achillea eriophora</i> DC.	Asteraceae	Yarrow	Leaves and flowers	Northeast Persian Gulf (Rajaei et al., 2012)	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O
<i>Heliotropium europaeu</i>	Boraginaceae	Aftabparast	Leaves	Fasa (Ramezani et al., 2016)	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O
<i>Peganum harmala</i> L.	Zygophyllaceae	Peganum harmala	Fruits and Leaves	Dehloran and Abdanan (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013)	Harmaline	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O
<i>Citrullus colocynthis</i>	Curcubitaceae	Squash	Fruits	Sistan and Baluchestan (Dolatkhahi et al., 2012)	Anthrano	C ₁₄ H ₁₀ O
<i>Heliotropium europaeum</i> L.	Boraginaceae	Aftabparast	Aerial organs	Kazeroun (Iranmanesh et al., 2010)	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

<i>Calotropis procera</i>	Apocynaceae	Calotropis procera	Leaves and branches	Khash (Mirshekar et al., 2019)	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	Hyssop	Leaves	Central Regions of Iran (Mirshekar et al., 2019)	Isopinocampone	C ₁₀ H ₁₆ O
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	Basil	Leaves	Khuzestan (Khodayari et al., 2015)	Methyl eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
<i>Dracocephalum</i> spp.	Lamiaceae	Dracocephalum	Aerial organs	Khuzestan (Khodayari et al., 2015)	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Turmeric	Aerial organs	Northeast Persian Gulf (Rajaei et al., 2012)	Curcumin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
<i>Artemisia aucheri</i>	Asteraceae	Mugworts	Seeds and flowering branches	Fasa (Ramezani et al., 2016)	Camphene	C ₁₀ H ₁₆
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Thymes	Aerial organs	Dehloran and Abdanan (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013)	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O
<i>Doronicum pardalianches</i> L.	Asteraceae	Darvaj	Root	Sistan and Baluchestan (Dolatkhahi et al., 2012)	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄

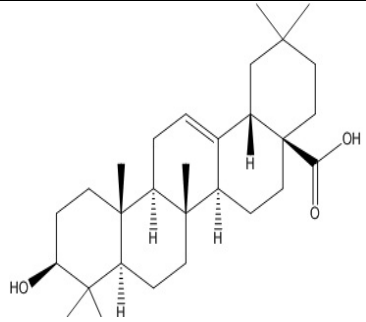
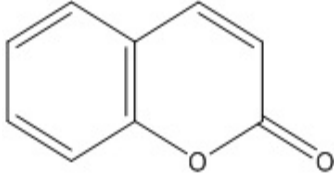
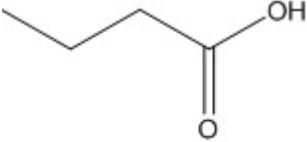
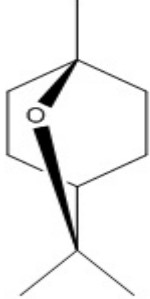
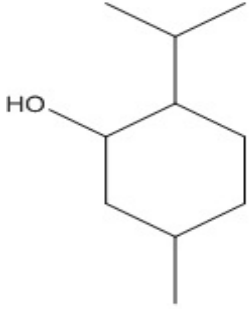
Table 2. Bioactive compounds, chemical/Molecular formula and figure of medicinal plants affecting bite

Bioactive compounds	Chemical formula	Figure of molecular formula
Aloesin	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	
α-cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	


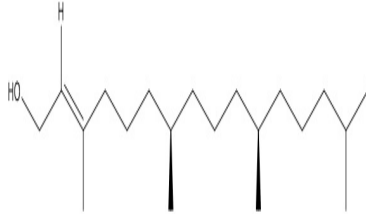
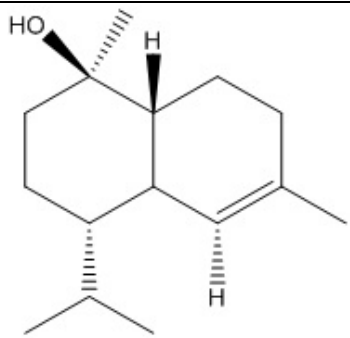
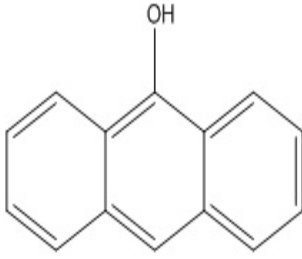
DERLEME / REVIEW

Rutin	$C_{27}H_{30}O_{11}$	
Alliin	$C_6H_{11}NO_3S$	
β -amyrin	$C_{30}H_{50}O$	
Phenol	C_6H_5OH	

DERLEME / REVIEW

Oleanolic acid	$C_{30}H_{48}O_3$	
Coumarin	$C_9H_6O_2$	
Butanoic acid	$CH_3CH_2CH_2CO_2H$	
1,8-Cineole	$C_{10}H_{18}O$	
Menthol	$C_{10}H_{20}O$	

DERLEME / REVIEW

Camphor	$C_{10}H_{16}O$	
Phytol	$C_{20}H_{40}O$	
Harmaline	$C_{13}H_{14}N_2O$	
Anthranol	$C_{14}H_{10}O$	

As shown in figure 1, the most common plant families used for bee stings are Asteraceae and Lamiaceae. Also, most of the plant organs used in

bee stings included leaves (37%), shoots (20%) and flowers with 14%. Other additional information in this regard is shown in figure 1.

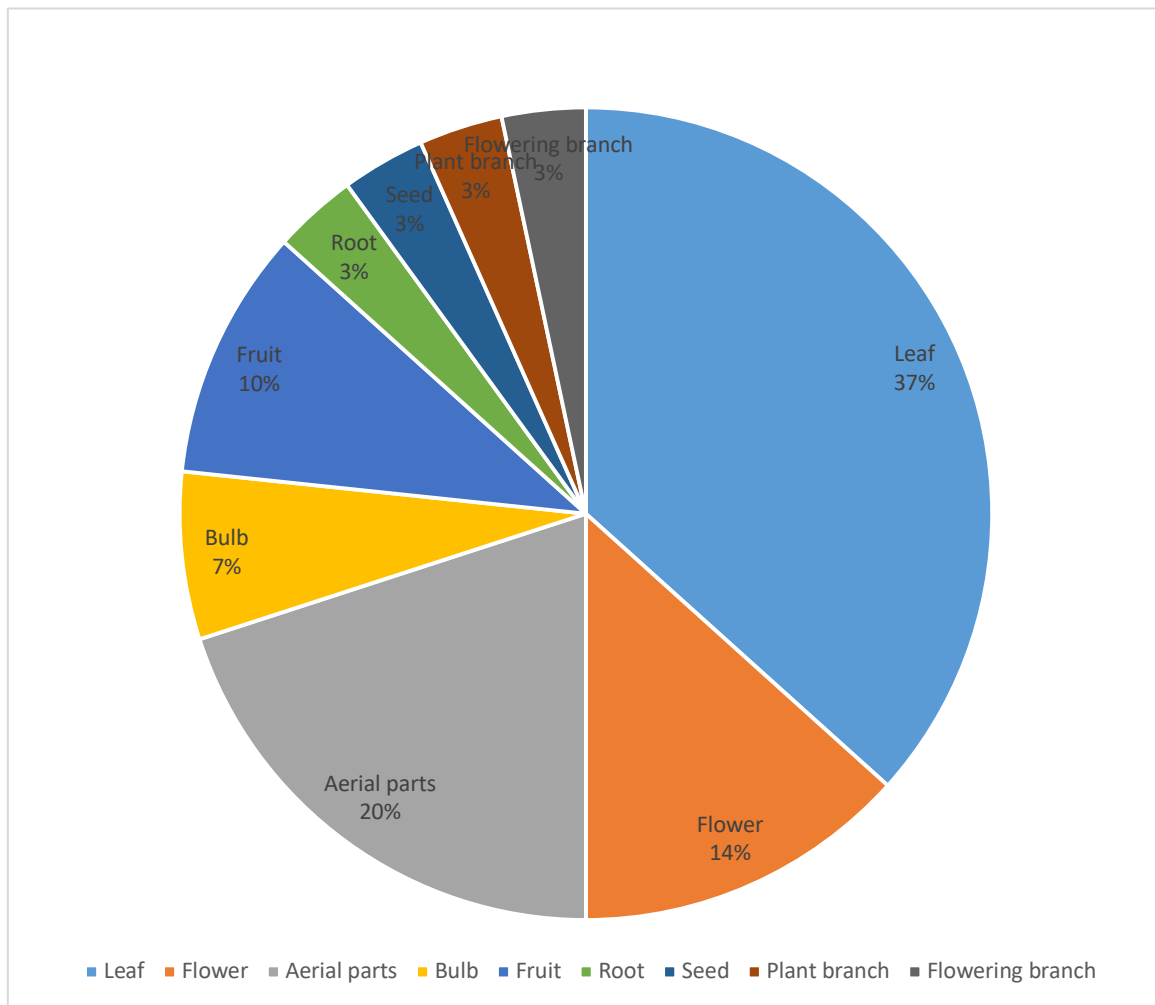


Figure 1. Percentage of use of plant organs for bee stings in this study

DISCUSSION

Bee venom causes damage to the body. This injury is usually limited to the area near the bite and in some cases causes systemic and dangerous complications that can even be life threatening. Allergic reactions include these. Most dangerous and deadly allergic reactions, as well as most deaths, occur within the first hour after the bite (Hoover and Ovinge, 2018; Chen et al., 2016). In cases of bee stings, symptoms such as swelling of the lips, tingling in the hands, hypotension and dizziness, severe shortness of breath and anesthesia should occur, the person should go to the emergency room and be treated. In this case, the so-called medical person suffers from anaphylactic

shock. If a person suffers from this shock, the next time the bee stings, they should inject 0.1 cc ampoule of epinephrine, which is a subcutaneous ampule, before going to the emergency room. In the absence of the above symptoms, the sting is accompanied by severe swelling and pain. To relieve and treat it, the bee sting must first be removed and an ice pack must be used to relieve the inflammation. Also take antihistamines to prevent itching and allergies. Painkillers are recommended to relieve pain. However, chemical treatments have side effects, so natural remedies can be used as a suitable solution (Shakib et al., 2020; Karimian, 2019).

DERLEME / REVIEW

Traditional medicine and ethnobotanical knowledge for most diseases have herbal prescriptions. In this study, it was found that in Iran, medicinal plants such as *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Ruta graveolens* L., *Allium sativum*, *Heliotropium ramosissimum*, *Allium cepa* L., *Taraxacum officinale* L., *Rosa canina* L., *Petroselinum crispum*, *Verbascum songaricum* Schrenk, *Vitex pseudonegundo*, *Mentha piperita*, *Achillea eriophora* DC., *Peganum harmala* L., *Citrullus colocynthis*, *Ocimum basilicum*, *Curcuma longa* and also some other plants are among the most important medicinal plants used in Iranian ethnobotanical sources to treat bee stings. In the knowledge of traditional Indian medicine Medicinal plants such as *Acanthus ilicifolius* Linn., *Achyranthes aspera* Linn., *Aconitum balfourii* (Bruhl) Muk. *Adiantum lunulatum* Linn., *Aegle marmelos* (Linn.) Correa, *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schult, *Allium cepa* Linn., *Citrullus colocynthis* (Linn) Schrad., *Allium sativum* Linn, *Butea monosperma* (Lamk.) Taub are used in cases of venomous bites (snakes) (Khan et al., 2014; Singh et al., 2012; Ayyanar et al., 2011; Alagesaboopathi et al., 2013).

Another study found that *Mimosa pudica*, *Soymida febrifuga*, and *Tephrosia purpurea* were used in cases of bites (Kunjam et al., 2013). In Iranian medicine, medicinal plants such as *Ruta graveolens* L., *Allium cepa* L., *Vitex pseudonegundo*, *Artemisia aucheri* and *Doronicum pardalianches* L. are used to treat scorpion bites and snake bites (Astaraki et al., 2019). The results of studies showed that the native medicinal plants of each region are diverse and different in the discussion of bites, and the reason is the medicinal cultures and experimental knowledge of different regions, which are different. It can be said that medicinal plants are used not in raw form in the form of plants but as effective herbal medicines in the treatment of diseases (Alizadeh et al., 2018; Abbaszadeh et al., 2018; Sedighi et al., 2019; Nouri et al., 2019; Gholami-Ahangaran et al., 2020; Salahvarzi et al., 2020; Baharvand-Ahmadi et al., 2015).

This article lists a number of plants that have been introduced in different parts of Iran as a treatment and antidote against bee stings and bee stings. Based on the knowledge of traditional and ethno-herbal medicine of Iran, we believe that they can be used as medicine and herbal antidotes against bites, especially bee stings. Existence of interest and knowledge in this science in different Iranian ethnic groups has led to the use of valuable methods for finding new medicinal plants and herbal remedies

against bee stings. Lack of natural, useful and effective drugs for the treatment of bites leads to the expansion of research on effective and natural drugs for patients with bites.

Conflicts of interest

The authors declared no competing interests.

Ethical considerations

Ethical issues (including plagiarism, data fabrication, double publication and etc.) have been completely observed by author.

Funding/Support

None.

REFERENCES

- Abbasi, N, Khosravi, A, Aidy, A, Shafiei, M. 2016. Biphasic response to luteolin in MG-63 osteoblast-like cells under high glucose-induced oxidative stress. *Iran J Med Sci.* 41(2): 118-125.
- Abbaszadeh, S, Andevvari, AN, Koohpayeh, A, Naghdi, N, Alizadeh, M, Beyranvand, F, Harsej, Z. 2018. Folklore medicinal plants used in liver disease: A review. *Int J Green Pharma.* 12(3): 463-472.
- Alagesaboopathi, C. 2013. Ethnomedicinal plants used for the treatment of snake bites by Malayali tribals and rural people in Salem district, Tamilnadu, India. *Int J Biosci.* 3: 42-53.
- Alizadeh, M, Safarzadeh, A, Bahmani, M, Beyranvand, F, Rafieian-Kopaei, M, Abbaszadeh, S. 2018. Brucellosis: Pathophysiology and new promising treatments with medicinal plants and natural antioxidants. *Asian Pacific J Trop Med.* 11(11): 597-608.
- Asfaw M and Fentahun T (2020). Treatment trials of epizootic lymphangitis with local medicinal plants: a review. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 10(4): 158-161.
- Astaraki, P, Basati, G, Abbaszadeh, S, Mahmoudi, GA. 2019. A review of medicinal plants used for snakebites and scorpion stings in Iran: A systematic review. *Res J Pharmacy Technol.* 13(3): 1565-1569.
- Ayyanar, M, Ignacimuthu, S. 2011. Ethnobotanical survey of medicinal plants commonly used by

- Kani tribals in Tirunelveli hills of Western Ghats, India. *J Ethnopharmacol.* 134: 851–64.
- Baharvand-Ahmadi, B., Bahmani, M., Naghdi, N., Saki, K., Sara, Baharvand-Ahmadi, Rafieian-Kopaei, M. 2015. Medicinal plants used to treat infectious and non-infectious diseases of skin and skin appendages in city of Urmia, northwest Iran. *Der Pharmacia Lettre.* 7 (11): 189-196.
- Baharvand-Ahmadi, B., Bahmani, M., Zargaran, A., Eftekhari, Z., Saki, K., Baharvand-Ahmadi, S., Rafieian-Kopaei, M. 2015. *Ruta graveolens* plant: A plant with a range of high therapeutic effect called cardiac plant. *Der Pharmacia Lettre.* 7 (11): 172-173.
- Bahmani, M., Taherikalani, M., Khaksarian, M., Rafieian-Kopaei, M., Ashrafi, B., Nazer, M., Soroush S. Abbasi N, Rashidipour M. 2019. The synergistic effect of hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Hypericum perforatum* and their active components carvacrol and hypericin against *Staphylococcus aureus*. *Future Sci OA.* 5(3): Article number FSO371.
- Bahmani, M., Mozaffari Nejad, A.S., Shah, N.A., Shah, S.A., Rafieian-Kopaei, M., Mahmoodnia, L. 2017. Survey on ethnobotanical uses of anti-cancer herbs in southern region of Ilam, west Iran. *J Biolog Res.* 90 (1): 5939.
- Bloch, G, Francoy, TM, Wachtel, I, Panitz-Cohen, N, Fuchs, S, Mazar, A. 2010. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proc Natl Acad Sci.* 107:11240–4.
- Chen, J, Guan, S-M, Sun, W, Fu H. 2016. Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neurosci Bull.* 32:265–72.
- Dolatkhahi, M, Ghorbani-Nahouji, M, Mehrafarin, A, AminiNezjad, GHR, Dolatkhahi, A. 2012. Ethnobotanical study of medicinal plants in Kazerun city: Identification, distribution and traditional uses. *J Med Plants.* 11(2): 163-178.
- Eftekhari, Z. 2020. Garlic: A brief overview of its interaction with chemical drugs. *Plant Biotechnol Persa.* 2 (2): 31-32.
- Ghasemi Dehkordi, N, Nourouzi, M, SafaeiAziz, A. 2012. Collecting and reviewing selected traditional uses of plants in Jandagh. *J Islamic Iranian Tradition Med.* 3(1): 105-112.
- Ghasemi Pirbalouti, A, Momeni, M, Bahmani, M. 2013. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used by Kurd Tribe in Dehloran and Abadan Districts, Ilam Province, Iran. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 10(2):368-000.
- Gholami-Ahangaran, M, Ostadpoor, M, Heidari, S H. 2020. An Overview of Cinnamon Properties Effects on Blood Glucose and Hemoglobin A1C in Diabetic People. *Plant Biotechnol Persa.* 2 (2): 33-37.
- Harpur, BA, Minaei, S, Kent, CF, Zayed, A. 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Mol Ecol.* 21:4414–21.
- Hoover, SE, Ovinge, LP. 2018. Pollen collection, honey production, and pollination services: managing honey bees in an agricultural setting. *J Econ Entomol.* 111:1509–16.
- Iranmanesh, M, Najafi, SH, Yousefi, M. 2010. Ethnobotany study of medicinal plants in Sistan region. *J Herb drugs.* 2: 61-.68.
- Karimian, M. 2019. Natural remedies for vascular diseases. *Plant Biotechnol Persa.* 1 (1):1-3.
- Khan, AV, Ahmed, QU, Khan, MW, Khan, AA. 2014. Herbal cure for poisons and poisonous bites from Western Uttar Pradesh, India. *Asian Pacific J Trop Dis.* 4: 116–20.
- Khodayari, H, Amani, SH, Amiri, H. 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants in different regions of Khuzestan province. *Eco-phytochemical J Med Plants.* 8(2):12-6.
- King, TP, Coscia, MR, Kochoumian, L. 1993. Structure-immunogenicity relationship of melittin and its N-terminal truncated analogs. *Biochem.* 32:3506–10.
- Kunjam, SR, Jadhav, SK, and Tiwari, KL. 2013. Traditional Herbal Medicines for the Treatment of Snake Bite and Scorpion Sting by the Tribes of South Surguja, Chhattisgarh, India. *Med Aromat Plants.* 2:1; doi.org/10.4172/2167-0412.1000120.
- Mahdavi, B, Saneei, S, Qorbani, M, Zhaleh, M, Zangeneh, A, Zangeneh, MM, Pirabbasi, E, Abbasi, N, Ghaneialvar, H. 2019. *Ziziphora clinopodioides* Lam leaves aqueous extract mediated synthesis of zinc nanoparticles and

DERLEME / REVIEW

- their antibacterial, antifungal, cytotoxicity, antioxidant, and cutaneous wound healing properties under in vitro and in vivo conditions. *Appl Organometallic Chem.* 33 (11): no. 5164.
- Mirshekar, M, Ebrahimi, M, Ajourlo, M. 2019. Ethnobotanical study and traditional uses of some medicinal plants in Khash city. *J Islamic Iranian Tradition Med.* 9 (4): 361-371.
- Moayeri, A, Azimi, M, Karimi, E, Aidy, A, Abbasi, N. 2018. Attenuation of Morphine Withdrawal Syndrome by *Prosopis Farcta* Extract and Its Bioactive Component Luteolin in Comparison with Clonidine in Rats. *Med Sci Monitor Basic Res.* 24(9): 151-158.
- Nouri, A, Heidarian, E, Amini-Khoei, H, Abbaszadeh, S, Basati, G. 2019. Quercetin through mitigation of inflammatory response and oxidative stress exerts protective effects in rat model of diclofenac-induced liver toxicity. *J Pharma Pharmacog Res.* 7(3): 200-212.
- Oliveira, EC, Pedroso, PM, Meirelles, AE, Pescador, CA, Gouvêa, AS, Driemeier, D. 2007. Pathological findings in dogs after multiple Africanized bee stings. *Toxicon.* 49:1214-8.
- Oxley, PR, Oldroyd, BP. 2020. Chapter 3—the genetic architecture of honeybee breeding. *Adv Insect Physiol.* 39:83–118.
- Rajaei, P, Mohamadi, N. 2012. Ethnobotanical study of medicinal plants of Hezar mountain allocated in South East of Iran. *Iran J Pharm Res.* 11(4):1153-67.
- Ramezani, M, MinaeiFar, AA. 2016. Ethnobotanical study of medicinal plants in Fasa county. *J Islamic Iranian Tradition Med.* 7(2):221-31.
- Razmjoue D, Zarei Z, Armand R. 2017. Ethnobotanical study (identification, medical properties and how to use) of some medicinal plants of Behbahan city of Khuzestan province, Iran. *Journal of Medicinal Plants.* 16(64):33-50.
- Salahvarzi, S, Shakib, P, Pirhadi, M, Alikord, M, Jahed Khaniki, G. 2020. Helicobacter Phytotherapy: Medicinal Plants Affecting Helicobacter Pylori Infection in Iran. *Plant Biotechnol Persa.* 2 (2): 38-42.
- Schumacher, MJ, Egen, NB. 1995. Significance of Africanized bees for public health: a review. *Arch Intern Med.* 155: 2038–43.
- Sedighi, M, Sewell, R.D.E, Nazari, A, Abbaszadeh, S, Cheraghi, M, Amini, A, Heydari, Z, Rafieian-Kopaei, M. 2019. A review on the most important medicinal plants effective in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharmac Design.* 25(3): 352-358.
- Shakib, P, Bahmani, M, Parsaee, P. 2020. Drug Interaction of *Glycyrrhiza glabra* L. with Chemical Drugs: A mini Review Article. *Plant Biotechnol Persa.* 2 (2): 28-30.
- Singh, EA, Kamble, SY, Bipinraj, NK, Jagtap, SD. 2012. Medicinal plants used by the Thakar tribes of Raigad district, Maharashtra for the treatment of snake-bite and scorpion-bite. *Int J Phytother Res.* 2: 26–35.93.
- Valadi, A, Nasri, S, Abbasi, N, Amin, GR. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of *Anethum graveolens* L. seed. *J Med Plants.* 9(34):124-130.
- Whitfield, CW, Behura, SK, Berlocher, SH, Clark, AG, Johnston, JS, Sheppard, WS, et al. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science,* 314: 642–5.
- Zangeneh, MM, Ghaneialvar, H, Akbaribazm, M, Ghanimatdan, M, Abbasi, N, Goorani, S, Pirabbasi, E, Zangeneh, A. 2019. Novel synthesis of *Falcaria vulgaris* leaf extract conjugated copper nanoparticles with potent cytotoxicity, antioxidant, antifungal, antibacterial, and cutaneous wound healing activities under in vitro and in vivo condition. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 197: no. 111556.

BAL ARILARINDA PROBİYOTİK BAKTERİLERİN KULLANIMI

Use of Probiyotic Bacteriae in Honey Bees

Ayşe Ebru BORUM

Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, TÜRKİYE, ORCID No: 0000-0002-6916-8982, E-posta: ebruborum@balikesir.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 02.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 26.03.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.889744

ÖZ

Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler bağırsak florasını düzenler, bakteriyel toksinlere karşı hidrolitik enzimler salgılar, toksin reseptörlerini inaktive eder, immün sistemi düzenler, patojenlerin virülensini azaltır, olumsuz metabolitleri azaltır, yararlı metabolitleri artırır, infeksiyonlarda ve inflamatuvar hastalıklarda tedavi ve korunmada rol oynar. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait çeşitli türler, bugüne kadarki en popüler probiyotik etkenlerdir. Son yıllarda probiyotikler, hem insanlarda hem de hayvanlarda tedavi edici ve koruyucu amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda bal arısı sağlığında da oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bal Arısı, Probiyotik, Tedavi, Koruyucu

ABSTRACT

Probiotics provide health benefits to the host when not administered adequately. Probiotics regulate the intestinal flora, secrete hydrolytic enzymes against bacterial toxins, inactivate toxin receptors, regulate the immune system, reduce the virulence of pathogens, reduce negative metabolites, increase their metabolites, play a role in infections and inflammatory diseases and protection. Various species belonging to the *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Bifidobacterium* genera are by far the most popular probiotic agents. Recent probiotics are being used for therapeutic and preventive purposes in both humans and animals. The latest news has started to be used quite frequently in the honey bee right.

Keywords: Honey Bee, Probiotic, Treatment, Preservative

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Probiotics are live microorganisms that, when administered in sufficient quantity, provide health benefits to the host. Various species belonging to the *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Bifidobacterium* genera are the most popular probiotic agents to date. Probiotics regulate the intestinal flora, secrete hydrolytic enzymes against bacterial toxins, inactivate toxin receptors, regulate the immune system, reduce the virulence of

pathogens, reduce negative metabolites, increase beneficial metabolites, play a role in the treatment and prevention of infections and inflammatory diseases. In recent years, probiotics have been used both prophylactically and therapeutically in both humans and livestock due to their ability to regulate the gut microbiota and immunological systems. Especially intestinal bacteria are widely used as probiotics. These probiotics are added to foods and diets.

DERLEME / REVIEW

Discussion: Among probiotic bacteria, especially lactic acid and acetic acid bacteria, they tolerate acidic pH, are effective in the metabolism of various sugars and have interesting properties such as organic acid production. These unique properties play a role in preventing the colonization of the sugar-rich digestive tract of honey bees and the spread and growth of acid-sensitive pathogenic bacteria. Among probiotic bacteria, especially lactic acid and acetic acid bacteria, they tolerate acidic pH, are effective in the metabolism of various sugars and have interesting properties such as organic acid production. These unique properties play a role in preventing the colonization of the sugar-rich digestive tract of honey bees and the spread and growth of acid-sensitive pathogenic bacteria. The development of the hypopharyngeal glands is stimulated with the structure known as "fat bodies", which is important in energy and metabolism in honey bees where probiotic bacteria are added to their food, and the rate of protein utilization has also increased. Lactic acid bacteria (LAB), the natural inhabitants of the honey bee gastrointestinal tract, play an important role in maintaining the intestinal microbial ecosystem. Honey bee LABs are very important in food digestion, high stimulation of the bees' immune system, elimination of pathogens, and maintenance of microflora homeostasis in the honey bee intestine. Lactic acid bacteria are known to produce antimicrobial agents (antimicrobial peptide-AMP) that eliminate pathogenic microorganisms. Thirty species of lactobacillus were used in honey bee research where lactic acid bacteria were used as probiotics. These bacteria *P.larvae* (American foulbrood-AFB), *Melissococcus plutonius* (European foulbrood-EFB), *Nosema apis* and *Nosema cerena*. It has been determined that there are many benefits such as protection, treatment, survival rate, reduction of pathogen burden in honey bee pathogens and the infections they cause. Most of the research on *Bifidobacterium* supplementation in honey bees has focused on stimulating brood production, increasing colony production, and their use in the treatment of fungal diseases such as nosemosis and chalkbrood disease.

Conclusion: The high density of honey bees in the colony, trophallaxis among the members of the colony and feeding of the offspring by caregivers are important in spreading diseases among the individuals in the colony. For these reasons, the use of probiotics as an alternative to antibiotics is of particular importance in preventing and combating

diseases in honey bees. Probiotics are defined as living, safe microorganisms that positively affect health and support the prolongation of their host's lifespan.

GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalardır. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait çeşitli türler, bugüne kadarki en popüler probiyotik etkenlerdir (Oliveira v.d. 2017). Probiyotikler bağırsak florasını düzenler, bakteriyel toksinlere karşı hidrolitik enzimler salgılar, toksin reseptörlerini inaktive eder, immün sistemi düzenler, patojenlerin virülensini azaltır, olumsuz metabolitleri azaltır, yararlı metabolitleri artırır, infeksiyonlarda ve inflamatuvar hastalıklarda tedavi ve korunmada rol oynar (Chen v.d. 2017, Diaz-Vergara v.d. 2017, Hossain v.d. 2017). Son yıllarda probiyotikler, insanlarda ve birçok çiftlik hayvanında bağırsak mikrobiyotasını ve immünolojik sistemleri düzenleme yetenekleri nedeniyle hem profilaktif hem de tedavi edici olarak kullanılmaya başlamıştır (Celiberto v.d. 2017, Chen v.d. 2017). Özellikle bağırsak kökenli bakteriler probiyotik olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu probiyotikler genelde gıda ve diyetlere ilave edilerek kullanılır (Gourbeyre v.d. 2011).

Probiyotiklerin sağlık için kullanımı, insan ve hayvan beslenmesinin yanı sıra çeşitli omurgasızların gıdalarında da kullanılmaya başlanmıştır (Patterson ve Burkholder 2003, Talpur v.d. 2012). Probiyotik bakteriler, izole edildikleri türlerin diyetine eklendiğinde daha faydalıdır (Ptaszyńska v.d. 2016). Probiyotik bakterilerden özellikle laktik asit ve asetik asit bakterileri, asidik pH'ye tolerans gösterir, çeşitli şekerlerin metabolizmasında etkilidir ve organik asit üretimi gibi ilgi çekici özelliklere sahiptir. Bu özellikleri sayesinde, bal arılarının şeker açısından zengin sindirim kanalının kolonizasyonunu ve aside duyarlı patojenik bakterilerin yayılmasını ve gelişmesinin engellenmesinde rol oynar (Hamdi v.d. 2011).

Gıdalarına probiyotik bakteri ilave edilen bal arılarında enerji ve metabolizmada önemli olan, "fat bodies" (yağ doku) olarak bilinen yapı ile *hypopharyngeal* bezlerin gelişimi uyarılmış, ayrıca proteinden yararlanma oranları da artmıştır (Kazimierczak-Baryczko ve Szymas 2006).

Bağırsak mikrobiyotası arı sağlığında önemli bir rol oynadığından, antibiyotik kullanımına bağlı olarak arı bağırsağı mikrobiyotasının dengesi de bozulabilmektedir (Martinson v.d. 2012). Avrupa'da bal arısı ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının bulunması bal arısının yaşam süresi ve canlılığı üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu için antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır, bu nedenle doğal alternatif arayışlar artmıştır (Genersch 2010). Bal arısının bağırsak sistemi, sayı ve çeşit olarak insan ve diğer hayvanlara göre daha az sayıda bakteri içerir. Arka bağırsakta yoğunlaşan sekiz ana bakteri grubundan oluşur. İki Alfa, bir Beta -, iki Gammaproteobacteria, iki yakından ilişkili *Lactobacillus* grubu (Firm 4, 5) ve bir *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium asteroides*) (Moran 2015). Bazıları tüm bal arılarında (*Lactobacilli*, Beta- ve Gammaproteobacteria) bulunur, ancak diğer bakteri grupları bazı bireylerde tamamen bulunmayabilir (Moran v.d. 2012). Bağırsak mikrobiyotasında bulunan en önemli Gram-negatif üyeleri olan; *Snodgrassella alvi* (*S. alvi*) ve *Gilliamella apicola* (*G. apicola*), *Apis mellifera* (bal arısı) ve *Bombus* spp. (bombus arısı) arı ailelerinin ortak simbiyontlarıdır. *Frischella perrara* (*F. perrara*) ve *Bartonella apis* (*B. apis*) ise yalnızca *Apis* spp'de bulunan ve konakçıya daha spesifik olan etkenlerdir (Moran v.d. 2012, Kwong v.d. 2017b). Antimikrobiyal kimyasallara maruz kalma, önemli mikrobiyota üyelerinde azalmaya sebep olabilir (Raymann v.d. 2018).

Antibiyotikler gibi kimyasal maddelere maruz kalarak dengesi bozulmuş mikrobiyotanın, sağlıklı donör kovanlarından alınan veya karakterize edilmiş bir mikrobiyal konsorsiyumdan gelen dışkı maddesi kullanılarak yeniden düzenlenmesi, mikrobiyota fonksiyonlarını yenilemektedir. Hastalığa dirençli fenotiplerin, bombus arılarında mikrobiyota nakli yoluyla aktarılabilir olduğu gösterilmiştir (Näpflin ve Schmid-Hempel 2016).

Bağırsak bakterileri, bal arısı larvalarının bağırsıklığını uyarır ve patojenlere karşı bağırsıklık tepkilerinin artmasını sağlar. Larvaları, probiyotik bakteriler ile desteklenen bir diyetle beslemek, bağırsıklıkta görev alan genlerin transkripsiyonunu uyarır. Böylece patojenlere karşı immun yanıtı artırır (Evans ve Lopez 2004).

Bombus arılarında yapılan deneysel bir çalışmada, bağırsak mikrobiyotasının tripanozomatid parazit *Crithidia bombi*'ye (*C. bombi*) direnç sağladığını göstermiştir. Yeni arılara, dirençli bombus arılarından elde edilen fekal mikrobiyota nakli yapılmasının onları infeksiyonlardan koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca, vahşi bombus arılarında, betaproteobakteriyel bağırsak simbiyontu *S. alvi* yoğunluğu ile *Crithidia* varlığı arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir (Koch ve Schmid-Hempel 2011).

Arıcılık alanında diyet takviyeleri içeren ticari probiyotikler bulunmaktadır. Bal arılarında ilk probiyotik uygulaması 1997'de yapılmıştır (Machova v.d.1997). Probiyotik kullanımının yararlı olduğunu gösteren araştırmalar olduğu gibi yanlış probiyotik kullanımının arı sağlığı üzerinde olumsuz durumlara sebep olabileceğini bildiren çalışmalar da vardır. Bu nedenle arılara probiyotik uygulaması yapılacak bakteri türü oldukça önemlidir. Daha önce yapılan bazı çalışmalar bal arısı bağırsak mikrobiyomunun kommensal olmayan bakterilere nadiren dost olduğunu gösterdiğinden, probiyotik bakteriler için seçenekler sınırlıdır. Genel olarak, bal arılarına yararlı bakteriler çoğunlukla laktik asit bakterilerinin uygulanmasını içerir. Arılarda Amerikan yavru çürüklüğüne (AYÇ) karşı bir besin karışımı ve üç farklı *Lactobacillus* türü olan besin takviyesi uygulanmış, infeksiyon etkeni *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*)'ye karşı kullanılan üç bakteri türü ile yapılan önceki *in vitro* çalışmalarda, inhibitör aktivite görülmüştür. Ayrıca doğal bir AFB salgınından önce bu bakterilerin karışımı takviye ile arılar beslenmiş ve tedavi edilen arılar daha iyi hayatta kalmıştır. Bununla birlikte, *Lactobacillus* sp. çoğunlukla ön bağırsak mikroflorasında bulunur. *P. larvae* ise çoğunlukla orta bağırsakta kolonize olup gelişir. Bu nedenle indirekt etki gösterir. Ayrıca hastalık öncesi birden fazla Eylem Modu (MOA-Modes of Action) yolu infeksiyona duyarlılığı artırır. Yine dysbiosis dediğimiz bağırsak mikroflorasındaki dengesizlik de duyarlılığı etkileyebilir (Daisley v.d. 2020a). Bal arılarına probiyotik ilavesi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalarda kullanılan probiyotikler ve belirlenen yararları Tablo 1'de özetlenmiştir.

DERLEME / REVIEW

Tablo1: Probiyotik olarak ilave edilen bazı bakteri suşları ve etkileri

Table 1: Some strains of bacteria added as probiotics and their effects

Kullanılan probiyotikler	Probiyotik ilavesinin etkisi	Etkili olduğu düşünülen mekanizmalar	Kaynaklar
<i>Lactobacillus brevis</i>	Fırsatçı Enterobacteriaceae azalma Mikrobiyatada gelişme	İmd ve Toll immün sinyal yollarının modülasyonu ile konak antimikrobiyal peptidlerde (AMP) artış	Maruscakova v.d. 2020
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	*Yaklaşık olarak kovan popülasyonunda %36, bal veriminde % 21 artış **4 haftalık takviyeden sonra yaklaşık yumurta veriminde % 46, polen % 53 ve bal üretiminde % 59 artma	Ana arının yumurtlamasının uyarılması Çekirdek besin destekleyici türlerin laktat aracılı çapraz beslenmesi	Audisio ve Benitez-Ahrendts 2011 Alberoni v.d. 2018
<i>Lactobacillus salivarius</i>	* <i>Nosema</i> spp.'nin spor yükünde yetişkinlerde azalma, **2 yıllık bir dönemde <i>Varroa destructor</i> enfestasyonunda ~%50-80 azalma	-	Tejerina v.d. 2020
<i>Lactobacillus plantarum</i>	* <i>Paenibacillus larvae</i> BMR43-81 (ERIC alt tipi I) neden olduğu aktif Amerikan yavru çürüklüğü salgını sırasında larvalarda patojen yükünde yaklaşık %90 azalma **4 haftalık takviyeden sonra yumurta veriminde yaklaşık %46, polen %53 ve bal üretiminde %59 artma	<i>P. larvae</i> vegetatif formuna karşı doğrudan sitotoksiste Çekirdek besin destekleyici türlerin laktat aracılı çapraz beslenmesi	Daisley v.d. 2020a Alberoni v.d. 2018
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	* <i>Paenibacillus larvae</i> BMR43-81 (ERIC alt tipi I) neden olduğu aktif Amerikan yavru çürüklüğü salgını sırasında larvalarda patojen yükünde yaklaşık ~%90 azalma	<i>P. larvae</i> vegetatif formuna karşı doğrudan sitotoksiste	Dailey v.d. 2020a
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	* <i>P. larvae</i> BMR43-81 ile oral enfeksiyonu takiben larvalarda hayatta kalma oranında artma, artan ve patojen yükünde azalma ** 8 günlük deneysel enfeksiyondan sonra <i>Nosema ceranae</i> spor sayısında ~%90 oranında azalma	Konağın anti- <i>P.larvae</i> AMP defansin-yükselmesi Bağırsak pH'sini düşürerek spor gelişiminin engellenmesi	Dailey v.d. 2020a Baffoni v.d. 2016
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	*4 haftalık takviyeden sonra yaklaşık	Çekirdek besin destekleyici türlerin laktat aracılı çapraz beslenmesi	Alberoni v.d. 2018

	yumurta veriminde %46, polen % 53 ve bal üretiminde %59 artma *Diyet kaynaklı hemiselülozun parçalanması yoluyla yetişkin bağırsağında arabinoz, galaktoz ve ksiloz üretimi	Genomda geniş glikozit hidrolaz repertuarı	Zheng v.d. 2019
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	4 haftalık takviyeden sonra yaklaşık yumurta veriminde %46, polen %53 ve bal üretiminde %59 artma	Çekirdek besin destekleyici türlerin laktat aracılı çapraz beslenmesi	Alberoni v.d. 2018
<i>Bifidobacterium indicium</i>	4 haftalık takviyeden sonra yaklaşık yumurta veriminde %46, polen %53 ve bal üretiminde %59 artma	Çekirdek besin destekleyici türlerin laktat aracılı çapraz beslenmesi	Alberoni v.d. 2018
<i>Parasaccharibacter apium</i>	10.000 spor inokulasyonunu erişkin <i>Nosema</i> spp.'nin temizlenmesinde ~%55 artma	Doğmasal bağışıklığın hazırlanması ve antifungal organik asitlerin üretimi	Corby-Harris v.d.2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Bal üretiminde ~%17 artma, 8 ay boyunca nosemosis ve varroosis insidansının düşük seviyede sürmesi	-	Sabaté v.d. 2012
<i>Pediococcus acidilactici</i>	* <i>N. ceranae</i> infeksiyonu sırasında yetişkinlerde spor yükünde ~%80 azalma ve canlı kalma oranında ~%35 artma ** Bir tiaklopid-boskalid karışımına letal düzeyde maruz kalan yetişkinlerin tamamına yakınının sağ kalması	Konakçı aracılı AMP üretimi ve infeksiyondan kaynaklanan beslenme stresinin azaltılması Oksidatif strese tepki genleri katalaz ve glutasyon peroksidaz like-2 modülasyonu	Peghaire v.d. 2020
<i>Gilliamella apicola</i>	Yetişkinlerde diyet kaynaklı pektinin bağırsakta parçalanması yoluyla D-galacturonik asit üretimi	Fonksiyonel polisakkarit lyase ve karbonhidrat esteraz kodlayan genler	Zheng v.d. 2019
<i>Snodgrassella alvi</i>	* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ile septik infeksiyonu takiben yetişkin sağkalım oranı artması * Deforme kanat virüsüne karşı yetişkin sağkalım oranının ~%15 artması ve 10 gün sonra <i>V. destructor</i> yükünün ~%25 azalması	Konakçı aracılı AMP üretimi Ökaryotik RNAi bağışıklık tepkisini indükleyebilen çift sarmallı (ds) RNA üretimini sağlayan genetik dönüşüm	Leonard v.d. 2020

Tablo düzenlenirken Daisley v.d. 2020b yararlanılmıştır.

DERLEME / REVIEW

Bal arılarında en fazla kullanılan probiyotik mikroorganizmalar ve kullanım alanları *Lactobacillus* (Laktik asit bakterileri-LAB):

Bağırsak mikrobiyal ekosisteminin korunmasında bal arısı gastrointestinal sistemin doğal sakinleri olan laktik asit bakterilerinin (LAB) önemli bir rolü vardır (Forsgren v.d. 2010, Endo ve Salminen 2013, Pachla v.d. 2018).

Bal arısı LAB'ları, besin sindiriminde, arıların immun sisteminin yüksek derecede uyarılmasında, patojenlerin ortadan kaldırılmasında ve bal arısı bağırsağındaki mikroflora homeostazının sürdürülmesinde oldukça önemlidir. Laktik asit bakterilerinin, patojenik mikroorganizmaları ortadan kaldıran antimikrobiyal maddeler (antimikrobiyal peptid-AMP) ürettiği bilinmektedir (Evans ve Lopez 2004, Crotti, v.d. 2013, Asama v.d. 2015, Raymann ve Moran 2018). Bal arılarındaki LAB'ların meydana getirdiği AMP'ler; helveticin J, bacteriolysin, alivaricin, enterolysin A ve thermophilin A'dir. Bu AMP'ler bağışıklık sisteminin çok önemli parçalarıdır ve aynı zamanda günümüzdeki antibiyotik tedavisine veya mikrobiyal infeksiyonun önlenmesine umut verici bir alternatiftir (Ilyasov v.d. 2012, Danihlik v.d. 2016). Ayrıca laktozu ve diğer şekerleri fermente ederler, son ürün olarak laktik ve asetik asitler üreterek gastrointestinal sistemi asitleştirerek, bazı zararlı bakterilerin büyümesini engellerler (Forsgren v.d. 2010, Carina Audisio v.d. 2011, Pachla v.d. 2017, Pachla v.d. 2018).

Bal arılarının sindirim kanalındaki LAB kolonizasyonu, hastalıkların önlenmesinde önem taşımaktadır (Vásquez ve Olofsson 2009, Raymann ve Moran 2018). Sağlıklı ve konakçıya uygun bir bağırsak mikrobiyotası şekillendirmek ve arı sağlığını geliştirmek için, bal arısı kolonilerine verilecek polen takviyesinin gastrointestinal sistemde kolonize olan, arılar üzerinde yararlı etkileri bulunan ve bal arısına özgü laktik asit bakterileri ile yapılması önerilmektedir (Kazimierczak-Baryczko ve Szymaś 2006, Szymas v.d. 2012, Patruica v.d. 2013). Şeker şurubu takviyesi olarak kullanılan laktik asit bakterileri, patojenleri sadece laktik ve asetik asitlerin üretilmesi ve bağışıklık yanıtının modülasyonu ile değil, aynı zamanda hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerin senteziyle de yok edebilmektedir (Butler v.d. 2013, Olofsson v.d. 2016, Janashia ve Alaux 2016, Pachla v.d. 2018).

Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanıldığı bal arısı araştırmalarında 30 tür *Lactobacillus* kullanılmıştır. Bu bakterilerin *P. larvae* (AYÇ),

Melissococcus plutonius (Avrupa yavru çürüklüğü-AvYÇ), *Nosema apis* (*N. apis*) ve *Nosema cerenae* (*N. cerenae*) vb. bal arısı patojenleri ile oluşturduğu infeksiyonlarda değişen oranlarda korunma, tedavi, hayatta kalma oranı, patojen yükü azalması gibi birçok yararı olduğu belirlenmiştir (Alberoni v.d. 2018, Ramos v.d. 2019). *A. mellifera*'dan izole edilen *Lactobacillus* türleri (*L. fructivorans*, *L. amylovorus*, *L. gasseri*, *L. kunkeei*) arasında *P. larvae* üzerine en iyi antimikrobiyal etkiyi *L. gasseri* ve *L. amylovorus*, en düşük etkiyi ise *L. fructivorans* göstermiştir (Kacaniova v.d. 2018). LAB'lar, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. ve *Proteus* spp., gibi çeşitli patojenlere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel bileşikler üretebilirler. LAB'lar aynı zamanda antioksidan etki de göstermektedir (Keerthi v.d. 2013, Sandi ve Salasia 2016). Tablo 2'de bal arılarından izole edilen LAB türleri ve invitro çalışmalarda etkili olduğu saptanan patojen türleri özetlenmiştir.

Yapılan bir araştırmada ise, çevre dostu *L. kunkeei* HD1 preparatlarının, probiyotik özellikleri sayesinde arıcılık sektöründe arı bağışıklık sistemini desteklemek ve antibiyotik tedavisine başvurmadan dirençli arılar üretmek için kullanılabileceği önerilmiştir. HD1'in *M. plutonius*'a karşı inhibe edici aktivitesi gelecekteki araştırmalar için önemli bulunmuştur (Ugras 2017).

Bir araştırmada kullanılan *L. kunkeei*'nin 9 suşunun biyofilm oluşturma yeteneği, yüksek oto-agregasyon ve hidrofobiklik gibi probiyotik olarak kullanım adaylığı için gerekli ön koşulları sağladığı ve kireç hastalığının etkeni *Ascosphaera apis*'i (*A. apis*) inhibe ettiği bildirilmiştir. LAB antifungal aktivitesi, mantar yüzey genişlemesinin sınırlandırılmasını, sporülasyonun kontrolünü, hif biyokütlesinin azalmasını ve metabolik biyosentetaz aktivitesinin bastırılmasını içerir (Schnürer ve Magnusson 2005, Dalié v.d. 2010). Ayrıca, *L. kunkeei* suşları, mikrobiyal disbiyoz durumunda bal arısı bağırsaklarındaki simbiyotik toplulukları eski haline getirmek veya güçlendirmek için şeker şurupları ile probiyotiklerin birlikte kullanımında önemli bir özellik olan yüksek ozmotik tolerans gösterdiği bildirilmiştir (Iorizzo v.d. 2020).

Ayrıca insektlerde organofosfat toksisitesi ve neonicotinoid kaynaklı doğal immün sistemin

baskılandığı durumlarda probiyotik olarak uygulanan bazı *Lactobacillus* suşlarının bu durumu azalttığı tespit edilmiştir (Chmiel v.d. 2019, Daisley v.d. 2017). *Lactobacillus* suşlarının polen ile birlikte verilmesinin özellikle de AYÇ salgınlarında, sükröz

solüsyonu ile verilmesinden daha etkili olduğu görülmüştür (Daisley v.d. 2017, Stephan v.d. 2019).

Tablo 2: Bal arılarından izole edilen LAB türlerinin *in vitro* çalışmalarda antimikrobiyal etkili olduğu mikroorganizmalar
Table 2: Microorganisms with antimicrobial effect of LAB species isolated from honey bees in invitro studies

LAB Türleri	Etkili olduğu mikroorganizma türleri	Kaynaklar
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Audisio v.d. 2011
<i>Enterococcus faecium</i> <i>L. kunkeei</i> Fhon2, <i>L. kunkeei</i> <i>Yubipro</i> , <i>L. kunkeei</i> Lahm	<i>L. monocytogenes</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , MRSA	Audisio vd. 2011 Sandi ve Salasia 2016
<i>Lactobacillus</i> spp.	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> (VRE)	Olofsson v.d. 2016
<i>L. apis</i> sp. nov	<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i>	Killer v.d. 2014
<i>L. gasseri</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. fructivorans</i> <i>F. fructosus</i>	<i>Paenibacillus</i> spp. Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kacaniova 2018 Salman ve Saleh 2018

Tablo hazırlanırken Nurdjannah v.d. 2019 yararlanılmıştır.

Bütün bu veriler, terapötik ve antibakteriyel aktivite sergileyen bal arısı LAB simbiyotlarının infeksiyon hastalıklarıyla mücadelede antibiyotiklere doğal ve alternatif bir olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

Bifidobacterium:

Bal arılarında *Bifidobacterium* takviyesi ile ilgili araştırmaların çoğu, yavru üretimi uyarımına, koloni üretimini arttırmaya, nosemosis ve kireç hastalığı gibi mantar hastalıklarının tedavisinde kullanımlarına odaklanmıştır (Pătruică ve Mot 2012, Baffoni v.d. 2016, Alberoni v.d. 2018). Laktik asit

DERLEME / REVIEW

üreten *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri birlikte kullanıldığında *Bifidobacterium* türlerinin etkileri ayrılamayabilir. Her iki mikroorganizmanın kireç hastalığının etkeni *A. apis*'i inhibe etme özelliği incelendiğinde *Lactobacillus* türlerinin tümünün *in vitro* olarak inhibe ettiği, *Bifidobacterium* suşlarının ise hiçbirinin etkili olmadığı belirlenmiştir (Moradi ve Ownagh 2019). *Bifidobacterium*'un yoğun olarak bulunduğu kolonilerde *N. ceranae*'de yoğun olarak bulunması *Bifidobacterium*'un probiyotik olarak kullanılmasının güvenilirliği hakkında şüpheler oluşturmaktadır (Zhang v.d. 2019). Bu durumun öncelikle, dışkılamayı geciktirebilen ve bağırsak ve kovanda *N. ceranae* sporlarının artmasına yol açabilen *Bifidobacterium*'un besleyici-teşvik edici etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Milani v.d. 2015).

Proteobacteriae:

Proteobacteria'nın bal arılarında bir 'probiyotik' olarak mevcut kullanımı, bu büyük gram-negatif bakteri grubunun, hayvanlarda bir takımı enfeksiyon, metabolik bozukluk ve inflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır. Bu problemler dikkate alındığından bal arılarında probiyotik olarak kullanımı erken olabilir (Rizzatti v.d. 2017). Az miktarda *Proteobacteria* bulunması şüphesiz bal arılarına, suşa özgü niche olarak avantajı sunar.

Çekirdek Betaproteobacter grubundan olan biyofilm üreten *Snodgrassella alvi* (*S. alvi*) kullanarak *Lotmaria passim* (*L. passim*) protozoan kolonizasyonunu engelleme girişimleri başarısız olmuş ve beklenmedik bir şekilde, *S. alvi* takviyesi verilen bireylerin, tedavi edilmeyen bireylere göre daha yüksek oranda protozoan yüklerine, yüksek stres belirteçlerine sahip olduğu ve detoksifikasyon anahtar genlerinin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Schwarz v.d. 2016). Yine arı paraziti olan *Crithidia* spp. de *L. passim*'de olduğu gibi *Gammaproteobacteria* yoğunluğunda muhtemelen protozoon etkenleri tarafından bu bakterilerin besin olarak tüketilmesi sonucu protozoon artışına sebep olmaktadır (Rønn v.d. 2002, Koch ve Schmid-Hempel 2011). Ancak paraziter olmayan durumlarda *S. alvi* etkili bir probiyotik olarak belirlenmiştir. *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Serratia marcescens* (*S.marcescens*) tarafından meydana getirilen fırsatçı enfeksiyonlarda doğal bağışıklığı ve enfeksiyonda hayatta kalmayı arttırdığı belirlenmiştir (Kwong v.d. 2017a, Raymann v.d. 2017). Genetik olarak düzenlenen

S. alvi'nin deforme kanat virüsünü baskıladığı, *V. destructor*'un yaşam süresini kısalttığı belirlenmiştir (Leonard v.d. 2020). Herhangi bir genetik düzenleme yapılmamış *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* ve *Lactobacillus salivarius* suşları kullanılarak arı kolonisinin *V. destructor* akar yüklerinde 2 yıllık bir dönemde %50-80 azalma göstermesi probiyotiklerin arıcılık alanında kullanımı konusunda oldukça umut vericidir (Sabaté v.d. 2012, Alquisira-Ramírez v.d. 2014, Tejerina v.d. 2020).

Bacillus spp.:

Potansiyel probiyotik bakteriler olarak *Bacillus* spp. ile yapılan çalışmalar daha sınırlıdır. Bu tür bakteriler, fizyolojisine bağlı olarak, bal arılarında ve çevrelerinde yaygın olarak bulunur (Corby-Harris v.d. 2015). Bu bakteri türünün probiyotik olarak kullanımı konusunda yapılan bir araştırmada hem baldan hem de bal arısı bağırsağından izole edilen *Bacillus subtilis*'in *in vitro* olarak *P. larvae* ve *A. apis*'e karşı antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Sabaté v.d. 2009). Başka bir araştırmada ise *B. subtilis* subsp. *subtilis* Mori'nin arı kolonileri üzerinde kuluçka oranında artış, kontrol kovanları ile karşılaştırıldığında daha fazla bal üretimi ve *Varroa* ve *Nosema* oranlarının azalması sonucu daha sağlıklı bir kovan gibi olumlu etkileri tespit edilmiştir (Sabaté v.d. 2012).

Bacillus cinsindeki bakterilerin çoğu, *B. cereus* ve *B. anthracis* hariç, memeliler için patojen değildir. *Bacillus* türleri antimikrobiyal bileşikler olarak da bilinen iturin, surfactin, fengycins, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler (BLIS'ler) gibi çok çeşitli fonksiyonel ikincil metabolit benzeri antibiyotikler, biyoinsesitler, enzimler ve lipopeptitler üretir. Bu biyolojik ve ticari olarak önemli özellikler, onları probiyotik bakteri olarak kullanım için uygun bir aday yapar (Desai ve Banat 1997, Sabaté v.d. 2009).

Bal arılarının enfeksiyonlarında kullanılan probiyotikler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin bal arılarının immun sistemini güçlü bir şekilde aktive ettiği, patojenleri inhibe eden antimikrobiyal bileşikler ürettiği, patojen bakterilerin kolonizasyonunu engellediği bildirilmiştir (Evans ve Lopez 2004, Forsgren v.d. 2010, Pătruică ve Mot 2012, Sabaté v.d. 2012, Maggi v.d. 2013).

Kolonideki bal arısı yoğunluğunun yüksek olması, koloni üyeleri arasında *trophallaxis* ve yavruların bakıcı arılar tarafından beslenmesi, kolonideki

bireyler arasında hastalıkların yayılmasında önem taşır (Chen v.d. 2006. Forfert v.d. 2015). Bu nedenlerden dolayı, bal arılarında hastalıkların önlenmesinde ve bunlarla mücadelede antibiyotiklere alternatif olarak probiyotik kullanımı özel bir önem taşımaktadır. Probiyotikler, sağlığı olumlu yönde etkileyen ve konakçılarının yaşam süresinin uzamasını destekleyen canlı, güvenli mikroorganizmalar olarak tanımlanır (Fuller 1989, FAO/WHO 2002). Bal arılarında besin takviyesi ile verilen probiyotik bakterilerin arı gastrointestinal sisteminde canlı kalabilme yetenekleri önemli bir

özelliğdir (Kumar ve Kumar 2015, Zuo v.d. 2016, Gaggia v.d. 2018). Probiyotik bakterilerin genellikle probiyotik uygulamasının kesilmesinden sonraki birkaç hafta içinde bağırsak kanalından kaybolduğu ve bağırsakta kalıcı kolonizasyonun nadiren meydana geldiği belirlenmiştir (Alander v.d. 1999, Duncan 2013). Gastrointestinal kanalda patojenlere karşı antagonist etki oluşturmadan önce probiyotiklerin üretim ve depolama sırasında da canlılığını sürdürebilmesi oldukça önemlidir (Iorizzo v.d. 2020). Bu özellikler de dikkate alınarak en uygun ve en güvenilir probiyotikler seçilmelidir.

Tablo 3: Bal arılarındaki bazı infeksiyonlarının tedavisi için kullanılan probiyotikler

Table1 3: Probiotics used for the treatment of some honey bee infections

Bal arısı hastalıkları	Kullanılan probiyotik mikroorganizmalar	Probiyotiklerin elde edildiği yerler	Probiyotiğin hastalıktaki etkileri	Kaynaklar
<i>P. larvae</i> - AYÇ	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. mellis</i> , <i>L. kimbladii</i> , <i>L. kullabergensis</i> , <i>L. helsinborgensis</i> , <i>L. melliventris</i> , <i>L. apis</i> , <i>L. mellifer</i> , <i>B. asteroides</i> , <i>B. coryneforme</i> <i>B. thuringiensis</i> HD110, <i>B. laterosporus</i>	Bal Bal arısı bağırsağı	Larva ölüm oranında azalma Larva ölüm oranında azalma	Forsgren v.d. 2010 Hamdi ve Daffonchio 2011
<i>M. plutonius</i> - AvYÇ	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. mellis</i> , <i>L. kimbladii</i> , <i>L. kullabergensis</i> , <i>L. helsinborgensis</i> , <i>L. melliventris</i> , <i>L. apis</i> , <i>L. mellifer</i> , <i>B. asteroides</i> , <i>B. coryneforme</i>	Bal	Larva ölüm oranında azalma	Vásquez v.d. 2012
<i>N. ceranae</i>	<i>L. kunkeei</i> Dan39, <i>L. plantarum</i> Dan91 <i>L. johnsonii</i> Dan92, <i>B. asteroides</i> DSM 20431, <i>B. coryneforme</i> C155, <i>B. indicum</i> C449.	Bal arısı bağırsağı	Tespit edilen spor miktarında azalma	Baffoni v.d. 2016
<i>Nosema</i> spp.	<i>P. apium</i> C6 <i>L. johnsonii</i> CRL1647 <i>Bacillus subtilis</i> Mori2 spoları	2. evre larva Bal arısı bağırsağı Bal	Tespit edilen spor miktarında azalma	Corby-Harris v.d. 2014 Audisio v.d. 2015 Sabaté v.d. 2012

Tablo hazırlanırken Alberoni v.d. 2016'dan yararlanılmıştır.

DERLEME / REVIEW

Birçok araştırma, bal arılarına probiyotiklerin verilmesinin arı sağlığını tehdit eden birçok durumda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. *Lactobacillus* suşları, iyi güvenlik profilleri, patojenlere karşı güçlü koruma, pestisit azaltıcı özellikleri ve beslenmeyi teşvik edici özellikleri nedeniyle en yararlı probiyotik olarak görülmektedir (Alander v.d.1999, Audisio v.d. 2011, Gaggia v.d. 2018). *Lactobacillus*'un immünostimülatör suşları, sağlıklı bir mikrobiyotayı şekillendirmede kritik roller oynadığı bilinen bazı konakçı antimikrobiyal peptitlerini yüksek derecede regüle ederek disbiyotik mikrobiyota fenotiplerini de yok edebilir. Bal arılarında gerçek anlamda steril bir ortam oluşturamama, probiyotik araştırmaları için deneysel bir zorluk teşkil etmektedir. Ayrıca, arılarda tek tür ve miks probiyotik takviyenin etkisini değerlendirirken, tür düzeyindeki işlevlerin aksine tür düzeyine ve kolonizasyon potansiyeline dikkat edilerek uygulanmalıdır (Daisley v.d. 2020b).

Arı sağlığı için doğru probiyotiklerin seçimi özellikle bağırsak mikrobiyota bileşimini modüle edilmesinin yanı sıra bağışıklık tepkisi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Bal arılarında önemli ekonomik kayıplara neden olan birçok enfeksiyondan korunma ve tedavide doğru probiyotiğin uygun yolla ve uygun dozlarda verilmesi oldukça yararlıdır. Bu probiyotiklerin bal arılarından izole edilen türler olması da korunma ve tedaviyi kolaylaştırarak, bağırsak mikrobiyomunda dengeyi bozmayacak ve kolonizasyonu kolaylaştırılacaktır. Ayrıca probiyotiklerin polen, arı ekmeği ve şerbet gibi arı tüketimine uygun gıdalarla verilmesi başarıyı arttıracaktır.

Mali kaynak bulunmamaktadır.

Yazarlar arası çıkar çatışması yoktur.

Etik izin belgesi gerekli değildir.

KAYNAKLAR

Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., Von Wright, A., 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 351–354. <https://doi.org/10.1128/aem.65.1.351-354.1999>.

- Alberoni, D., Baffoni, L., Gaggia, F., Ryan, PM., Murphy, K., Ross, PR., Stanton, C., Di, Gioia D. 2018. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. *Benef Microbes.* 9(2):269-278. doi:10.3920/BM2017.0061.
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., Di Gioia, D. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(22):9469-9482. doi: 10.1007/s00253-016-7870-4.
- Alquisira-Ramírez, EV., Paredes-Gonzalez, JR., Hernández-Velázquez, VM. et al. 2014. In vitro susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie* 45: 707–718. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0288-z>.
- Asama, T., Arima, TH., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., Tatefuji, T., Hashimoto, K. 2015. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J Appl Microbiol.* 119(3):818-26. doi: 10.1111/jam.12889.
- Audisio, MC., Benítez-Ahrendts, MR. 2011. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Benef Microbes.* 2(1):29-34. doi: 10.3920/BM2010.0024.
- Audisio, MC., Sabaté, DC., Benítez-Ahrendts, MR. 2015. Effect of *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. *Benef Microbes.* 25:1–10. doi:10.3920/BM2014.0155.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B., Di, Gioia D. 2016. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Benef Microbes.* 7(1):45-51. doi: 10.3920/BM2015.0085.
- Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, TC., Karlsson, C., Malmström, J., Vásquez, A. 2013. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiol.* 22:13:235. doi: 10.1186/1471-2180-13-235.

- Carina, Audisio M., Torres, MJ., Sabaté, DC., Ibarguren, C., Apella, MC. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res.* 166(1):1-13. doi: 10.1016/j.micres.2010.01.003.
- Celiberto, LS., Bedani, R., Rossi, EA., Cavallini, DC. 2017. Probiotics: The scientific evidence in the context of inflammatory bowel disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(9):1759-1768. doi: 10.1080/10408398.2014.941457.
- Chen, J., Wang, Q., Liu, CM., Gong, J. 2017. Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 157(6):1228-1238. doi: 10.1080/10408398.2014.977991.
- Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92: 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.010>.
- Chmiel, JA., Daisley, BA., Burton, JP., Reid, G. 2019. Deleterious effects of neonicotinoid Pesticides on *Drosophila melanogaster* immune pathways. *mBio* 10:e01395-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01395-19>.
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, KE. 2015. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE* 9(4): e95056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056>.
- Corby-Harris, V., Snyder, LA., Schwan, MR., Maes, P., McFrederick, QS., Anderson, KE. 2014. Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 80:7460–7472. doi:10.1128/AEM.02043-14.
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, CAD., Naldo, R., Mott, B., Anderson, KE. 2016. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to Nosema. *J Econ Entomol.* 109(2):537-43. doi: 10.1093/jee/tow012.
- Crotti, E., Sansonno, L., Prosdocimi, EM., Vacchini, V., Hamdi, C., Cherif, A., Gonella, E., Marzorati, M., Balloi, A. 2013. Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *N Biotechnol.* 30(6):716-722. doi: 10.1016/j.nbt.2013.05.004.
- Daisley, BA., Trinder, M., McDowell, TW., Welle, H., Dube, JS., Ali, SN., Leong, HS., Sumarah, MW., Reid, G. 2017. Neonicotinoid-induced pathogen susceptibility is mitigated by *Lactobacillus plantarum* immune stimulation in a *Drosophila melanogaster* model. *Sci Rep.* 7(1):2703. doi: 10.1038/s41598-017-02806-w.
- Daisley, BA., Pitek, AP., Chmiel, JA., Al, KF., Chernysova, AM., Faragalla, KM., Burton, JP., Thompson, GJ., Reid, G. 2020a. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *ISME J* 14:476–491. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>.
- Daisley, BA., Chmiel, JA., Pitek, AP., Thompson, GJ., Reid, G. 2020b. Missing Microbes in Bees: How Systematic Depletion of Key Symbionts Erodes Immunity. *Trends Microbiol.* 28(12):1010-1021. doi: 10.1016/j.tim.2020.06.006.
- Dalié, DKD., Deschamps, AM, Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria–potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* 21:370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>.
- Danihlík, J., Aronstein, K., Petřivalský, M. 2016. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *J Apic. Res.* doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>.
- Desai, JD., Banat, IM. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(1):47-64.
- Díaz-Vergara, L., Pereyra, CM., Montenegro, M., Pena, GA., Aminahuel, CA., Cavaglieri, LR. 2017. Encapsulated whey-native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 34(5):750-759. doi: 10.1080/19440049.2017.1290830.
- Duncan, B., 2013. Prebiotics, Probiotics, and Health Promotion: An Overview, in: Watson, R., Preedy, V. (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease.* Elsevier Inc., pp. 449–463.

DERLEME / REVIEW

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397154-8.00005-1>.
- Endo, A., Salminen, S. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(6):444-448. doi: 10.1016/j.syapm.2013.06.002.
- Evans, JD., Lopez, DL. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 97(3):752-6. doi: 10.1603/0022-0493(2004)097[0752:bpiair]2.0.co;2.
- FAO/WHO, 2002. Food and Agriculture Organization: FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO Food Nutr. Pap. 85 11.
- Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., Moritz, R.F.A. 2015. Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. *PLoS One.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140337>.
- Forsgren, E., Olofsson, TC., Váasquez, A., Fries I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41, 99–108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Alberoni, D. 2018. Probiotics for Honeybees' Health. In: Di Gioia, D. Biavati, B. (eds) Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4_9.
- Genersch, E. 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* 103 Suppl 1: S10-9. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.015.
- Gourbeyre, P., Denery, S., Bodinier, M. 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol.* 89(5):685-95. doi: 10.1189/jlb.1109753.
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., Ricci, I., Boudabous, A., Borin, S., Manino, A., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Cherif, A. 2011. Gut microbiome dysbiosis and honey bee health. *J. Appl. Entomol.* 135: 524–533. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01609.x>.
- Hamdi, C., Daffonchio, D. 2011. Methods for the prevention and control of pathogenic infections in bees and relative composition. Patent Application WO/2011/138310.
- Hossain, Ml., Sadekuzzaman, M., Ha, SD. 2017. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Res Int.* 100: 63-73. doi:10.1016/j.foodres.2017.07.077.
- Ilyasov, RA., Gaifullina, LR., Saltykova, ES., Poskryakov, AV., Nikolenko, AG. 2012. Review of The expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. *J Apic Sci.* 56(1): 115-123. doi: <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0013-y>.
- Iorizzo, M, Lombardi, SJ, Ganassi, S, Testa, B, Ianiro, M, Letizia, F, Succi, M, Tremonte, P, Vergalito, F, Cozzolino, A, Sorrentino, E, Coppola, R, Petrarca, S, Mancini, M, Cristofaro, A. 2020. Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. *Antibiotics (Basel).* 9(5):262. doi: 10.3390/antibiotics9050262.
- Janashia, I., Alaux, CC. 2016. Specific immune stimulation by endogenous bacteria in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 109: 1474–1477. <https://doi.org/10.1093/jee/tow065>.
- Kacaniova, M, Gasper, J, Terentjeva, M, Kunova, S, Kluz, M, Puchalski, C. 2018. Antibacterial activity of bees gut *Lactobacilli* against *Paenibacillus larvae* in vitro. *Advanced research in life sciences.* 2 (1): 7-10. doi: <https://doi.org/10.1515/arls-2018-0020>.
- Kazimierczak-Baryczko, M., Szymaś, B. 2006. Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.) through implementation of probiotic preparations. *J. Apic. Sci.* 50: 15–23.
- Keerthi, TR., Jacob, AA., Honey C. 2013. Honey bee gut flora as a source of LAB (Lactic Acid Bacteria) with probiotic capabilities. *J. Food Technol Photon* 105: 126-134.
- Killer, J., Dubna, S., Sedlacek, I., Svec, P. 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach

- of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 152–157. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053033-0>.
- Koch, H., Schmid-Hempel, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(48):19288-92. doi: [10.1073/pnas.1110474108](https://doi.org/10.1073/pnas.1110474108).
- Kumar, A., Kumar, D., 2015. Characterization of Lactobacillus isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*. 33: 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.004>.
- Kwong, WK., Mancenido, AL., Moran, NA. 2017a. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R Soc Open Sci*. 4(2):170003. doi: [10.1098/rsos.170003](https://doi.org/10.1098/rsos.170003).
- Kwong, WK., Medina, LA., Koch, H., Sing, KW., Soh, EJY., Ascher, JS., Jaffé, R., Moran NA. 2017b. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci Adv*. 3(3):e1600513. doi: [10.1126/sciadv.1600513](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600513).
- Leonard, SP., Powell, JE., Perutka, J., Geng, P., Heckmann, LC., Horak, RD., Davies, BW., Ellington, AD., Barrick, JE., Moran, NA. 2020. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science*. 367(6477):573-576. doi: [10.1126/science.aax9039](https://doi.org/10.1126/science.aax9039).
- Machova, M., Rada, V., Huk, J., Smekal, F. 1997. Entwicklung der bienenprobiotik. *Apiacta* 32: 99–111.
- Maggi, M., Negri, P., Plischuk, S., Szawarski, N., De Piano, F., De Feudis, L., Eguaras, M. Audisio, C. 2013. Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and fumagillin efficiency. *Vet Microbiol*. 167:474–483. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.030>.
- Martinson, VG., Moy, J., Moran, NA. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol*. 78(8):2830-40. doi: [10.1128/AEM.07810-11](https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11).
- Maruščáková, IC., Schusterová, P., Bielik, B., Toporčák, J., Bíliková, K., Mudroňová, D. 2020. Effect of Application of Probiotic Pollen Suspension on Immune Response and Gut Microbiota of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Probiotics Antimicrob Proteins*. 12(3):929-936. doi: [10.1007/s12602-019-09626-6](https://doi.org/10.1007/s12602-019-09626-6).
- Milani, C., Turrioni, F., Duranti, S., Lugli, GA., Mancabelli, L., Ferrario, C., van Sinderen, D., Ventura, M. 2015. Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. *Appl Environ Microbiol*. 82(4):980-991. doi: [10.1128/AEM.03500-15](https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15).
- Moradi, M., Ownagh, A. 2019. Antifungal effects of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the *Ascospharea apis* causative agent of honey bee Chalkbrood disease. *J. Vet. Res*. 74: 273–282.
- Moran, NA. Genomics of the honey bee microbiome. 2015. *Curr Opin Insect Sci*. 10:22-28. doi: [10.1016/j.cois.2015.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.003).
- Moran, NA., Hansen, AK., Powell, JE., Sabree, ZL. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One*. 7(4): e36393. doi: [10.1371/journal.pone.0036393](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393).
- Näpflin, K., Schmid-Hempel, P. 2016. Immune response and gut microbial community structure in bumblebees after microbiota transplants. *Proc Biol Sci*. 283(1831):20160312. doi: [10.1098/rspb.2016.0312](https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0312).
- Nurdjannah, JN., Salaki CL., Rumokoy, LJM., Tallei, TE. 2019. Lactic Acid Bacteria from Honey Bees Digestive Tract and Their Potential as Probiotics. *Adv Biological Sciences Research, volume 8* International Conference and the 10th Congress of the Entomological Society of Indonesia (ICCESI 2019). doi: <https://doi.org/10.2991/absr.k.200513.041>.
- Oliveira, D., Vidal, L., Ares, G., Walter, EHM., Rosenthal, A., Deliza, RS. 2017. Sensory microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. *LWT Food Sci. Technol*. 79: 234–241., doi: [10.1016/j.lwt.2017.01.020](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.020).
- Olofsson, TC., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A. 2016. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees-an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int Wound J*. 13(5):668-679. doi: [10.1111/iwj.12345](https://doi.org/10.1111/iwj.12345).

DERLEME / REVIEW

- Pachla, A., Ptaszyńska, AA., Wicha, M., Olen'ska, E., Małek, W. 2017. Fascinating fructophilic lactic acid bacteria associated with various fructose-rich niches. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. C – Biol.* 72, 41.
- Pachla, A., Wicha, M., Ptaszyńska, AA., Borsuk, G., Trokenheim, Ł., Małek, W. 2018. The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of *Apis mellifera* L. derived from a Polish apiary. *J. Appl. Genet.* 59, 503–514. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0467-0>.
- Pătruică, S., Dumitrescu, G., Popescu, R., Filimon, NM. 2013. The effect of prebiotic and probiotic products used in feed to stimulate the bee colony (*Apis mellifera*) on intestines of working bees. *J. Food. Agric. Environ.* 11: 2461–2464.
- Pătruică, S., Mot, D. 2012. The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bull Entomol Res.* 102(6):619-23. doi: 10.1017/S0007485312000144.Z.
- Patterson, JA., Burkholder, KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. 2003. *Poult Sci.* 82(4):627-631. doi: 10.1093/ps/82.4.627.
- Peghaire, E., Moné, A., Delbac, F., Debroas, D., Chaucheyras-Durand F., El Alaoui HA. 2020. *Pediococcus* strain to rescue honeybees by decreasing *Nosema ceranae* and pesticide-induced adverse effects. *Pestic Biochem Physiol.* 163:138-146. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.006.
- Ptaszyńska, AA., Borsuk G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., Małek W. 2016. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitol Res.* 115(1):397-406. doi: 10.1007/s00436-015-4761-z.
- Ramos, OY., Basualdo, M., Libonatti, C., Vega, MF. 2020. Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *J Appl Microbiol.* 128(5):1248-1260. doi: 10.1111/jam.14469.
- Raymann, K., Bobay LM., Moran NA. 2018. Antibiotics reduce genetic diversity of core species in the honeybee gut microbiome. *Mol Ecol.* 27(8):2057-2066. doi: 10.1111/mec.14434.
- Raymann, K., Moran, NA. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr. Opin. Insect Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>.
- Raymann, K., Shaffer, Z., Moran, NA. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and Elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol.* Mar 14;15(3):e2001861. doi: 10.1371/journal.pbio.2001861.
- Rizzatti, G, Lopetuso, LR., Gibiino, G, Binda, C., Gasbarrini, A. 2017. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed. Res. Int.* 9: 1-7. doi: 10.1155/2017/9351507.
- Rønn, R., McCaig, AE., Griffiths, BS., Prosser, JI. 2002. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol.*68(12): 6094-6105. doi:10.1128/aem.68.12.6094-6105.2002.
- Sabaté, DC., Carrillo, L., Audisio, MC. 2009. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Res Microbiol.* 160(3):193-9. doi: 10.1016/j.resmic.2009.03.002.
- Sabaté, DC., Cruz, MS., Benítez-Ahrendts, MR., Audisio, MC. 2012. Beneficial Effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a Honey-Associated Strain, on Honeybee Colony Performance. *Probiotics Antimicrob Proteins.* Mar;4(1):39-46. doi: 10.1007/s12602-011-9089-0.
- Salman, SM., Saleh, G. 2018. Fructophilic lactic acid bacteria symbionts in honeybees – a key role to antimicrobial activities. *IOSR-JPBS.* 13 (1): 58-62. doi: <https://doi.org/10.9790/3008-1301055862>.
- Sandi, NA., Salasia, SIO. 2016. Alternative antibiotics source from symbiont of lactic acid bacteria inside stomach of honeybees (*Apis mellifera* and *Apis dorsata*) against multiresistant antibiotics pathogenic bacteria. *Res J. Microbiol.* 11 (2-3): 93-100. doi: <https://doi.org/10.3923/jm.2016.93.100>.
- Schnürer, J., Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid b as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* 16:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>.
- Schwarz, RS., Moran, NA., Evans, JD. 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility

- and microbiota composition in honey bee workers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(33):9345-50. doi: 10.1073/pnas.1606631113.
- Stephan, JG., Lamei, S., Pettis, JS., Riesbeck, K., de Miranda, JR., Forsgren, E. 2019. Honeybee-Specific Lactic Acid Bacterium Supplements Have No Effect on American Foulbrood-Infected Honeybee Colonies. *Appl Environ Microbiol*. 85(13):e00606-19. doi: 10.1128/AEM.00606-19.
- Szymaś, B., Łangowska, A., Kazimierczak-Baryczko, M. 2012. Obraz histologiczny jelita s'rodkowego pszczół (*Apis mellifera* L.) _zywionych namiastkami pyłku kwiatowego wzbogaconymi probiotykami. *J. Apic. Sci*. 56: 5–12. doi: <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0001-2>.
- Talpur, AD., Memon, AJ., Khan, MI., Ikhwanuddin, M., Danish, D., Abol-Munafi, AB. 2012. Inhibition of pathogens by lactic acid bacteria and application as water additive multi Isolates probiotics in early stages larviculture of *P. Pelagicus* (Linnaeus, 1758). *J. Anim. Plant. Sci*. 22: 54–64.
- Tejerina, MR., Benítez-Ahrendts, MR., Audisio, MC. 2020. *Lactobacillus salivarius* A3lob Reduces the Incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* spp. in Commercial Apiaries Located in the Northwest of Argentina. *Probiotics & Antimicro. Prot*. 12: 1360–1369. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09638-7>.
- Ugras, S. 2017. Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. *Türk. entomol. Derg*. 41 (3): 253-261 doi: <http://dx.doi.org/10.16970/ted.74860>.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, RJ., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, TC. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*. 7(3):e33188. doi:10.1371/journal.pone.0033188.
- Vásquez, A., Olofsson, TC. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res*. 48: 189–195. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>.
- Zhang, Y., Lu, X., Huang, S., Zhang, L., Su, S., Huang, WF. 2019. *Nosema ceranae* infection enhances *Bifidobacterium* spp. abundances in the honey bee hindgut. *Apidologie* 50: 353–362. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00644-5>.
- Zheng H., Perreau J., Powell JE., Zhang Z., Kwong WK., Tringe SG., Moran NA. 2019. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116(51):25909-25916. doi:10.1073/pnas.1916224116.
- Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., Zeng, Z., Khaskheli, G.B., Ma, H., Chen, S., 2016. Characterization and in vitro properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Ann. Microbiol*. 66:1027–1037. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1187-x>.

DERLEME / REVIEW

BEE POLLEN: ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY

Arı Poleni: Antioksidan Etkisi

**Hidayet TUTUN¹, Muhammet Mükerrerem KAYA^{1*}, Melike Sultan USLUER¹,
Hatice Ahu KAHRAMAN²**

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology Burdur, TURKEY, ORCID No.: 0000-0001-9512-8637, E-posta: hidayettutun@gmail.com, ORCID No.: 0000-0002-7781-5342, Yazışma Yazarı / Corresponding Author: : muhammetmukerreremkaya@gmail.com., ORCID No.: 0000-0002-9391-2839, E-posta: melikeusluer.15@gmail.com.

²Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology Burdur, TURKEY, ORCID No.: 0000-0001-6600-239X, E-posta: h.ahukahraman@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 13.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 05.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.896045

ABSTRACT

Bee pollen is a honey bee product containing over 250 biologically active substances such as phenolic bases, amino acids, carbohydrates, lipids, enzymes and coenzymes, vitamins and bio-elements. The composition of bee pollen may vary due to plant sources and its botanical and geographical origin. Bee pollen has been used since ancient times in traditional medicine for its therapeutic effects such as wound healing and hepatoprotective. Bee pollen has been reported to possess antioxidant and radical scavenging activities usually attributed to the presence of phenolic acids and flavonoids which are plant-derived polyphenolic substances. The antioxidant capacity of bee pollen depends on the content of total polyphenolic substances. This review presents an overview of chemical composition and antioxidant activity of bee pollen.

Keywords: Antioxidant activity, Bee pollen, Oxidative stress

ÖZET

Arı poleni fenolik bazlar, amino asitler, karbonhidratlar, lipitler, enzimler ve koenzimler, vitaminler ve biyo-elementler gibi 250'den fazla biyolojik olarak aktif madde içeren bir arı ürünüdür. Polen bileşimi polenin bitkisel kaynağına, botanik ve coğrafi kökenine göre değişebilir. Arı poleni, yara iyileştirici ve karaciğer koruyucu gibi etkileri nedeniyle geleneksel tıpta eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Arı polenin, genellikle bitkilerden elde edilen polifenolik maddeler olan fenolik asitlerin ve flavonoidlerin varlığına atfedilen antioksidan ve radikal temizleme aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir. Antioksidan kapasitesi, toplam polifenolik maddelerin içeriğine bağlıdır. Bu derleme arı polenin kimyasal bileşimi ve antioksidan aktivitesine genel bir bakış sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Arı poleni, Oksidatif stres

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Bal, arı sütü, propolis ve polen gibi arı ürünleri sağlık üzerine yararlı olduğu bilinen birçok biyoaktif maddeyi yapılarında bulundurmaktadırlar. Özellikle flavonoidler, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi maddeler sebebiyle antioksidan

aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Arı ürünleri içerisinde arı poleni, sahip olduğu biyoaktif bileşiklerin güçlü antioksidan etkilerinin yanı sıra pek çok terapötik etkilere de sahiptir. Bu derlemede arı polenin özellikleri ve antioksidan etkili bileşiklerinden bahsedilecektir.

Tartışma: Arı poleni, nektar, çiçek poleni ve arı salgısının bir karışımıdır. Yapılan çalışmalarla ön plana çıkan bu doğal arı ürünü, gıda takviyesi ve potansiyel bir terapötik olarak kabul görmektedir. Arı polenin yapısı ve kimyasal bileşimi coğrafi bölgeye, ekolojik yapıya ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunun yanında, arı polenin işleme süreçleri, saklanma süresi ve koşulları da arı polenin kimyasal içeriğini etkilemektedir. Bu faktörlere bağlı olarak değişen içerik, arı polenin antioksidan etkisini değiştirmektedir. Ayrıca, arı poleni ekstraktlarının antioksidan etkileri kullanılan solüsyona göre değişmektedir. En güçlü antioksidan etkiyi etanol ekstraksiyonunda göstermiştir. Arı polenin antioksidan kapasitesinin ölçümünde DPPH, ABTS⁺, FRAP, ORAC gibi birçok yöntem kullanmakta birlikte, tek bir metodun uygulanması gerçek aktiviteyi göstermeye yetmemektedir. Antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde reaksiyon mekanizması, izolasyon prosedürleri, biyoaktif bileşenlerin saflığı ve kullanılan substrat gibi çeşitli parametreler dikkate alınmalıdır.

Süperoksit radikalleri (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (•OH) ve singlet oksijen (¹O₂) genel olarak tanımlanan reaktif oksijen türleri (ROS) olup biyolojik sistemler tarafından metabolik yan ürünler olarak üretilirler. Canlı organizmalar, genellikle ROS'un zararlı etkilerini bloke etmede etkili olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içeren antioksidan sistemlere sahiptir. Ancak, patolojik durumlarda antioksidan sistemler yetersiz kalabilir. Serbest radikaller ve oksidantlar fazla miktarda üretildiklerinde, oksidatif stres olarak bilinen bir fenomeni ortaya çıkarırlar; bu, zırlar, lipitler, proteinler, lipoproteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi çeşitli hücrel yapıları olumsuz etkileyebilecek zararlı bir süreçtir.

Arı polenlerinin antioksidan aktiviteleri esas olarak p-kumarik asit, ferulik asit, gallik asit, klorojenik asit, vanilik asit ve kafeik asit gibi fenolik asitlere, epikateşin, rutin, kuersetin, luteolin, apigenin ve kristin gibi flavonoidlere, resveratrol gibi fitoaleksin ve E ve C vitamini gibi vitaminlere atfedilir. Bu biyoaktif maddeler elektofilleri etkisiz hale getirerek, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerin temizleyerek antioksidan aktivite gösterirler. Ayrıca metal iyonlarını bağlayarak toksik metallerin uzaklaştırılmasını sağlarlar.

Sonuç: Arı poleni gıda takviyesi ve farmasötik ürün geliştirmek için kullanılan en önemli doğal ürünlerden biridir. Yapılan çok sayıda çalışma,

oksidasyonun zararlı etkilerine karşı koyabilen doğal bir ajan olarak arı polenin büyük potansiyelini doğrular niteliktedir. Gıda endüstrisi, bileşiminde bulunan antioksidan bileşikler nedeniyle son yıllarda arı polenine büyük önem vermiştir. Arı poleni, zengin biyoaktif bileşikleri nedeniyle birçok gıda takviyesi ve farmasötik ürünün geliştirilmesi için önemli bir aday olabilir.

INTRODUCTION

Bee pollen produced by worker honey bees is composed of proteins, sugar, fibre, mineral salts, phenolic compounds and vitamins and used as a food source for all stages of the development of the bees (Campos et al. 2008). It contains known essential nutrients required for the body to make health maintenance and possess a wide range of therapeutic effects including antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antifungal, hepatoprotective, wound healing and immune-regulating (Denisow and Denisow-Pietrzyk 2016, Guiné 2015, LeBlanc et al. 2009, Olczyk et al. 2016, Thakur and Nanda 2020). Oxidative stress is imbalance between free radical-generating and radical scavenging systems in the body, which may contribute to many disorders including cancer, atherosclerosis, cerebral and cardiac ischemia, Parkinson's disease, gastrointestinal disturbances, and aging (Rao et al. 2011). An excess of free radicals formed by oxidative stress attacks vital cellular components including coenzymes, neurotransmitters and macromolecules such as nucleic acids, proteins, lipids and carbohydrates. The cellular radical scavenging system, consisting of antioxidant enzymes, neutralizes the free radicals and prevents free radical damage. However, the living cell has limited capacity on neutralizing the oxidative free radicals formed (Campos et al. 2003). The deficit can be compensated by exogenous antioxidants obtained from the diet and they can increase protection of the body. Additionally, the endogenous antioxidant system performs its functions with exogenous antioxidant systems in a synergistic way (Warraich et al. 2020). Bee pollen has been reported to exhibit antioxidant and radical scavenging activities. Its antioxidant ability has usually been attributed to the presence of phenolic acids and flavonoids (LeBlanc et al. 2009, Leja et al. 2007, Šarić et al. 2009). The composition of bee pollen may vary depending on the species composition of the pollen, catchment areas, weather

conditions, seasons, and actions of the beekeeper (Campos et al. 2008, Guiné 2015). Thus, the antioxidant activities may vary due to the differences in active ingredients of bee pollen. This chapter will focus on chemical composition and antioxidant activity of bee pollen.

Oxidative stress

Oxidative stress has been defined as an imbalance between production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) due to the disturbance of balance between their production and removal by antioxidant enzymes in cells and tissues (Pizzino et al. 2017). ROS are generated via several oxidative processes, including aerobic metabolism, arachidonic acid metabolism and the activity of NADPH oxidases and xanthine oxidases, during both physiological and pathological conditions (Cho et al. 2011, Pizzino et al. 2017). ROS include free radicals such as superoxide radicals ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radicals ($\bullet OH$) and nonradical molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen (1O_2) (Sharma et al. 2012). Oxidative stress occurs as a result of the deterioration in biological systems' ability to detoxify these reactive products (Pizzino et al. 2017). Free radicals are molecules with unpaired electrons and having an odd number of electrons make them unstable, short lived and highly reactive. Due to their high reactivity, free radicals can capture electrons from other compounds to gain stability. Thus, the affected molecule loses its electrons and becomes a free radical itself. The free radical molecules formed initiate the reactions that damage living cells (Phaniendra et al. 2015). Excessive ROS can damage cellular proteins, lipids and DNA, leading to cell death. Mitochondria have their own DNA (called mitochondrial DNA) and their own machinery for synthesizing RNA and proteins. Mitochondrial DNA is considered to be susceptible to ROS attack resulting from oxidative stress. As a result of mitochondrial DNA damage, mutations occur in the mitochondrial genomes, which leads to the development of diseases and an increase in the severity of the diseases (Guo et al. 2013).

Antioxidants

Antioxidant is used to define the molecules that donate an electron to a rampaging free radical to stabilize it, thus preventing oxidative damage (Lobo et al. 2010). Antioxidants combat free radicals in various ways, including by sequestering metal ions that are the source of free radicals, by suppressing the production of active species, by scavenging and

quenching of ROS, by terminating the chain reaction, and by repairing radical's damages of the cell (Rao et al. 2011, Aguilar et al. 2016). Based on their activity, antioxidant defence mechanisms are classified into two types, enzymatic and non-enzymatic. They can be also classified according to their source including endogenous antioxidants that are produced in the body and exogenous antioxidants that are supplied with the diet (Masella et al. 2005, He et al. 2017). Endogenous antioxidant system includes enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GTPx), thioredoxin reductase, peroxiredoxin, glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GTRx), and non-enzymatic antioxidants such as albumin, bilirubin, glutathione, uric acid, melatonin, polyamines, and metal binding proteins (ceruloplasmin, transferrin) (Aguilar et al. 2016, Birben et al. 2012, Kuciel-Lewandowska et al. 2020, Masella et al. 2005, Rao et al. 2011).

Exogenous antioxidants can be obtained from the diet; however, these antioxidants may not be sufficient to maintain optimal body function. Even though it is best to get the antioxidants from a diet rich in fruits and vegetables, taking antioxidant supplements has become an increasingly popular practice (Pham-Huy et al. 2008). Intake of exogenous antioxidants can play an important role in supporting endogenous antioxidants by combating oxidative stress and increasing protection of the body (Romero et al. 2013). Exogenous antioxidant systems include nonenzymatic antioxidants such as vitamin C (Ascorbic acid), vitamin A (β -carotene), vitamin E (α -tocopherol), Lycopene (Carotenoid), trace elements (Selenium, zinc, manganese), flavonoids and other compounds (Hydroxycinnamic acids, allicin, curcumin) (Rao et al. 2011, Romero et al. 2013).

Antioxidant activity of bee pollen

Bee pollen, a honey bee derivative product, is used for its nutritious and physiological properties and beneficial effects on human health. It contains many components which are important in the healthy and normal development of the organism, therefore it can be used as a food supplement. Bee pollens have rich phenolic compounds, flavonoids, phytosterols and other chemicals including vitamins and minerals with health protective potential (Denisow and Denisow-Pietrzyk 2016). Numerous studies have demonstrated that bee pollen has potential bioactive

and therapeutic properties due to its healthy ingredients and these ingredients varies widely according to its botanical and geographical origin hence its therapeutic effects also vary (Oliveira et al. 2019, Adaškevičiūtė et al. 2019, Komosinska-Vassev et al. 2015).

Bee pollen has been considered to be a potential natural source of antioxidants due to high antioxidant properties of its active ingredients, especially phenolic compounds. These antioxidant ingredients comprise two main groups of compounds, phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) and carotenoids. Phenolic compounds prevent oxidative stress-mediated DNA and tissue damage from a variety of endogenous and exogenous factors. Flavonoids having subgroups including flavanols, flavanols (catechins), anthocyanins, chalcones, isoflavones and neoflavonoids play a variety of biological activities in plants, animals and bacteria. Flavonoids are secondary metabolites contributing to the colourful pigments of plants and have important roles in the growth, development and defence of plants (Kocot et al. 2018, Panche et al. 2016). They can have effects on antioxidant activity, gene expression, cell signalling or drug metabolizing enzymes and have a phytoestrogenic potential, and show a protective effect against the toxicity of environmental pollutant dioxin (Aličić et al. 2014). The antioxidant activities of flavonoid compounds are related to a group of natural compounds with variable phenolic structures (Cornara et al. 2017, Kocot et al. 2018, Karkar et al. 2020). Flavonoids act as antioxidants by direct elimination of the radicals, interaction with enzymes or chelatically binding the metal cations. Phenolic compounds also enable free radicals to be neutralized mainly by quenching oxygen or decomposing peroxides. Bee pollen also contains carotenoids that have antioxidant activity. Carotenoids are naturally occurring pigments responsible for yellow, orange, and red in plants, algae and photosynthetic bacteria and can scavenge the radicals with different ways such as electron transfer, addition reactions and elimination of hydrogen (Aličić et al. 2014, Fatrcová-Šramková et al. 2016).

Bee pollen has been reported to exert free radical-scavenging activity and inhibitory effect on lipid peroxidation. Antioxidant ability of bee pollen has been attributed to its contents with antioxidant properties/activities (Leja et al. 2007). The measure of its antioxidant activities has been expressed by antioxidant capacity. Many factors may be important

in accurately defining antioxidant activity. Many assays used to determine the antioxidant capacity of bee pollen are based on different mechanisms of antioxidant defence systems such as the removal or inhibition of free radicals or chelation of metal ions (Aličić et al. 2014). It has been reported that antioxidant activity of bee pollen may vary depending on its content. Therefore, different findings have been obtained in studies with bee pollen samples collected from different areas (Kocot et al. 2018, Leja et al. 2007, Saral et al. 2019).

Various methods including direct and indirect assays are available to evaluate the antioxidant capacity of bee pollen. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalent antioxidant capacity (TEAC) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays are the most commonly used direct assays for determining the capacity. The most frequently used indirect methods are 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ferric reducing ability of plasma (FRAP). These assays provide useful data but are not sufficient to evaluate the overall antioxidant capacity of the content (Aličić et al. 2014, Okan et al. 2013, Mărghitaschedilla et al. 2009, Fatiha and Abdelkader 2019, Pisoschi and Negulescu 2011, Moniruzzaman et al. 2011).

Antioxidant compounds of bee pollen

Bee pollen has a rich chemical structure such as proteins, free amino acids, carbohydrates, lipids, fatty acids, phenolic compounds, vitamins (including B-complex and folic acid) and minerals. The high content of carbohydrates (13% to 55%), crude fibres (0.3% to 20%), proteins (10% to 40%) and lipids (1% to 10%) highlights bee pollen as a good nutritional supplement (Villanueva et al. 2002). Other minor components are minerals, vitamins, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, sterols and terpenes (Feás et al. 2012). Bee pollen contains provitamin A (β -carotene) and vitamin E, D, B1, B2, B6 and C, and acids like pantothenic, nicotinic, folic, biotin, rutin and inositol (Komosinska-Vassev et al. 2015).

Honey bees use a variety of flowering plants for bee pollen production. When the bees start foraging to gather pollen, they visit the same species of flowers, and that pollen is mainly monofloral origin with minor additions of other species (Aličić et al. 2014). The composition of bee pollen depends mainly on botanical sources, together with other factors

DERLEME / REVIEW

including soil type, climatic conditions and anthropogenic activities (Pascoal et al. 2014), thus strongly affecting antioxidant properties. A high number of *in vitro* studies using DPPH, ABTS⁺, FRAP, ORAC methods have confirmed the antioxidant potentials of bee pollens (Šarić et al. 2009, Ulusoy and Kolayli 2014, Kaškonienė et al. 2015, Mohdaly et al. 2015, Kocot et al. 2018, Özcan et al. 2019). The antioxidant activities of the bee pollens seem to be mainly due to phenolic acids like

p-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid and syringic acid, flavonoids like epicatechin, rutin, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, pinocembrin and chrysin, phytoalexin like resveratrol and vitamins like vitamin E and C. Compounds with antioxidant activity in bee pollen are given in Table 1. Antioxidant capacity of bee pollen and methods used to determine antioxidant capacity are given in Table 2.

Table 1. Compounds with antioxidant properties in honey bee pollens.

Compounds	Pollen origin	Range	Reference
<i>p</i> -coumaric acid	Egypt	2.48 ± 0.25 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Brazil	0.24 ± 0.02 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
	Anzer pollen from Turkey	34.16-127.85 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Turkey and Russia	1.39 ± 0.10-10.46 ± 0.18 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Rapee bee pollen from China	32.63 ± 2.19 µg/g FPE 11.22 ± 0.10 µg/g BPE	Sun et al. 2017
Gallic acid	Anzer pollen from Turkey	9.15-18.59 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	5.9 ± 0.05 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	3.0-32.3 µg/g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	6.17 ± 0.08-32.89 ± 0.62 mg/100g	Özcan et al. 2019
Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid)	Anzer pollen from Turkey	8.31-19.77 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Rapee bee pollen from China	119.38 ± 4.82 µg/g FPE	Sun et al. 2017
	Bee pollen from Turkey and Russia	17.09 ± 0.56-94.74 ± 2.99 mg/100g	Özcan et al. 2019
<i>p</i> -OH benzoic acid	Anzer pollen from Turkey	2.74-122.68 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Rapee bee pollen from China	84.28 ± 5.29 µg/g FPE 11.08 ± 0.13 µg/g BPE	Sun et al. 2017
Abscisic acid	Anzer pollen from Turkey	21.04-288.70 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
Benzoic acid	Anzer pollen from Turkey	46.87-1,077.64 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Rapee bee pollen from China	314.16 ± 11.87 µg/g FPE 3.46 ± 0.14 µg/g BPE	Sun et al. 2017
1,2-dihydroxybenzene	Bee pollen from Turkey and Russia	8.34 ± 0.48-114.97 ± 0.03 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Bee pollen from Turkey and Russia	4.24 ± 0.17-24.31 ± 0.41 mg/100g	Özcan et al. 2019
Chlorogenic acid	Anzer pollen from Turkey	14.64-75.08 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
Chlorogenic acid/ Caffeic acid	Bee pollen from Central Chile	11.29 ± 0.45-258.92 ± 10.36 mg/kg	Velasquez et al. 2017
Trans-cinnamic acid	Bee pollen from Brazil	0.27 ± 0.01 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
	Rapee bee pollen from China	102.65 ± 3.79 µg/g FPE 2.30 ± 0.17 µg/g BPE	Sun et al. 2017
Vanillic acid	Anzer pollen from Turkey	22.96-87.02 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	0.35 ± 0.15 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
Vanillin	Rapee bee pollen from China	58.41 ± 1.22 µg/g FPE	Sun et al. 2017
Caffeic acid	Anzer pollen from Turkey	10.88-98.03 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	4.21 ± 0.22 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	8.5-20.6 µg/g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	5.84 ± 0.35-23.86 ± 0.63 mg/100g	Özcan et al. 2019
Syringic acid	Anzer pollen from Turkey	10.55-259.53 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014

Compounds	Pollen origin	Range	Reference
	Bee pollen from Egypt	0.59 ± 0.08 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	5.56 ± 0.01-23.77 ± 0.01 mg/100g	Özcan et al. 2019
Sinapic acid	Bee pollen from Central Chile	9.12 ± 0.36-89.67 ± 3.59 mg/kg	Velasquez et al. 2017
Ferulic acid	Anzer pollen from Turkey	36.83-230.55 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	4.2 ± 0.18 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	14.6-68.6 µg /g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Central Chile	5.48 ± 0.22-26.33 ± 1.05 mg/kg	Velasquez et al. 2017
	Bee pollen from Brazil	0.01 ± 0.01 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
o-coumaric acid (2-Hydroxycinnamic acid)	Anzer pollen from Turkey	2.63-42.23 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	43.4-179.9 µg/g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Central Chile	4.02 ± 0.16-630.92 ± 25.24 mg/kg	Velasquez et al. 2017
Tert-cinnamic acid	Anzer pollen from Turkey	6.82-56.38 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Turkey and Russia	1.57 ± 0.18-181.33 ± 0.25 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Bee pollen from Central Chile	6.49 ± 0.26-8.93 ± 0.36 mg/kg	Velasquez et al. 2017
Rutin	Anzer pollen from Turkey	25.59-692.85 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	3.46 ± 0.14 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	156.2-955.7 µg/g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	9.82 ± 0.62-80.47 ± 0.46 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Rapee bee pollen from China	774.87 ± 8.77 µg/g FPE 6.45 ± 0.40 µg/g BPE	Sun et al. 2017
	Bee pollen from Brazil	0.02 ± 0.01 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
Quercetin	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	10.19-14.30 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	3.25 µmol/g (hydrolyzed extracts)	Šarić et al. 2009
	Anzer pollens from Turkey	55.94-499.20 µg/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	6.4 ± 0.30 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	24.0-529.8 µg/g	Kaškonienė et al. 2015
	Rapee bee pollen from China	196.38 ± 3.14 µg/g FPE	Sun et al.2017
	Bee pollen from Turkey and Russia	61.23 ± 0.76-685.36 ± 0.60 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Bee pollen from Brazil	0.32 ± 0.02 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
Luteolin	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	46.96-66.39 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
Apigenin	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	23.99-34.40 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
	Bee pollen from Egypt	2.4 ± 0.25 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
Kaempferol	Bee pollen from Egypt	1.65 ± 0.24 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	1.563 µmol/g	Šarić et al. 2009
	Bee pollen from Turkey and Russia	1.91 ± 0.10-39.37 ± 0.14 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Bee pollen from Central Chile	5.33 ± 0.21-344.20 ± 13.76 mg/kg	Velasquez et al. 2017
	Rapee bee pollen from China	9.26 ± 6.21 µg/g FPE 0.17 ± 0.18 µg/g BPE	Sun et al. 2017
	Bee pollen from Brazil	0.68 ± 0.02 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
Pinocembrin	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	1.418 µmol/g (nonhydrolyzed extracts)	Šarić et al. 2009

DERLEME / REVIEW

Compounds	Pollen origin	Range	Reference
Chrysin	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	1.351 μ mol/g (nonhydrolyzed extracts) and 0.786 μ mol/g (hydrolyzed extracts)	Šarić et al. 2009
Galangin	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	0.859 μ mol/g (nonhydrolyzed extracts)	Šarić et al. 2009
Isorhamnetin	<i>Cystus incanus</i> L. rich bee pollen from Croatia	6.705 μ mol/g (hydrolyzed extracts)	Šarić et al. 2009
Protocatechuic acid	Anzer pollen from Turkey	8.31-19.77 μ g/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Rapee bee pollen from China	119.38 \pm 4.82 μ g/g FPE	Sun et al. 2017
Myricetin	Bee pollen from Brazil	0.04 \pm 0.07 mg/g	de Florio Almeida et al. 2017
Catechin	Bee pollen from Egypt	4.8 \pm 0.18 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	73.88 \pm 5.35-337.40 \pm 0.87 mg/100g	Özcan et al. 2019
α -Catechin	Bee pollen from Egypt	0.58 \pm 0.05 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
3,4-dimethoxy cinnamic acid	Bee pollen from Egypt	45.8 \pm 0.16 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
Naringenin	Bee pollen from Egypt	3.34 \pm 0.12 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from the Baltic Region	3.1-118.0 μ g/g	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Turkey and Russia	4.43 \pm 0.21-501.13 \pm 2.38 mg/100g	Özcan et al. 2019
Luteolin	Bee pollen from Egypt	2.8 \pm 0.10 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
	Bee pollen from Central Chile	316.00 \pm 2.64 mg/kg	Velasquez et al. 2017
Epicatechin	Anzer pollen from Turkey	39.15-520.02 μ g/100 g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Bee pollen from Egypt	2.1 \pm 0.08 mg/mL	Mohdaly et al. 2015
Isorhamnetin	Bee pollen from Turkey and Russia	2.21 \pm 0.08-71.23 \pm 0.40 mg/100g	Özcan et al. 2019
Anthocyanins	Tuscan bee pollen from Italy	77.37 \pm 2.25-57.19 \pm 5.84 mgC3GE/L	Gabriele et al. 2015
Resveratrol	Bee pollen from Turkey and Russia	3.83 \pm 0.09-82.02 \pm 0.04 mg/100g	Özcan et al. 2019
	Rapee bee pollen from China	242.88 \pm 6.32 μ g/g FPE 4.39 \pm 0.13 μ g/g BPE	Sun et al. 2017
Vitamin B1	Rosee bee pollen from Hubei Province in China	261.28 \pm 4.09-1043.99 \pm 0.22 μ g/g	Yang et al. 2019
Vitamin E	Bee pollen from Brazil	13.5-42.5 μ g/g	Oliveira et al. 2009
	Multifloral fresh bee pollen from Turkey	162.35 \pm 5.07 μ g/g dry pollen	Kanar and Mazi 2019
Vitamin C	Bee pollen from Brazil	273.9-560.3 μ g/g	Oliveira et al. 2009
	Multifloral fresh bee pollen from Turkey	451.50 \pm 6.36 μ g/g dry pollen	Kanar and Mazi 2019
	Rosee bee pollen from China	12.52 \pm 1.38-262.74 \pm 3.30 μ g/g	Yang et al. 2019
β -carotene	Bee pollen from Brazil	56.3-198.9 μ g/g	Oliveira et al. 2009
Total carotenoid content	Bee pollen from Central Chile	2.8-50.2 mg/kg	Velasquez et al. 2017
	Bee pollen from Brazil	0.49-242.6 μ g/g	Oliveira et al. 2009
	Bee pollen from Turkey and Russia	12.78 \pm 0.01-98.62 \pm 0.02 mg/g	Özcan et al. 2019
	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	223.10 \pm 1.24-261.33 \pm 1.36 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
Total flavonoid content	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	93.40-105.82 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
	<i>Trigona apicalis</i> bee pollen	25.72 \pm 0.17 mg QE/g	Harif Fadzilah et al. 2017
	<i>Trigona thoracica</i> bee pollen	31.80 \pm 0.13 mg QE/g	
	<i>Trigona itama</i> bee pollen	15.28 \pm 0.04 mg QE/g	
	Honeybee pollen from the Baltic Region	6.1-11.6 RE (mg/g) 2.7-5.2 QE (mg/g)	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Europe Countries	10.68-48.31 mg RUE/10 g	Adaškevičiūtė et al. 2019

Compounds	Pollen origin	Range	Reference
	Monofloral bee pollen from Brazil	0.3 ± 0.0- 9.0 ± 0.6 mg GAE/g	De-Melo et al. 2018
	Bee pollen from Brazil	5.95 mg quercetin/g	Soares de Arruda et al. 2020
	Bee pollen from Greece	6.0 ± 0.3-57.6 ± 2.0 mg QE/g	Atsalakis et al. 2017
	Bee pollen from Portugal	4.5-7.1 GAE/g	Feás et al. 2012
	Rose bee pollen from China	16.44 ± 1.20-27.96 ± 0.03 mg/g	Yang et al. 2019
	Bee pollen from Turkey	2.62 ± 0.047-4.44±0.125 mg QE/g	Mayda et al. 2020
	Rapee bee pollen from China	19.24 ± 0.06 mg RE/g FPE 3.65 ± 0.03 mg RE/g BPE	Sun et al. 2017
Total phenolic content	Bee pollen from Istanbul/Turkey.	147.10-462.02 mg GAE/g	Dulger Altiner et al. 2020
	<i>Trigona apicalis</i> bee pollen	135.93 ± 0.02 mg GAE/g	Harif Fadzilah et al. 2017
	<i>Trigona thoracica</i> bee pollen	103.62 ± 0.04 mg GAE/g	
	<i>Trigona itama</i> bee pollen	33.46 ± 0.02 mg GAE/g	
	Anzer pollen from Turkey	44.07-124.10 mg/g	Ulusoy and Kolayli 2014
	Rapee bee pollen from China	11.76 ± 0.04 mg GAE/g FPE 0.81 ± 0.01 mg GAE/g BPE	Sun et al. 2017
	Bee pollen from Latvia, Lithuania, Spain and China	24.1-45.5 RE (mg/g) 17.7-26.8 GAE (mg/g) 13.4-25.2 QE (mg/g)	Kaškonienė et al. 2015
	Bee pollen from Europe Countries	33.14-55.04 mg RUE/10 g	Adaškevičiūtė et al. 2019
	Monofloral bee pollen from Brazil	5.6 ± 0.0-29.7 ± 0.3 mg GAE/g	De-Melo et al. 2018
	Bee pollen from Brazil	27.94 mg GAE/g	Soares de Arruda et al. 2020
	Bee pollen from Greece	15.2 ± 0.4-60.2 ± 2.0 mg GAE/g	Atsalakis et al. 2017
	Bee pollen from Portugal	12.9-19.8 GAE/g	Feás et al. 2012
	Sunflower bee pollen from Western Slovakia	691.67 ± 7.76-803.33 ± 3.30 mg/kg	Fatrcová-Šramková et al. 2016
	Bee pollen from Korea	7.4-20.4 µg GAE/mg extract	Kim et al. 2015
	Unifloral bee pollen from Turkey	2340.07 ± 199.32 mg GAE/100 g	Özkök and Silici 2017
Bee pollen from Venezuela	396.7-1286.7 GAE/100 g	Pérez-Pérez et al. 2012	
Bee pollen from Italy	4.2 ± 0.4-29.6 ± 0.9 mg GAE/g DW	Rocchetti et al. 2019	
Bee pollen from Central Chile	22.8-918.4 mg/kg	Velasquez et al. 2017	
Multifloral fresh bee pollen from Turkey	14.42 ± 0.60 mg GAE/g	Kanar and Mazı 2019	
Bee pollen from Turkey	26.69 ± 0.595-43.42 ± 0.779 mg GAE/g	Mayda et al. 2020	

Rutin (RE), gallic acid (GAE), quercetin (QE), free phenolic extracts (FPE), and bound phenolic extracts (BPE)

DERLEME / REVIEW

Table 2. Antioxidant capacities of bee pollens and methods used to determine antioxidant capacity.

Bee pollen origin	Method	Antioxidant capacity	Reference
Monofloral bee pollen from Brazil	DPPH	10.0 ± 0.3-110.8 ± 1.3 µmol TE/g	De-Melo et al. 2018
	ORAC	133.7 ± 7.3-542.0 ± 20.7 µmol TE/g	
Bee pollen from Turkey and Russia	DPPH	60.35 ± 0.03-81.41 ± 0.0%	Özcan et al. 2019
Multifloral fresh bee pollen from Turkey	DPPH	0.29 ± 0.01 IC ₅₀ (mg dry pollen/ml)	Kanar and Mazı 2019
Bee pollens from Europe Countries	ORP	16.27-39.40 mg RUE/10 g	Adaškevičiūtė et al. 2019
Bee pollen from Korea	DPPH	13.0-50.1%	Kim et al. 2015
Bee pollens from Italy	ABTS	49.9 ± 6.2-216.3 ± 4.6 µmol TE/g DW	Rocchetti et al. 2019
	DPPH	11.9 ± 6.4-134.7 ± 4.3 µmol TE/g DW	
	ORAC	105.0 ± 19.4-916.1 ± 27.7 µmolTE/g DW	
Tuscan bee pollen from Italy	DPPH	37.95 ± 0.19-94.45 ± 0.01%	Gabriele et al. 2015
	ORAC	519.45 ± 15.07-677.70 ± 12.92 µmol TE/g	
Bee pollen from Portugal	DPPH	2.0 mg/mL-4.3 mg/mL	Feás et al. 2012
	BCB	3.1-5.9 ± 0.9 mg/mL	
Sunflower bee pollen from Western Slovakia	DPPH	47.97 ± 0.29-50.46 ± 0.43%	Fatrcová-Šramková et al. 2016
Anzer pollen from Turkey	FRAP	11.77-105.06 µmol Trolox/g	Ulusoy and Kolaylı 2014
	CUPRAC	33.1-86.8 mmol/g	
	DPPH	0.65-8.20 mg/mL	
Bee pollen from Poland	TAA	6.8-86.4%	Leja et al. 2007
	DPPH	8.6-91.3%	
	HRSA	10.5-92.7%	
Bee pollen from Egypt	DPPH	15%	Mohdaly et al. 2015
	ABTS	76.51%	
Bee pollen from Brazil	ORAC	228.02-411.39 mmol eq. Trolox /g pollen	Soares de Arruda et al. 2020
	DPPH	1.68-7.77 mg pollen/mL extract	
	BCB	72.38-90.27%	
Bee pollen from Turkey	CUPRAC	6.25-257.27 µmol TE/g	Dulger Altiner et al. 2020
	ABTS	6.20-111.40 µmol TE/g	
	DPPH	0.44-83.84 µmol TE/g	
Bee pollen from Central Chile	FRAP	6.86-52.99 g GAE/kg	Velasquez et al. 2017
Bee pollen from Venezuela	TEAC	0.5-1.84 µmoles Trolox equivalents TEAC/100 g	Pérez-Pérez et al. 2012
Unifloral bee pollen samples from Turkey	DPPH	42.37 ± 3.81 mg AAE/g 89.66 ± 0.39%	Özkök and Silici 2017
Bee pollen from Brazil	DPPH	810-4690 µg/mL	Carpes et al. 2009
Bee pollen from Turkey	DPPH	3.08 ± 0.056-3.85 ± 0.030 mg TE/g	Mayda et al. 2020
	ABTS	1.80 ± 0.052-5.980 ± 0.100 mg TEAC/g	

ORP: oxidation-reduction potential, BCB: β-Carotene bleaching, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ORAC: oxygen radical absorbance capacity, ORP: oxidation reduction potential, FRAP: ferric reducing ability of plasma, CUPRAC: cupric reducing antioxidant capacity, TEAC: trolox equal antioxidant capacity, TAA: total antioxidant activity, HRSA: hydroxyl radical-scavenging activity.

Conclusion

The previously mentioned studies seem to confirm the great potential of bee pollen as a natural agent capable of counteracting the damaging effects of oxidation. In recent years, the food industry has paid great attention to bee pollen due to its antioxidant

compounds. Bee pollen may be an important candidate for developing many food supplements and pharmaceutical products due to its rich bioactive compounds.

Conflict of interests: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Adaškevičiūtė, V., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Barčauskaitė, K., Maruška, A. 2019. Comparison of physicochemical properties of bee pollen with other bee products. *Biomolecules*, 9(12): 819., doi.org/10.3390/biom9120819
- Aguilar, TAF., Navarro, BCH., Perez, JAM. 2016. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. In: Morales-Gonzalez JA, Morales-González A, Madrigal-Santillan EO (editors). A master regulator of oxidative stress-the transcription factor nrf2. London, IntechOpen. pp. 4-19. ISBN: 978-953-51-2838-0 doi.org/10.5772/65715
- Aličić, D., Šubarić, D., Jašić, M., Pašalić, H., Ačkar Đ. 2014. Antioxidant properties of pollen *HRČAK*, 3(1): 6-12.
- Atsalakis, E., Chinou, I., Makropoulou, M., Karabournioti, S., Graikou, K. 2017. Evaluation of phenolic compounds in *Cistus creticus* bee pollen from Greece. Antioxidant and antimicrobial properties *Nat. Prod. Commun*, 12(11):1813-1816., doi.org/10.1177/1934578X1701201141
- Birben, E., Sahiner, UM., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense *World Allergy Organ J*, 5(1): 9-19., doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Campos, MG., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, LB., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods *J. Apic. Res.*, 47(2): 154-161., doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443
- Campos, MG., Webby, RF., Markham, KR., Mitchell, KA., Da Cunha, AP. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids *J. Agric. Food Chem*, 51(3): 742-745., doi.org/10.1021/jf0206466.
- Carpes, ST., Mourão, GB., De Alencar, SM., Masson, ML. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil *Brazilian J. Food Technol*, 12(03) 220-229., doi.org/10.4260/BJFT2009800900016
- Cho, KJ., Seo, JM., Kim, JH. 2011. Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species *Mol Cells*. 32(1): 1-5., doi.org/10.1007/s10059-011-1021-7
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B. 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products *Front Pharmacol*. 8: 412., doi.org/10.3389/fphar.2017.00412
- de Florio Almeida, J., dos Reis, AS., Heldt, LFS., Pereira, D., Bianchin, M., de Moura, C., Plata-Oviedo, MV., Haminiuk, CWI., Riberio, IS., Pinto da Luz, CF., Carpes, ST. 2017. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages *LBWTAP*. 76(Part B): 299-305., doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017
- De-Melo, AAM., Estevinho, LM., Moreira, MM., Delerue-Matos, C., Freitas, ADSD., Barth, OM., Almeida-Muradian, LBD. 2018. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen *J. Food Biochem* 42(5), e12536., https://doi.org/10.1111/jfbc.12536
- Denisow, B., Denisow-Pietrzyk, M. 2016. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review *J Sci Food Agric*. 96 (13):4303-4309., doi.org/10.1002/jsfa.7729
- Dulger Altiner, D., Sandikci Altunatmaz, S., Sabuncu, M., Aksu, F., Sahan, Y. 2020. In-vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey *Food Sci (AHEAD)*. doi.org/10.1590/fst.10220
- Fatiha, M., Abdelkader, T. 2019. Study of antioxidant activity of pyrimidinium betaines by DPPH radical scavenging method *J Anal Pharm Res*. 8: 33-36., doi.org/10.15406/japlr.2019.08.00308
- Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová, M., Kačániová, M. 2016. Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus* L. bee pollen *J Environ Sci Health B. Part B*, 51(3):176-181., doi.org/10.1080/03601234.2015.1108811
- Feás, X., Vázquez-Tato, MP., Estevinho, L., Seijas, JA., Iglesias, A. 2012. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and

DERLEME / REVIEW

- microbiological quality *Molecules*. 17(7): 8359-8377., doi.org/10.3390/molecules17078359
- Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagon, S., Pozzo, L., Biondi, C., Domenici, V., Pucci, L. 2015. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins *Ital. J. Food Saf.* 27(2):248-259., doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v191
- Guiné, RPF. 2015. Bee Pollen: Chemical Composition and Potential Beneficial Effects on Health *Curr Nutr Food Sci*, 11(4):301-308., doi.org/10.2174/1573401311666150630181615
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases *Neural Regen Res*. 8(21):2003–2014., doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009
- Harif Fadzilah, N., Jaapar, MF., Jajuli, R., Wan Omar, WA. 2017. Total phenolic content, total flavonoid and antioxidant activity of ethanolic bee pollen extracts from three species of Malaysian stingless bee *J. Apic. Res.* 56(2): 130-135., doi.org/10.1080/00218839.2017.1287996
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X. 2017. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species *Cell Physiol Biochem*, 44(2):532-553., doi.org/10.1159/000485089
- Kanar, Y., Mazi, BG. 2019. Effect of different drying methods on antioxidant characteristics of bee-pollen *Meas.* 13:3376-3386., doi.org/10.1007/s11694-019-00283-5
- Karkar, B., Şahin, S., Güneş, ME. 2020. Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey *J. Apic. Res.* 1-10., doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462
- Kaškonienė, V., Ruočkovienė, G., Kaškonas, P., Akuneca, I., Maruška, A. 2015. Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties *Food Anal. Methods*. 8(5):1150-1163., doi.org/10.1007/s12161-014-9996-2
- Kim, SB., Jo, YH., Liu, Q., Ahn, JH., Hong, IP., Han, SM., Hwang, BY., Lee, MK. 2015. Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content *Molecules*. 20(11):19764-19774., doi.org/10.3390/molecules201119656
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., Musik, I. 2018. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application *Oxid.* 7074209., doi.org/10.1155/2018/7074209
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., Olczyk, K. 2015. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2015., doi.org/10.1155/2015/297425
- Kuciel-Lewandowska, J., Kasperczak, M., Bogut, B., Heider, R., Laber, WT., Laber, W., Paprocka-Borowicz, M. 2020. The Impact of Health Resort Treatment on the Nonenzymatic Endogenous Antioxidant System *Oxid.* 2020(147):1-9., doi.org/10.1155/2020/8423105
- LeBlanc, BW., Davis, OK., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen *Food Chem.* 115(4):1299-1305., doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekońska, K. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species *Food Chem.* 100(1):237-240., doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118-126., doi.org/10.4103/0973-7847.70902
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes *J Nutr Biochem.* 16(10): 577-586., doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- Mărghitaschedilla, LA., Stanciu, OG., Dezmirean, DS., Bobiscedilla, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, MG. 2009. In vitro

- antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem.* 115(3):878-883., doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014
- Mayda, N., Özkök, A., Bayram, NE., Gerçek, YC., Sorkun, K. 2020. Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles *Meas.* 14(4): 795–1809., doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y.
- Mohdaly, AA., Mahmoud, AA., Roby, MH., Smetanska, I., Ramadan, MF. 2015. Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities *J. Food Biochem.* 39(4): 538-547., doi.org/10.1111/jfbc.12160.
- Moniruzzaman, M., Khalil, MI., Sulaiman, SA., Gan, SH. 2011. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 9(1): 36–42., doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.5.
- Okan, OT., Varlibaş, H., Öz, M., Deniz, İ. 2013. Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler *Kastamonu Üniv. Orman Fak. Derg.* 13(1): 48-59.
- Olczyk, P., Koprowski, R., Kaźmierczak, J., Mencner, L., Wojtyczka, R., Stojko, J, Olczyk, K., Komosinska-Vassev, K. 2016. Bee pollen as a promising agent in the burn wounds treatment *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016: 8473937., doi.org/10.1155/2016/8473937
- Oliveira, KC., Moriya, M., Azedo, RA., Almeida-Muradian, LBD., Teixeira, EW., Alves, ML., Moreti, AC. 2009. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen *Química Nova*, 32(5):1099-1102., doi.org/10.1590/S0100-40422009000500003
- Oliveira, RGD., Jain, S., Freitas, LDS., Araújo, EDD. 2019. Phenolic compound, nutritional and antioxidant profile of pollen collected by the genus melipona in North Eastern Brazil *Brazilian J. Food Technol.* 22(4)., doi.org/10.1590/1981-6723.07918
- Özcan, MM., Aljuhaimi, F., Babiker, EE., Uslu, N., Ceylan, DA., Ghafoor, K., Özcan, MM., Dursun, N., Ahmed, IM., Fadimu, GJ., Alsawmahi, ON. 2019. Determination of antioxidant activity, phenolic compound, mineral contents and fatty acid compositions of bee pollen grains collected from different locations *J. Apic. Res.* 63(1): 69-79., doi.org/10.2478/jas-2019-0004
- Özkök, D., Silici, S. 2017. Antioxidant activities of honeybee products and their mixtures. *Food Sci Biotechnol.* 26(1): 201-206., doi.org/10.1007/s10068-017-0027-0
- Panche, AN., Diwan, AD., Chandra, SR. 2016. Flavonoids: an overview *J Nutr Sci.* 5: 1-5., doi.org/10.1017/jns.2016.41.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, Estevinh, LM. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory *Food Chem Toxicol.* 63: 233-239., doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010.
- Pérez-Pérez, EM., Vit, P., Rivas, E., Sciortino, R., Sosa, A., Tejada, D., Rodríguez-Malaver, AJ. 2012. Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela *Arch Latinoam Nutr.* 62: 375-80., PMID: 24020258.
- Pham-Huy, LA., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health *Int J Biomed Sci.* 4: 89–96., PMID: 23675073
- Phaniendra, A., Jestadi, DB., Periyasamy L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases *Indian J Clin Biochem.* 30(1):11-26., doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0
- Pisoschi, AM., Negulescu, GP. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review *Biochem. Analytical Biochemistry.* 1(1):106., doi.org/10.4172/2161-1009.1000106
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health *Oxid Med Cell Longev.* 2017, 8416763., doi.org/10.1155/2017/8416763
- Rao, PS., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamid, S. 2011. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants *Free Radic Biol Med.* 1(4): 2-7., doi.org/10.4103/0973-7847.70902
- Rocchetti, G., Castiglioni, S., Maldarizzi, G., Carloni, P., Lucini, L. 2019. UHPLC-ESI-QTOF-MS

DERLEME / REVIEW

- phenolic profiling and antioxidant capacity of bee pollen from different botanical origin *J. Food Sci. Technol.* 54: 335-346., doi.org/10.1111/ijfs.13941
- Romero, AC., Hernández, EGO., Cerón, TF., Chávez, AÁ. 2013. The exogenous antioxidants. Ed.: Jose Antonio Morales-Gonzalez. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants, IntechOpen, London, UK. 33. doi.org/10.5772/52490
- Saral, Ö., Kilicarslan, M., Şahin, H., Yildiz, O., Dincer, B. 2019. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 43(4): 441-447., doi.org/10.3906/vet-1901-3
- Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likić, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D., Marotti, T. 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol.* 47(3): 547-554., doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007
- Sharma, P., Jha, AB., Dubey, RS., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions *Turk J Bot.* 2012., doi.org/10.1155/2012/217037
- Soares de Arruda, VA., Viera dos Santos, A., Figueiredo Sampaio, D., da Silva Araújo, E., de Castro Peixoto, AL., Estevinho, LM., de Almeida-Muradian, LB. 2020. Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity *J. Apic. Res.* 1-9., doi.org/10.1080/00218839.2020.1840854
- Sun, L., Guo, Y., Zhang, Y., Zhuang, Y. 2017. Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells *Front Pharmacol.* 8:104., doi.org/10.3389/fphar.2017.00104
- Thakur, M., Nanda, V. 2020. Composition and functionality of bee pollen: A review *Trends Food Sci Technol.* 98: 82-106., doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001
- Ulusoy, E., Kolayli, S. 2014. Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen *J. Food Biochem.* 38(1): 73-82., doi.org/10.1111/jfbc.12027
- Velasquez, P., Rodriguez, K., Retamal, M., Giordano, A., Valenzuela, LM., Montenegro, G. 2017. Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multi-floral bee pollen *J. Appl. Bot. Food Qual.* 90(1): 306-314., doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.038
- Villanueva, MO., Marquina, AD., Serrano, RB., Abellán, GB. 2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition *Int J Food Sci Nutr.* 53(3): 217-224., doi.org/10.1080/09637480220132832.
- Warraich, YA., Hussain, F., Kayani, HUR. 2020. Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling *Heliyon.* 6(5): E04107., doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107
- Yang, Y., Zhang, JL., Zhou, Q., Wang, L., Huang, W., Wang, RD. 2019. Effect of ultrasonic and ball-milling treatment on cell wall, nutrients, and antioxidant capacity of rose (*Rosa rugosa*) bee pollen, and identification of bioactive components *J Sci Food Agric.* 99(12): 5350-5357., doi.org/10.1002/jsfa.9774.

BAL ARISI ZEHRİNİN KOMPOZİSYONUNU VE ÜRETİM MİKTARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Factors Affecting the Composition and Production Amount of Honey Bee Venom

Tuğçe ÇAPRAZLI^{1*}, Meral KEKEÇOĞLU²

^{1*}Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğal, Bitkisel, Kozmetik Ürünler Bölümü, Düzce, TÜRKİYE, ORCID No.: 0000-0001-9109-0969, Yazışma Yazarı / Corresponding Author: e-mail: tcaprazli@gmail.com

²Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Düzce, TÜRKİYE.

²Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi (DAGEM), Düzce, TÜRKİYE. ORCID No.: 0000-0002-2564-8343 e-mail: meralkekecoglu@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 22.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 14.04.2021

DOI: 10.31467/uluaricilik.901279

ÖZ

Bal arısı zehri (BAZ) diğer adı ile apitoksin, bal arısı (*Apis mellifera* L.)'nin koloni savunmasında kullanılmaya başlanılan proteini ve peptid açısından zengin bir dış salgı ürünüdür. Apitoksin zengin kimyasal içeriği nedeniyle kozmetik ve sağlık alanında özellikle apiterapide oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Apiterapide amaçlanan başarının elde edilmesi kullanılan ürünlerin nitelik ve niceliğiyle doğrudan ilişkilidir. Bu sebeple apiterapi amaçlı kullanım söz konusu olduğunda ham madde üretiminden son ürüne kadarki sürecin kontrollü ve kalite standartlarına uygun yapılması büyük önem taşımaktadır. Türkiye’de bal arısı zehrinin ticari üretimi son günlerde gündeme gelen bir konudur. Bu nedenle gerek zehir üretim miktarı gerekse zehrin içerik bakımından kalitesini etkileyen faktörler konusunda tartışmalar mevcuttur. Bu derlemede bal arısı zehrinin içeriğini ve üretim miktarını etkileyen faktörleri belirlemek için yapılan önceki çalışmalar taranarak bu tartışmalara çözüm önerileri oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmalarda bal arısı zehrinin üretiminde kullanılan cihazların, zehir toplama cihazının kovandaki konumunun, hasat periyodu ve hasat saatinin, mevsimsel değişimin, bal arısı ırkı ve davranışlarının, arı yaşının ve depolama koşullarının zehir miktar ve kalitesi üzerine etkisi ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Ayrıca zehir toplamanın koloni performansı ve davranışı üzerine etkisi de araştırılarak detaylı bilgi verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelime: Apitoksin, bal arısı zehri, doğru üretim, teknik, kalite

ABSTRACT

Honey bee venom (BAZ), also known as apitoxin, is a protein and peptide-rich external secretion produced by the honey bee (*Apis mellifera* L.) for use in colony defense. Due to its rich chemical content, apitoxin has widespread use in cosmetics and health, especially in apitherapy. Achieving the intended success in apitherapy is directly related to the quality and quantity of the products used. For this reason, when it uses for apitherapy treat, it is crucial that the process from raw material production to the end product is controlled and in accordance with quality standards. The honey bee venom production is a newly emerged product for commercial production in Turkey. For this reason, there are debates about the factors affecting the quality of the venom in terms of both the amount of production and the composition of the venom. In this review, it is aimed to create solutions to these

discussions by searching the previous studies conducted to determine the content of honey bee venom and the factors affecting the production amount. In the studies, the effects of the devices used in the production of honey bee venom, the site of the venom collection device in the hive, the collection period and collection time, seasonal change, honey bee race and behavior, bee age, and storage conditions on the amount and quality of the venom were discussed in detail. In addition, detailed information was aimed to be given by investigating the effect of venom collection on colony performance and behavior.

Key Word: Apitoxin, honey bee venom, good production, technique, quality

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Honey bee venom (HBV), also known as apitoxin, is secreted from the venom gland in the abdominal cavity of the bees and injected into the target with a needle apparatus. Bees use their venom to protect their colonies against their enemies. They sacrifice their lives by leaving their needles and venom glands in the target to be able to inject more venom. The composition of honey bee venom contains special components that attack the cell wall structure or affect the nervous system in order to cause inflammation in the target organism. The most important of these ingredients are phospholipase A₂ (12-20%), which are important allergens of venom components, apamin (2-3%) and melittin (40-50%) which is specific to honey bee venom. Besides these well-known components honey bee venom also contains; hyaluronidase (1-2%), MCD peptide (2-3%), adolapin (0.5-1%), histamine (0.5-2%), dopamine (0.2-1%) and noradrenaline (0.1-0.5%) and more. The production of honey bee venom, which usage area in health and cosmetics is growing rapidly and gaining importance, has therefore become particularly important. Honey bee venom high purity and quality is critical for therapeutic purposes use. High quality and purity are possible with the application of good production techniques and storage conditions. Considering the studies conducted so far, it has been determined that machinery equipment used in honey bee venom production as well as in the production of other bee products, conscious colony maintenance and management, feeding, the season of production and storage conditions are the main factors affecting the production amount and quality of venom. With this review, it is aimed to eliminate the confusion about the factors affecting the correct production and quality of honey bee venom and to bring together the basic information that can be used in production standardization.

The aim of this study is to compile the studies done so far to reveal the production factors affecting the quality of bee venom; To determine the deficiencies and to ensure that new studies are planned to determine the factors affecting production.

Discussion: Considering the studies in the literature, the content and amount of the collected honey bee venom may vary according to the region, harvest season, honey bee race and supplementary feeding factors. Given the influence of regional and racial factors, it is regrettable that there is limited information on *Apis mellifera anatoliaca* and is an important literature gap.

Conclusion: Honey bee venom has been used for centuries for its therapeutic effect and is considered an important bee product with the pharmacological potential to transform into a medicinal product. There are scientific recommendations regarding the use of honey bee venom and specific components in its content, as well as many honey bee products regarding the SARS CoV-2 virus, and its potential use continues to be investigated. Honey bee venom has recently been used in many different forms, both in cosmetics and healthcare. Depending on these areas of use and products, there is a need for quality honey bee venom in the Cosmetics and Health sector.

Good honey bee venom production; can be done with standardized bee venom collection device, correct application techniques, correct colony management and maintenance, production under hygienic conditions and correct storage methods. The most important part for beekeepers is to apply the correct production techniques by participating in the training prepared jointly by ministries and universities. Based on the Honey Bee Venom Standards presented by the Turkish Standards Institute and in the light of the researchers, Anatolian honey bee venom production, content, analysis, and storage conditions should be standardized, and a quality categorization based on venom quality

should be established. For this reason, the rules and requirements regarding production should be studied with the commissions composed of ministry officials and academicians, and the Turkish Honey Bee Venom Production Notification should be published as soon as possible. In addition to all these, detailed studies need to be made regarding the production and content analysis of honey bee venom produced in Anatolia and Anatolian bee venom standards should be established.

GİRİŞ

Apitoksin olarak da bilinen bal arısı zehri, arıların karın boşluğunda bulunan zehir bezlerinden salgılanan bir dış salgı ürünüdür. Zehir bezleri asit bez (zehir bezi) ve alkalın bez (Dufour bezi) adı verilen dış salgı bezlerinden oluşur. Arıların kolonilerini savunmak için kullandığı protein ve peptid ağırlıklı bu dış salgı ürünü iğne aparatı ile hedefe enjekte edilir. Zehir bezinden zehir kesesine arı zehri salgılayan spesifik salgı hücreleri bulunur. Zehir kesesinde toplanan bal arısı zehri iğneleme esnasında iğne içerisinde bulunan zehir kanalına ve bu sayede hedef canlıya iletilir. Dufour bezi ise iğnenin dip kısmında bulunan, iğnenin lansetleri arasına açılan, alkalın yapıda özel bir dış salgı bezidir. Dufour bezi iğneleme esnasında zehir kanalına iletilen salgısı ile iğnenin kayganlaşmasını ve nötralize olmasını sağlar aynı zamanda zehir içerisine ilettiği alarm feromonları ile koloniyi tehlikeye karşı uyarır (Genç ve Cengiz 2019). İşçi bal arılarında bulunan zehir miktarının 3-4, µl arasında olduğu tahmin edilmektedir. Zehir kesesinde bulunan tüm zehri elde etmek zordur ve ortalama 0,5-1,0 µl zehir elde edilebilir. BAZ %88' i sudur ve bu nedenle her arıdan yalnızca 0,1 µg kuru zehir elde edilebilir. Bu bilgilere göre 1 gr kurutulmuş zehir üretmek için 10.000 arı sokması gerekir (Hider 1988).

Arılar zehrini düşmanlarına karşı kolonilerini koruma amacı ile kullanılırlar. Hatta daha fazla zehri enjekte edebilmek amacı ile iğnelerini ve zehir bezlerini hedef canlıda bırakarak hayatlarını feda ederler. Hedef canlıda enflamasyon oluşturabilmek amacı ile zehir kompozisyonunda hücre çeper yapısına saldıran ya da sinir sistemini etkileyen özel bileşenler bulunmaktadır (Bogdanov 2015, Kokuludağ, 2015). Bu bileşenlerden en bilinenleri zehir bileşenlerinin ana alerjenlerinden olan fosfolipaz A₂ ve bal arısı zehrine has olan apamin ile melittindir (Bogdanov, 2015).

Bal arısı zehri (BAZ) yüzyıllardır terapötik etkisi sebebiyle kullanılmaktadır. BAZ farmakolojik olarak ilaç olma potansiyeline sahip önemli bir arı ürünü olarak değerlendirilmektedir (Bogdanov 2015, Abdela ve Jilo 2016). Günümüzde oldukça popülerite kazanan geleneksel ve tamamlayıcı tıp dallarından biri olan "Apiterapi"de de bal arısı zehri; romatoid artrit, osteoartrit, kronik ağrı gibi otoimmün ve/veya enflamatuvar hastalıkların tamamlayıcı tedavisinde kullanılmaktadır (Bogdanov 2015). Ayrıca multipl skleroz (MS), amyotrofik lateral skleroz (ALS), parkinson ve alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır (Hwang vd., 2015). Bal arısı zehrinin akne, alopesi, atopik dermatit, melanom, morfea, fotoyaşlanma, sedef hastalığı, yaralar, kırışıklıklar ve vitiligo dahil olmak üzere cilt hastalıklarında da terapötik uygulamaları bulunmaktadır (Kim vd., 2019). Ek olarak, bal arısı zehrinin antitumör, radyoprotektif, antinosiseptif, antiinflamatuvar ve antikanser etkileri de bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (Varanda ve Tavares 1998, Lee vd., 2004, Son vd., 2007, Gajski ve Garaj -Vrhovac 2009). SARS CoV-2 virüsü ile ilgili de birçok bal arısı ürününün yanında bal arısı zehri ve içeriğindeki spesifik bileşenlerin kullanımına dair bilimsel öneriler bulunmaktadır, potansiyel kullanımı araştırılmaya devam edilmektedir (Kasozi, vd., 2020, Lima vd., 2020, Shaldam vd., 2020, Oluwaseyi, Alebiosu 2020).

Sağlıkta ve kozmetikte kullanım alanı hızla büyüyerek önem kazanan BAZ'ın üretimi de bu sebeple oldukça önem kazanmıştır. Özellikle tedavi amacı ile kullanılacak olan bal arısı zehrinin yüksek saflıkta ve kalitede olması kritik önem arz etmektedir. Bu da doğru üretim tekniklerinin uygulanmasıyla mümkündür. Şimdiye kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, diğer arı ürünlerinin üretiminde olduğu gibi zehir üretiminde de kullanılan makine, teçhizat, bilinçli koloni bakım ve yönetimi, besleme, üretimin yapıldığı sezon ve depolama koşullarının bal arısı zehri üretim miktarı ve kalitesini etkileyen faktörlerin başında geldiği belirlenmiştir (Krell 1996, Ferreira Junior vd., 2010, Sanad ve Mohanny 2013, Bogdanov 2016, Serrinha vd., 2019). Bu çalışmanın amacı, şimdiye kadar yapılan çalışmaları derlemek, bal arısı zehrinin kalitesini etkileyen üretim faktörlerinin ortaya konması ve yeni çalışmalara ışık tutmaktır.

DERLEME / REVIEW

Bal arısı zehri kompozisyonu ve kullanılan analiz yöntemleri

Bal arısı zehrinin içeriği, zehrin kalitesini ve apiterapötik değerini belirlediğinden içeriğinin belirlenmesi ve doğru analiz yöntemlerinin doğru ve standardize metotlar ile yapılması da önemlidir. Bal arısı zehri içeriğinde peptid (%40-50 melittin, %2-3 apamin, %2-3 MCD peptid, %0.5-2 secapin, %1-3 pamin, %2 minimin, %0.5-1 adolapin, %1-2 procamin A,B, %0.1-0.8 proteaz inhibitörü, %1-2 tertiapin, kardiaoep, melittin F), protein (%10-12 fosfolipaz A₂, %1 fosfolipaz B, %1-2 hiyaluronidaz, %1 fosfataz, %0.6 α– Glukozidaz), biyojenik aminler (%0.5-2 histamin, %0.2-1 dopamin, %0.1-0.5 noradrenalin), fosfolipitler (%1-3), aminoasitler (%1 aminobütirik asit, α-amino asitler), şekerler (%2-4 glikoz, früktoz), feromonlar (%4-8 kompleks eterler) ve mineraller (%3-4 P, Ca, Mg) bulunmaktadır (Hider 1988; Bogdanov, 2015).

Bal arısı zehri içeriğini belirleme amacı ile HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF gibi ileri analiz yöntemleri kullanılmıştır (Pacakova ve vd., 1995; Kokot ve Matysiak, 2009; Rybak-Chmielewska ve Szczêsna, 2004, Ferreira Junior vd., 2010, Samancı 2019; Zhang, 2019). Tüm yöntemler arasında en yaygın kullanılan analiz yöntemi HPLC-UV (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole) ile uygulanan yöntemdir. HPLC-UV analizi ile BAZ' ın kalitesi için belirteç olarak öne sürülen apamin, melittin, fosfolipaz A₂ maddeleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilmektedir.

Bal arısı zehri ile ilgili özel firmaların kendi ürün talepleri doğrultusunda oluşturdukları standartlar dışında literatürde Bogdanov (2016) tarafından önerilen genel bir standart bulunmaktadır. Bu standart bal arısı zehrinin organoleptik özelliklerinin tipik karakterde (sarımsı-kahverengimsi renkte, toz kristalize yapıda) olması gerektiği, su içeriğinin %2'den yüksek olmaması, suda çözünmeyen madde miktarının %0,8'den, şeker içeriğinin ise %6,5'ten düşük olması, hiyaluronidaz, fosfolipaz, melittin ve proteaz inhibitörlerin biyolojik aktivitesinin yeterli seviyede bulunması, toksik doz olan LD₅₀ dozunun 3,7±0,6 mg/kg olması önerilmektedir. Aynı çalışmada, Rus standardı olarak öne sürülen standartlarda bal arısı zehrinin organoleptik özelliklerinin tipik karakterde, su içeriğinin %12'den düşük, suda çözünmeyen madde miktarının %10'dan düşük, hemoliz süresinin 480 saniyeden az, fosfolipaz aktivite ünitesinin 100'den az ve hiyaluronidaz aktivitesinin 70'ten yüksek olması

gerektiği belirtilmiştir. Bunların dışında, Türk Standartları Enstitüsü (TSE) 2005 yılında içerik, analiz yöntemi ve cihaz ile ilgili ayrıntılı bir standart oluşturmuştur. TSE standardına göre; kuru bal arısı zehri numunelerinin içeriği melittin, kuru maddede %40-50 (m/m), apamin, kuru maddede %1-3 (m/m), fosfolipaz A₂, kuru maddede %10-12 (m/m), MCD peptid 401, kuru maddede %2-3 (m/m), glikoz+früktoz, kuru maddede %2-6 (m/m), 4,5-5,5 pH olması gerektiği belirtilmiştir. Samancı (2019), apamin, melittin ve fosfolipaz A₂ içeriği dışında nem ve şeker karakterizasyonunu incelemiş, glikoz içeriği yüksek bulunan ticari bir örneğin içeriğinde taşıdığı olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu sebeple, standardizasyonda melittin, apamin, fosfolipaz A₂, nem ve şeker analizi yapılması, bunun yanında organoleptik özellikler için de standartlaşmaya gidilmesi önerilmektedir.

Bal Arısı Zehri Üretiminde Kullanılan Cihazların Koloni ve Zehir Üretimi Üzerine Etkisi

Bal arısı zehrinin tıp ve kozmetik alanlarında kullanımına bağlı olarak üretimine yönelik talepler gittikçe artmaktadır. Bu nedenle bilim insanları ve arıcular yüksek verim ve kaliteli ürün üretimine yönelik birçok yöntem ve cihaz geliştirmektedirler. Bal arısı zehrinin doğrudan arının kendisinin istenen bölgeyi sokturulması yolu ile tedavide kullanımı yüzyıllar öncesinden beri bilinmektedir. Günümüzde bu kullanım şekli halen devam etmektedir (Bogdanov 2015). Daha sonra arıların zehir keseleri diseksiyon yolu ile alınarak içerisindeki zehir elde edilme yöntemi kullanılmıştır (Krell 1996). Daha sonraları sürdürülebilir koloni sağlığı, arı yaşamı, ürün miktarı ve ürün kalitesine öncelikli olarak odaklanılmış ve arı yaşamına zarar vermeden hasat yapılacak bal arısı zehri hasat cihazları geliştirilmiştir. İlk kez 1954 yılında Alman araştırmacılar Markovic ve Molnar bal arısı zehrini toplamak amacı ile elektroşok yöntemini kullanmışlardır. Ürettikleri cihaz; kovan giriş deliği önüne konulan, üzerinde elektrik iletilecek olan telleri bulduran iki adet silindirden ibaret ve tellerin altına deneme amacı ile konulan plastik ve filtre kâğıdı gibi materyallerden oluşmaktadır (Benton vd., 1963). Bu yöntem arıların sert yapıda olan plastik ve filtre kâğıdında iğnelerini bırakarak ölmeleri ayrıca kullanılan materyallerin pürüzlü yüzeylerinden dolayı zehrin toplanmasını zorlaştırması sebebiyle uygun bulunmamıştır. Fakat şu anda kullanılan arı zehri toplama cihazlarının temel taşı olan elektrik şoku-uyarısını literatüre kazandırmıştır. Bu aşamadan sonra elektrik uyarısı ile arı zehri toplama temeline

dayanan birçok farklı cihaz geliştirilmiştir. Örneğin Fuji'de Miao (1983), Portekiz'de Nobre (1990), ABD'de, Brandeburgo (1992) bu amaçla benzer modifikasyonlarda cihazlar tanımlamışlardır. Benton (1963) tarafından geliştirilen cihaz en fazla modifiye edilen ve kullanılan cihaz olma özelliği taşımaktadır. Cihazlar, üzerinde arılar maruz kaldığında onları öldürmeyecek nitelikte, elektrik iletkenliği yüksek teller bulunan ve arıların soktuğu zaman iğnelerini kaybetmeyecekleri ve zehirlerini üzerine akıtabilecekleri cam plakadan oluşmaktadır. Polonya'da Rybak vd., (1995), kovan katına yerleştirilmiş ve çerçevesinde her 5 mm'de bir monte edilmiş olan elektrotlardan geçen bir elektro uyarıcıdan (jeneratör) oluşan arı zehri toplama aparatı tarif etmişlerdir. Çerçeveler üzerinde zehrin toplanacağı cam plakalar bulunur. Cam plakalar arıların iğnesini kaybederek ölmelerine engel olması ve kazıma sırasında-kalıntı bırakmaması nedeniyle en az kayıpla zehir hasadına imkan sağlamaktadır. Mohanny (2015), Mısır'da gerçekleştirdiği çalışmada üç farklı cihaz modifikasyonu kullanmıştır; 1) 0,5 cm aralıklı paralel bakır teller (52 cm uzunluk*42 cm genişlik*1,5 cm sıklık) altına şeffaf cam tabla (45 cm uzunluk*25 cm genişlik) yerleştirilmiş, 2) Langstroth çerçeve (45,5 cm uzunluk*23 cm genişlik*5 cm sıklık) iki taraftan teller ile desteklenmiştir. Tel ızgaraların iki yüzünün altına şeffaf cam plakalar (33 cm uzunluk*17 cm genişlik) konulmuş, 3) Ahşap çerçeve (56 cm uzunluk*36cm genişlik*1,5cm sıklık) tellerin altında yine şeffaf cam tabla (45 cm uzunluk*25 cm genişlik) tercih edilmiştir. Bu üç farklı cihazda tablalar şeffaf cam, mavi cam ve ayna olarak iç gruplara ayrılmıştır. Çalışma sonucunda 3. gruptan elde edilen zehir miktarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu, en yüksek verimin aynada, en düşük verimin ise mavi cam tablada elde edildiği bildirilmiştir. Fakat ölü arı sayısı incelendiğinde, en yüksek ölüm oranı ayna tablada gözlemlenirken en düşük ölüm oranı mavi cam tablada gözlemlenmiştir. Uyarıcı frekansı ve etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, arıların farklı frekanslara verdiği tepkinin değiştiği, en etkin frekansın 112 Hz. olduğu tespit edilmiştir (Maulana vd., 2018). Son dönemlerde kablosuz, pilli ya da güneş enerjisi ile çalışan ve arıların koloni içi iletişimde kullandıkları frekans (Hz) aralıklarını hedef alan cihazlar da gündeme gelmektedir. Ayrıca zehrin kalitesini ve saflığını arttırabilmek amacı ile kullanılan cam tablanın üzerine streç film, plastik polietilen vb. materyallerle sarma da söz konusudur (Fakhim 1998, Bahreini vd., 2000, Sanad ve Mohanny 2013). Genel olarak literatürde bal arısı

zehri toplama cihazları için tavsiye edilen değerler; 50-1000 Hz. uyarı frekansında, uyarı süresi 3-6 sn., voltaj aralığı 12-30V ve 1 Amper olan paslanmaz teller arası mesafe 5 mm olmasıdır (Rybak vd., 1995, Bogdanov 2016; Maulana vd., 2018). Online mecrada arıcıların kendi deneyimleri ile oluşturduğu bilimsel temellere dayanmayan metotlar da bulunmaktadır. Zehir toplama işlemi esnasında kovan üzerini plastik şeffaf kubbeler ile örtmek ya da arılara farklı müzikler dinletmek başvurulan bu tarz yöntemlere örneklerdir.

Doğru ve kaliteli BAZ üretimi için öncelikle doğru zehir toplama cihazı tercih edilmelidir. Günümüzde birçok internet sitesinden arı zehri toplama cihazı satın alınabilmektedir. Fakat ülkemizde maalesef bu konuda bir standartlaşmaya ve kontrole gidilmemiştir. Koloni sağlığının korunması ve verilen emeklerin boşa gitmemesi için acilen bu konuda standartlar getirilmeli, cihaz üreticileri sertifikalı, denetli ürünler ile sektöre girmelidir.

Uygulama Teknikleri

Bal arısı zehrini koloniye zarar vermeden, yüksek miktarda ve yüksek kalitede elde edebilmek amacıyla aşağıdaki alt başlıklarda ayrıntılı olarak verildiği üzere birçok farklı yöntem bilimsel olarak araştırılmıştır.

Cihazın kovandaki konumu

Arı kovanının içine yerleştirilen toplayıcılar, kovanın içinde veya kovanın üzerini örtecek şekilde kullanılabilir (Robson 1988, Bogdanov 2015). Bu tür cihazlar, faaliyetlerini sürdürürken daha fazla sayıda arı ile temas halinde olabileceğinden, kovan dışı toplayıcılardan daha yüksek miktarda zehir toplama kapasitesine sahiptir. Kovanda tabana yerleştirilen toplayıcılar arıların atıklarıyla kirlenmeye maruz kaldıklarından dolayı tavsiye edilmemektedirler (Han vd., 2007). Öte yandan, ballık üzerine yerleştirilen ya da çerçeve şeklinde olanlar, daha düşük kontaminasyon riskine sahiptir (Robson 1988, Serrinha vd., 2019). Kovan dışı üretimde tarlacılık faaliyetlerinden dönen bal midesi ve polen kesesi ürünle dolu arının elektrik ile uyarılmasının arıda kasmaya sebep olma ve polenin cam tablaya dökülme ihtimali sebebiyle kontaminasyon riski artabilmektedir. Fakat kovan içi üretimde bu risk kovan dışına göre daha düşüktür. Ayrıca, kovan dışında tek tabla ile üretim yapılabilirken kovan içi üretimde birden fazla tabla kullanılabilirken, bu da ürün miktarında artışa neden olmaktadır.

Uygulama periyodu

Rybak vd., (1995), cihazın aktif periyodunu 1 saat tutarak 14 günde bir hasat yaparken, Bahreini vd., (2000) ise 3 sn aktif/ 7 sn pasif olarak totalde bu 10 saniyelik döngüyü 5 dk boyunca sürdüren bir cihaz ile 15 günde bir uygulama yaparak çalışmışlardır. Galuszka (1972), en verimli toplama döngüsünün 2-3 haftada bir 15 dakikalık üç stimülasyon olmasını önermiştir (Bellik 2015). Genel olarak, zehrin kalitesini korumak ve koloniyi olabildiğince az yormak amacı ile cihazın 15-20 dk kovan içerisinde bırakıldığı ve 10-15 gün ara ile hasat işleminin tekrarlandığı yöntem çoğunlukla tercih edilmektedir.

Üretim saati

Bal arısı zehri üretiminde farklı saatlerde yapılan uygulamalara yönelik çalışmalar, elde edilen ürün miktarlarında ciddi farklılıklar olabileceğini göstermiştir. Mısır'da yapılan bir çalışmada en yüksek miktarda zehrin 16:00-18:00 arasında elde edildiği (0,166 g/gün), bunu sırasıyla 04:00-06:00 (0,118 g/gün), 09:00-11:00 (0,099 g/gün) ve 13:00-15:00 (0,080 g/gün) saat aralıklarının takip ettiği bildirilmiştir (Sanad ve Mohanny 2013). Çalışmada, cihaz üzerinde ölü olarak bulunan işçi arı sayıları da incelenmiş, en çok ölümün 04:00-06:00 (51,24 ölü arı/gün) ve 16:00-18:00 (49,32 ölü arı/gün) saatleri arasında olduğu ortaya konmuştur. Mısır'da İtalyan arısı (*A. m. ligustica*) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada, en yüksek miktarda zehrin 19:00-21:00 saatleri arasında toplandığı tespit edilirken, bunu 10:00-12:00 ve 15:00-17:00 saatleri sırasıyla takip etmiştir. Ölü arı sayıları incelendiğinde ise; en yüksek ölümün 19:00-21:00 (70 ölü arı/koloni) saatleri arasında olduğu ve bunu takiben sırasıyla 10:00-12:00 (65 ölü arı/koloni) ve 15:00-17:00 (62 ölü arı/koloni) saatlerinin geldiğini belirlenmiştir. Araştırmacılar akşam saatlerindeki ölüm ve hasat miktarındaki artışın tarlacı arıların kovana dönmesi ile kovadaki popülasyon yoğunluğunda artışın bir sonucu olabileceğini vurgulamışlardır (Nowar 2016). Mevcut bilgiler ışığında, koloninin tamamının kovan içerisinde bulunduğu akşam saatlerinde zehir toplama işlemi yapıldığında daha fazla miktarda zehir elde edilebileceği anlaşılmaktadır. Ancak araştırmacıların eksik bıraktığı nokta, zehrin farklı saatlerin kalitesi üzerindeki etkisini belirlememiş olmalarıdır. Kekeçoğlu vd., (2021) Düzce şartlarında Düzce/Yığılca ekotipi (*Apis mellifera anatoliaca*) üzerine yaptıkları çalışmada, zehir toplama saatine göre zehir içeriğinde bulunan apamin, melittin ve

fosfolipaz A₂ içeriklerinin istatistiki bakımdan önemli düzeyde değişmediğini bildirmişlerdir.

Zehir Toplanan Kolonilerde Besleme Etkisi

Bal arısı zehri, bal arılarının kendilerini düşmanlarına karşı koruyabilmek için kullandıkları bir dış salgı ürünüdür. Bal, polen ve propolis gibi ürünler hem arıya hem de bitki florasına doğudan bağlı iken zehir, arı sütü ve bal mumu gibi dış salgı bezi ürünleri floraya dolaylı yoldan yani beslenme üzerinden bağlıdır. Arı sütünde olduğu gibi (Li, 2000), zehirde de beslenmeye bağlı değişimler gözlemlenebilmektedir; Mısır'da Karniyol (*Apis mellifera carnica*) hibrit kolonileri üzerinde elektroşok yöntemi ile yapılan bir çalışmada, zehir hasadından 10 gün önce bira mayası, soya fasulyesi veya doğal polen ile beslemeler yapılmış, böylece farklı protein kaynaklarının BAZ' ın hasat miktarı üzerine etkisini araştırılmıştır. İki yıl boyunca her iki sezonda da arı zehrinde en yüksek verimin 1,661 mg/koloni ile polen yem uygulamasının sağladığı tespit edilmiştir. Buna göre; doğal polenin en yüksek verimi sağlayan besleme yöntemi olduğunu, bunun sebebinin ise esas olarak kasların, bezlerin ve diğer dokuların yapısal elemanlarını sağlaması olduğu belirtilmiştir (Badawy vd., 2016). Mısır'da İtalyan bal arısı (*Apis mellifera ligustica*) kolonileri üzerinde elektriksel uyarı cihazı ile yürütülen bir başka çalışmada kolonilere şeker şurubu ve polen ikamesi (Soya fasulyesi unu, toz maya ve pudra şekeri (0,5: 0,5: 2)) karışımı olmak üzere iki farklı besleme uygulanmıştır. Çalışma sonucunda polen ikamesi ile beslenen kolonilerde zehir bezi ve kesesinin olumlu etkilendiği ve daha yüksek miktarda zehir ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca toplanan arı zehrinin HPLC analizinden elde edilen sonuçlar, bal arısı kolonilerinin polen ikamesi ile beslenmesi sonucu ana bileşenlerinin (melittin, fosfolipaz A₂ ve apamin) yüzdelerinin arttığını göstermiştir (Nowar, 2016). *A. cerana*' nın zehir kalitesi üzerine farklı karbonhidrat kaynaklı, protein takviyeli diyetlerin karşılaştırmasının yapıldığı çalışmada farklı şeker kaynakları (maltoz, früktoz, glikoz), şeker (suda 1:1 sakkaroz), protein karışımı (3:1:1 oranında soya fasulyesi unu, kuru maya ve kuru yağsız süt) ve kontrol olarak doğal çiçek nektarı beslemesi uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmada, tamamlayıcı karbonhidrat diyeti ve protein bakımından zengin alternatif arı diyetinin arı zehrinin kalitesi üzerinde önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir. Glikoz ve früktozla beslenen arıların zehrindeki melittin, fosfolipaz A₂ ve apamin konsantrasyonu daha düşük bulunurken, maltozla beslenen arıların zehrinin

kalitesi doğal beslenen bal arılarından toplanan zehre yakın bulunmuştur. Protein açısından zengin diyetle beslenen arılardan elde edilen zehrin melittin, fosfolipaz A₂ ve apamin konsantrasyonlarının, doğal beslenen ve sükröz içerikli diyetle beslenen arılarınkine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Abusabbah vd., 2016). Tüm bu çalışmaların sonucunda, doğru ek beslemenin bal arısı zehrinin içeriğini ve miktarını doğrudan etkileyebildiği açıkça anlaşılmaktadır. Bu sebeple, zehir hasadı yapılacak olan kolonilerden polen toplanmamalı ve gerekli ise doğru içerikli ön beslemeler düzenli olarak yapılmalıdır.

Zehrin İçeriği ve Miktarı Üzerinde Mevsimsel Değişim Etkisi

Mevsimsel değişimler; arıların kendi yaşam döngüleri, ulaşılabilir besin kaynaklarının değişimi ve ortam ısı ve nem değerlerinin değişiminden dolayı bal arısı zehrinin içeriğini ve miktarını etkileme potansiyeline sahip önemli parametrelerden biridir.

Sanad ve Mohanny (2013) tarafından Mısır'da yapılan araştırmada en yüksek zehir miktarının (0,0185 g/gün) ağustos ayında elde edildiği bildirilmiştir. Mısır'da İtalyan arı ırkı (*A. m. ligustica*) kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada elde edilen zehir miktarının mevsimsel faktörlere göre değiştiği, en verimli ayın mısır polenine ulaşımın artış gösterdiği temmuz ayı olduğu bildirilmiştir (Nowar 2016). Hussein vd., (2019), Mısır'da Karniyol (*A. m. carnica*) ve İtalyan ırklarını (*A. m. ligustica*) kullanarak iki farklı bölgede yaptığı çalışmada Nasr Bölgesinde en yüksek miktarın (99,9 mg/koloni) ile mayıs ayında ve en az miktarın (11,1 mg/koloni) ile ekim ayında; Motobes bölgesi koşullarında ise en yüksek zehir hasadını (102,5 mg/koloni) haziran ayında ve en az miktarda zehir hasadını ise (60,2 mg/koloni) ile kasım ayı sonunda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca El-Bassiony vd., (2016)'nin Mısır'da yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlar, Bachmayer vd., (1972) ve Mohanny (2005)'nin çalışmaları ile uyumlu olarak koloninin aktif olduğu zaman periyodu olan ilkbahar ve yaz mevsimlerinin bal arısı zehri toplamak için en iyi aralık olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak araştırmacılar bu durumun koloninin besin ihtiyacını karşıladığı nektar ve polen durumu ile bir ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Bal arısı zehrinin kompozisyonu üzerine mevsimsel parametrelerin etkisi araştıran çalışmalar da mevcuttur. Owen ve Sloley (1988) tarafından İtalyan arısı (*A. m. ligustica*) kullanılarak ve diseksiyon

yöntemi ile zehir hasadı yapılan çalışmada, zehir içeriğindeki serotonin (5-hydroxytryptamine) miktarının temmuz ortasında en yüksek değerlere ulaştığı belirlenmiştir. Owen ve Praff (1995), diseksiyon yöntemi ile elde edilen zehir içeriğinde melittin oranının yaz boyunca değişim gösterdiğini ve yedi günden büyük herhangi bir yaşta bir arıda melittin seviyesinin haziran başında ağustos ortasına göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Rybak-Chmielewska ve Szczensna (2004) çalışmalarında farklı mevsimlerde elektroşok yöntemi ile hasat edilen BAZ örneklerinde melittin bileşeni için önemli ölçüde farklılık tespit ederken, fosfolipaz A₂ ve apamin için fark bildirmemişlerdir. Ferreira Junior vd., (2010), belirgin bir iklim parametresiyle belirli bir bağlantı olmaksızın melittin ve fosfolipaz A₂'nin mevsimsel değişimlerden etkilendiğini tespit etmişlerdir. Kekeçoğlu vd., (2021) Anadolu bal arısı ile haziran-ağustos ayları arasında Düzce'de yaptıkları çalışmada, mevsimsel değişimlerin apamin, melittin ve fosfolipaz A₂ üzerinde istatiki olarak önemli bir etkisi olmadığını tespit etmişlerdir. Önceki çalışmalar ve son yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, doğru bakım ile aktif sezon içerisinde herhangi bir dönemde kaliteli zehir üretebilmek mümkün gözükmemektedir.

Bal Arısı Irkı ve Davranışlarının Zehir Kalitesi ve Üretim Miktarı Üzerine Etkisi

Böcek zehirlerinin farmakolojik benzerliklerinin aksine, biyokimyasal yapıları farklı taksonlar arasında önemli ölçüde farklılık gösterir. Bal arıları, yaban arıları ve karıncalar gibi farklı familyalara ait zar kanatlılardan (Hymenoptera) elde edilen fosfolipazlar çok farklı moleküler ağırlıklara sahiptir ve spesifik aktiviteleri de farklılık gösterebilmektedir. Tüm zar kanatlıların (Hymenoptera) zehri küçük, oldukça temel ve ağrıya neden olan peptitler içerir. Bu algojenik peptitler, farklı türlerin zehirleri arasında neredeyse hiçbir yapı benzerliği göstermez (Ali 2012). Bu peptitler arasında apamin ve melittin bal arısı zehrinin ayırt edici bileşenlerindedir.

Apis türlerinden elde edilen zehirler içerik bakımından farklılıklar göstermektedir. Benton ve Morse (1968) tarafından bildirildiği üzere, *Apis cerana* zehrinin toksisitesi, *Apis mellifera*'dan iki kat daha yüksektir (Ali 2012). Kumar ve Devi (2014) ve Kumar vd., (2014), farklı türlerde zehir bezi ve zehir kesesi salgısının bileşiminde önemli farklılıklar olduğunu gözlemlemişlerdir. En yüksek oranda lipid, protein, asit fosfataz aktivitesi, glikoz, serbest amino asitler ve alkalın fosfataz aktivitesinin sırası ile *A.*

DERLEME / REVIEW

dorsata, *A. cerana*, *A. mellifera* ve *A. florea*'da bulunduğunu belirtmişlerdir. *Apis* türlerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada; melittin, tüm bal arısı zehirlerinin ana bileşeni olarak tespit edilmiştir. *A. dorsata*, *A. mellifera*, *A. florea* ve *A. cerana*'daki melittin içeriğinin sırasıyla $95,8 \pm 3,2$, $76,5 \pm 1,9$, $66,3 \pm 8,6$ ve $56,8 \pm 1,8$ olduğu belirlenmiş, *A. dorsata* zehrinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek tahrişi *A. mellifera* zehri sergilerken bunu sırasıyla; *A. cerana*, *A. dorsata* ve *A. florea* takip etmiştir (Somwongin vd., 2018).

Apis mellifera ırkları arasında zehir içeriğinin tespitine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. *A. m. lamarckii* ve *A. m. carnica* ırkları ile yapılan çalışmada melittin hemolitik testi, hyaluronidaz aktivitesi, fosfolipaz A₂ aktivitesi ve LD₅₀ değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *A. m. lamarckii* zehrinin biyolojik aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Zidan vd., 2018). Altı farklı *Apis mellifera* ırklarına ait zehirlerin biyolojik amin profilinin karşılaştırıldığı çalışmada, *A. m. ligustica* ve *A. m. ligustica*'dan arı sütü verimini arttırmak için ıslah edilmiş olan bal arısı kolonilerinden elde edilen zehir örneklerindeki histamin ve adrenalin oranının *A. m. anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* ve *A. m. carpatica* zehirlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek serotonin içeriği *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica*'dan ıslah edilen arılarda tespit edilmiştir. Zehir numunelerinin noradrenalin miktarı da ırklar arasında farklılık göstermiştir (Zhang vd., 2019).

Toplanan bal arısı zehri miktarı açısından ırklar üzerine yapılan çalışmalarda Hussein vd., (2019), *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* melezlerinin ve coğrafi bölgelerin bal arısı zehri üretimine farklı mevsimlerde etkisini araştırmışlar. Araştırmacılar karniyol (*A. m. carnica*) ve İtalyan (*A. m. ligustica*) kolonilerinden toplanan zehir miktarının sırasıyla 51,3 ve 44,8 mg/koloni olduğunu, iki bal arısı hibritinden toplanan kuru arı zehri miktarları arasında önemli bir fark gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Arılardan elde edilebilecek zehir miktarı ve arıların agresyonu (sokma davranışı) arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Arıların sokma davranışı ve elde edilen zehir miktarı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmada, düşünülen aksine sokma davranışı ile elde edilen arı zehri miktarı arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Omar 2020). Araştırmacılar bu sonuçları saldırgan kolonilerin zehir toplama esnasında tabla üzerinden

uzaklaşmasına bağlamışlardır. Bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılması ve detaylı bir şekilde sebeplerin incelenmesi gerekmektedir.

Arı Yaşının Zehir Üretimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi

Bal arılarında kovan içi görev dağılımı temel olarak yaşa göre değişmektedir. Bu değişim aslında arılardaki fizyolojik değişim ve gelişimlere dayanmaktadır. Bir günlük işçi arılarda daha az miktarda zehir bulunmaktadır (Gençay Çelemler 2018) fakat genel olarak bal arılarında zehir bezinin gelişimini tamamlamadığı ve en aktif olduğu evrenin 12-21 günlük olarak ifade edilir. Bunun sebebi ise zehir bezlerinin gelişimi ve olgunluk sürecidir. 22-45 günlük arılarda ise fizyolojik olarak *hypofaringeal* ve *mandibular* bezlerde salgı değişimi gerçekleşirken, zehir bezi de aktifliğini kaybetmemekle birlikte üretim potansiyelini düşürmektedir (Genç ve Cengiz 2019).

Bal arısı zehri içeriği üzerine arı yaşının etkisi birçok faktör ele alınarak incelenmiştir. Bachmayer vd., (1972), farklı yaştaki işçi ve ana arılarda zehir bezinde melittin ve onun öncülü olan pro-melittin sentezini araştırmışlardır. Pro-melittin sentezinde ve bunun melittine dönüşüm hızında yaş ile bağlantılı belirgin değişiklikler olduğu tespit edilirken, ana arılarda ilk günden itibaren tam kapasiteye yakın işlediğini belirlemişlerdir. İşçi arılarda pro-melittin üretiminin yavaş yavaş artarak 8. ile 10. günlerde maksimuma ulaştığını ve sonraki günlerde azaldığı belirlenmişlerdir. İşçi arılarda ilk iki gün boyunca sadece pro-melittin sentezi gözlenirken, melittine dönüşümü daha sonraki günlerde ortaya çıkmaktadır. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde ana arıda ilk günden itibaren melittin ve pro-melittin sentezinin aktif olmasının diğer ana arılar ile mücadelede zehrin kullanılacak olması ve işçi arılardaki değişimlerin ise fizyolojik gelişimleri ve görev dağılımları ile ilişki taşıyabileceği aynı çalışmada vurgulanmıştır.

Zehir içerisindeki histamin miktarı üzerine yapılan araştırmada ise 5 haftalık arılarda maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Owen ve Braidwood 1974, Owen vd., 1977). Bir diğer çalışmada yaşa bağlı hyaluronidaz aktivitesi incelenmiş ve arının tüm yaşamı boyunca sabit konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (Owen 1979). Histaminin ise en yüksek konsantrasyonuna işçi arının hayatının sonuna doğru ulaştığı belirlenmiştir (Owen vd., 1977). Zehir içeriğindeki dopamin ve noradrenalin (norepinefrin) miktarı da arı hayatının erken evresinde az miktarda bulunurken

yaş aldıkça artmakta ve 40 günlük yaştan sonra düşüş göstermektedir (Owen ve Bridges 1982). Serotonin miktarında da yaş ve mevsimsel ilişkili varyasyonlar belirlenmiştir (Owen ve Sloley 1988). Bal arısı zehrindeki fosfolipaz A₂ aktivitesi incelendiğinde ise yetişkin yaşamının ilk haftasında istikrarlı bir şekilde arttığı ve petek gözünden çıkıştan bir hafta ile 10 gün sonra maksimum enzim aktivite seviyelerine ulaşıldığı belirlenmiştir (Owen vd., 1990). Tüm bu çalışmalar incelendiğinde, zehir bileşenlerinin yaşa bağlı olarak değiştiği ve üretim aşamasında bu faktörün göz ardı edilmemesi gerektiği açıkça görülmektedir.

Zehir Toplamanın Koloni Üzerindeki Etkisi

Skubida vd., (1995), Polonya'da, farklı arı zehri toplama yöntemlerinin, toplanan zehir miktarı ve bunların kolonilerinin durumu ve kışlama performansı ve üretkenliklerine (bal, polen, balmumu) etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada sonucunda araştırmacılar zehir toplamanın koloni gücü, yavru yetiştirme, bal, polen ve balmumu üretkenliği üzerinde hiçbir olumsuz etki oluşturmadığını saptamıştır. Zhou vd., (2003), Çin'de arı zehri toplanmasının üç günde bir yapıldığında, larva kabul oranı, bal verimi ve arı sütü veriminin önemli ölçüde düştüğünü tespit etmişlerdir. Bununla birlikte zehir toplama, tek bir arı sütü gözünün ortalama çıktısı üzerine ve ana arının ovipozisyonu ve şeker tüketimi üzerinde önemli bir etkisi belirlenmemiştir. Haggag vd., (2015) *A. m. ligustica* ve *A. m. carnica* ırklarında zehir toplamanın bal depolama alanına etkisini araştırmıştır. Çalışmada, *A. m. carnica* kolonilerinden uygulama grubunda ortalama bal depolama alanı 435,8 inç² iken kontrol grubunda 460,2 inç² olarak belirlenmiştir. *A. m. ligustica*'da ise uygulama grubunda 317,9, kontrol grubunda ise 318,72 inç² olarak belirlenen bal depolama alanları arasında önemli düzeyde bir farklılık tespit edilmemiştir. Onari vd., (2016) ise zehir hasadının nisan, mayıs ve haziran aylarında kolonilerin açık larva alanı, temmuz ayında ise kapalı larva alanını olumsuz etkilediğini, fakat kolonilerin hijyenik davranışının zehir hasadından etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, çalışma yılı boyunca zehir hasadı yapılan

kolonilerden dokuzunun kovani terk ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın koşulları altında, zehir hasadının, kolonilerin hijyenik davranışını etkilemeksizin, yılın belirli zamanlarında koloni popülasyonunun gelişimini olumsuz etkileyebileceği sonucuna varmışlardır. Krivtsov ve Lebedev (1995), zehir hasadının kuluçka üretiminde ve bal veriminde yaklaşık %10-15'lik bir düşüşe sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanında, zehir toplama sezon başına 3-4 kez olacak şekilde daha seyrek yapılırsa arı performansının etkilenmeyeceği de bildirilmiştir (Bogdanov 2016).

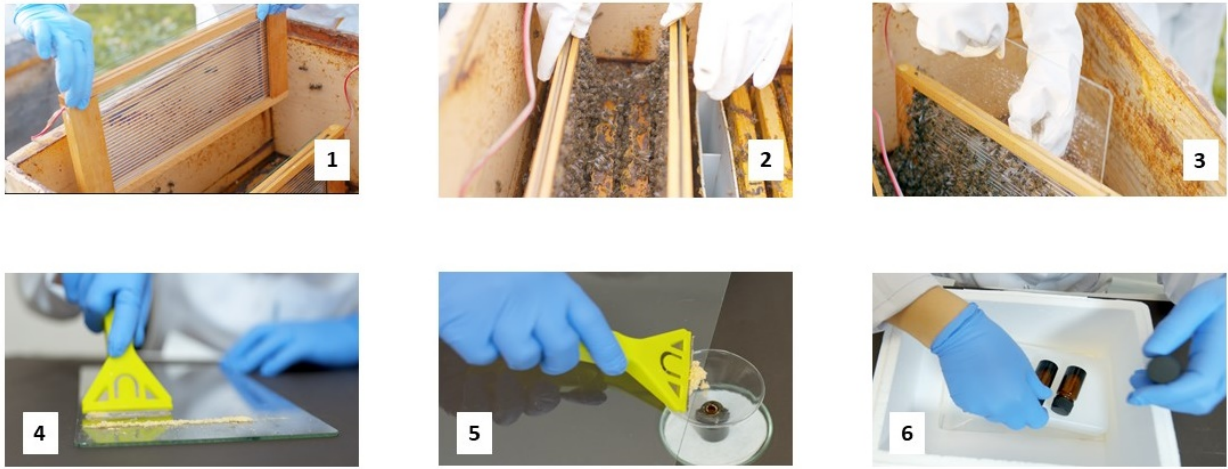
Depolama Koşulları

Zehir bileşenlerinin bozunması proteazların varlığına bağlı olarak otoliz yoluyla gerçekleşir. Bozunma hızı düşük sıcaklıkta vakumlu dondurarak kurutma (liyoofilizasyon) yöntemi kullanılarak düşürülebilir (Graaf vd., 2020). Liyoofilizasyon yöntemi Krell (1996) ve Ali (2012) tarafından bal arısı zehrini depolamanın en güvenli yolu olarak önerilmiştir. Liyoofilize arı zehri, içerisindeki oksidasyona sebebiyet verebilecek maddeler uzaklaştırıldığı için, daha karardır. Liyoofilize arı zehrinde safsızlıkların tespit edilmesi daha kolaydır ve taşıma olasılığı daha azdır. Graaf vd., (2020) depolama süresini ay bazında uzatmak amacı ile kuru zehir ve zehir ekstraktını çok iyi kapatılmış amber şişelerde -80°C'de depolama koşullarını önermiş, liyoofilize zehir numunelerinin altı aya kadar -20°C'de veya bir yıl -80°C'de dondurularak depolanabileceğini öne sürmüştür.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan önceki araştırmalar değerlendirildiğinde bal arısı zehri içeriği ve kalitesinin birçok farklı faktöre bağlı olarak değişebileceği görülmüştür. Doğru bal arısı zehri üretimi; standardize edilmiş arı zehri toplama cihazı, doğru uygulama teknikleri, doğru koloni yönetimi ve bakımı, hijyenik şartlarda üretim ve doğru depolama yöntemleri ile yapılabilir (Şekil 1).

DERLEME / REVIEW



Şekil 1. Bal arısı zehri hasadı; 1: Bal arısı zehri toplama cihazının kovana yerleştirilmesi, 2: Cihazın uygulama sonrası arılar tarafından sarılmış aktif hali, 3: Üzeri zehir kaplı cam tablanın kovandan alınması, 4: Zehrin kazınması, 5: Zehrin amber renkli cam şişeye aktarılması, 6: Zehrin ana depolama hattına aktarımında kullanılan soğuk zincir kutusuna konulması. (Fotoğraflar Düzce Üniversitesi İletişim Birimi tarafından çekilmiştir)

Figure 1. Honey bee venom harvesting and materials used; 1: Placing the honey bee venom collector in the hive, 2: The active state of the device wrapped by the honey bees after the application, 3: Collecting the venom covered glass plate from the hive, 4: Scraping the venom, 5: Transferring the venom to the amber colored glass bottle, 6: Placing the amber glass bottle into the cold chain box which will be used for transferring the venom to the main storage line (Photos were taken by Düzce University Public Relation Unit).

En önemli olan kısım ise arıcılarımızın bakanlıklar ve üniversitelerin ortaklaşa hazırladıkları eğitimlere katılarak doğru üretim tekniklerini uygulamaya geçmeleridir. Türk Standartları Enstitüsünün sunduğu Bal Arısı Zehri Standartları baz alınarak yapılan araştırmalar ışığında Anadolu bal arısı zehri üretimi, içeriği, analizi ve depolama koşulları standardize edilmeli, ayrıca zehir kalitesine bağlı kalite kategorizasyonu oluşturulmalıdır. Bu sebeple bakanlık yetkilileri ve akademisyenlerden oluşan komisyonlar ile üretim hususundaki kurallar ve gereklilikler üzerine çalışılmalı ve en kısa zamanda Bal Arısı Zehri Üretimi Tebliği yayınlanmalıdır. Tüm bunların yanı sıra Anadolu’da üretilen bal arısı zehri ile ilgili gerek üretim gerekse içerik analizleri açısından ayrıntılı çalışmalar yapılarak Anadolu arı zehri standartları oluşturulmalıdır.

Yazar Katkıları: Tuğçe ÇAPRAZLI: Literatür tarama ve yazım, Meral KEKEÇOĞLU: Metnin düzenlenmesi ve kontrolü.

KAYNAKLAR

- Abdela N, Jilo K. 2016. Bee venom and its therapeutic values: a review. *Advances in Life Science and Technology*, 44:18–22.
- Abusabbah, M., Hong Lau, W., Mahmoud, MEE., Salih, AM., Omar, D. 2016. Prospects of using carbohydrates as supplemented-diets and protein rich mixture as alternative-diet to improve the quality of venom produced by *Apis cerana* L. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 4(3): 23–26.
- Ali, M. 2012. Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 1(2): 1–15.
- Bachmayer, H., Kreil, G., Suchanek, G. 1972. Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: Patterns observed during maturation. *Journal of Insect Physiology*, 18(8): 1515–1521. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(72\)90230-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(72)90230-2).
- Badawy, EAMA., ElBassiony, MN., Mahfouz, HM., Abou El-Enain, HT. 2016. Effect of Some Types of Protein Nutrition on the Productivity

- of Honey Bee Venom. *Sinai Journal of Applied Sciences*, 5(3): 385–392. <https://doi.org/10.21608/sinjas.2016.78660>.
- Bahreini, R., Fakhimzadeh, K., Nowzary, J., Nehzati, GA. 2000. Design and construction of a venom collecting electric cage and its effects on honey production in honeybee colonies. *Iranian J. Agr. Sc.*, 31(2): 333–339.
- Bellik, Y. 2015. Bee Venom: Its Potential Use in Alternative Medicine. *Anti-Infective Agents*, 13(1), 3–16. <https://doi.org/10.2174/2211352513666150318234624>.
- Benton, AW., Morse, RA., Stewart, JD. 1963. Venom collection from honey bees. *Science*, 142(3589): 228–230. <https://doi.org/10.1126/science.142.3589.228>.
- Benton, AW., Morse, RA. 1968. Venom toxicity and proteins of the genus *Apis*. *J. Apic. Res.*, 7(3): 113–118.
- Bogdanov, S. 2015. Bee venom: Composition, health, medicine: A review. *Peptides*, 1: 1–20.
- Bogdanov, S. 2016. Bee venom: Production, composition, quality. In: The bee venom book, Chapter 1, Bee product science. Muehlethurnen, Switzerland. Retrieved from May 2017. <http://www.bee-hexagon.net/venom/production-composition-quality/>
- Brandeburgo, MAM. 1992. A safe device for extracting venom from honey bees. *Bee World*, 73:3, 128–130, DOI: 10.1080/0005772X.1992.11099126.
- El-Bassiony, MN., Mahfouz, HM., Abou El-Enain, HT., Badawy, EA. 2016. Study some factors which affecting of increase secretion of honey bee worker venom gland. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 7(8): 541–547. <https://doi.org/10.21608/jppp.2016.51219>.
- Fakhim, ZK. 1998. Improved device for venom extraction. *Bee World*, 79(1): 52–56.
- Ferreira Junior, RS., Sciani, JM., Marques-Porto, R., Lourenço, AJ., Orsi, RDO., Barraviera, B., Pimenta, DC. 2010. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, 56(3): 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.023>.
- Gajski, G. ve Garaj-Vrhovac, V. 2009. Radioprotective Effects of Honeybee Venom (*Apis mellifera*) Against 915-MHz Microwave Radiation–Induced DNA Damage in Wistar Rat Lymphocytes: In Vitro Study *International Journal of Toxicology*, 28(2): 88–98. DOI: 10.1177/1091581809335051.
- Galuszka, H. 1972. The research on a most effective method of the collection of bee venom by means of electric current. *Zoologica Pol.* 22(12): 53–69.
- Genç, F., Cengiz, MM. 2019. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) Anatomisi, genetik ve ıslahı ile ana arı yetiştiriciliği. Doç. Dr. Atilla ATİK (Ed.). Çankaya / Ankara: Gece Kitaplığı. ISBN: 978-605-288-857-5.
- Gençay Çelemlı, Ö. 2018. Türkiye’de Hızla Büyüyen Sektör: Arı Ürünlerine Genel Bir Bakış. Bölüm 3- Arı Ürünleri II, Kısım 2. Arı Zehiri syf; 84-87. Aslı Özkök (Editor). Ankara: Palme Yayın Dağıtım 2018, pp.208. ISBN: 978-975-491-463-4.
- Graaf, DC., Brochetto Braga, MRB., Magalhães de Abreu, RM., Blank, S., Bridts, CH., De Clerck, LS., Devreese, B., Ebo, DG., Ferris, TJ., Hagendorens, MM., Justo Jacomini, DLJ., Kanchev, I., Kokot, ZK., Matysiak, J., Mertens, C., Sabato, V., Van Gasse, AL., Van Vaerenbergh, M. 2020. Standard methods for *Apis mellifera* venom research. In V. Dietemann, P. Neumann, N. L. Carreck, & J. D. Ellis (Eds.) *Journal of Apicultural Research*. 3(2):1–31. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801073>.
- Haggag, SI., Abed Al-Fattah, MA., Ewies, MA., El-feel, MA. 2015. Effect of honeybee venom collection from different races on honey area. *Academic Journal of Entomology*, 8(4): 190–192. <https://doi.org/10.5829/idosi.aje.2015.8.4.10242>.
- Han, SM., Lee, KG., Yeo, JH., Kweon, HY., Woo, SO., Lee, ML., Lee, MY., Kim, CG. 2007. Device for collecting bee venom. WIPO Patent WO2007037566A1, 5 Nisan 2007.
- Hussein, A., El-Ansari, M. Zahra, A. 2019. Effect of the Honeybee Hybrid and Geographic Region on the Honey Bee Venom

DERLEME / REVIEW

- Production. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 10(3): 171–176. <https://doi.org/10.21608/jppp.2019.40922>.
- Hwang, DS., Kim, SK. Bae, H. 2015. Therapeutic Effects of Bee Venom on Immunological and Neurological Diseases. *Toxins*, 7:2413–21.
- Kasozi, K.I., Niedbała, G., Alqarni, M., Zirintunda, G., Hetta, HF., Mbiydzonyuy, NE., Batiha, GE. 2020. Bee venom a potential complementary medicine candidate for SARS-CoV-2 infections. 8(December). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.594458>.
- Kekeçoğlu, M., Çaprazlı, T., Samancı, T., Tanuğur Samancı, AE., Yorulmaz Önder, E. 2021. Quality affecting factors on honeybee venom. Under-review status.
- Kim, H., Park, S. Lee, G. 2019. Potential Therapeutic Applications of Bee Venom on Skin Disease and Its Mechanisms: A Literature Review. *Toxins*, 11(374): 2–29.
- Kokuludağ, A. 2015. Arı Ürünleri ve Sağlık (Apiterapi). Bölüm 21- Arı Zehiri İçeriği ve Tıbbi Özellikleri. Banu Yücel ve Eren Akçiçek (Editor). syf. 147–172. Sidas Medya Ltd. Şti- İzmir. ISBN: 978-605-5267-26-1.
- Krell, R. 1996. Value-added products from beekeeping. SAO Agricultural Services Bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Krivtsov, N. ve Lebedev, V. 1995. The Bee Products. Editing House, Niwa Niwa, Russia.
- Kumar, NR., Devi, A. 2014. A study on biochemical composition of the sting gland (poison gland) and the reservoir (poison sac) of the dwarf honey bee *Apis florea* F. workers. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(1): 101–105. <https://doi.org/10.31018/jans.v6i1.382>.
- Kumar, NR., Devi, A., Kriti, H., Kriti, N. 2014. Comparative Biochemical Studies on the Poison Glad and Poison Sac of the Worker Bees of Three Different *Apis* Species (*Apis dorsata*, *Apis mellifera* and *Apis florea*). *International Journal of Therapeutic Applications*, 16: 8–16.
- Kokot, Z. J., Matysiak, J. 2009. Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LCDAD. *Chromatographia*, 69 (11-12), 1401- 1405.
- Lee, JD., Kim, SY., Kim, TW., Lee, SH., Yang, HI., Lee, DI., Lee, YH. 2004. Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *American Journal of Chinese Medicine*, 32(3): 361–367. <https://doi.org/10.1142/S0192415X04002016>.
- Li, J K. 2000. Technology for royal jelly production. *Am. Bee J.* 140(6): 469–472.
- Lima, WG., Brito, JC. M., da Cruz Nizer, WS. 2020. Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2). *Phytotherapy Research*, 743–750. <https://doi.org/10.1002/ptr.6872>.
- Markovic, O., Molnar, L. 1954. Isolation and determination of honey bee poison. *Chemické Zvesti*, 8: 80–98.
- Maulana, E., Nurussa'Adah, Wardana, AK., Khuzain, M., Prasetyo, G., Anwarudin, ME. 2018. Bee venom harvesters device integrated with solar cell. *Electrical Power, Electronics, Communications, Controls and Informatics Seminar, EECCIS 2018*, 123–126. <https://doi.org/10.1109/EECCIS.2018.8692802>.
- Miao, XQ. 1983. Investigation on the collection of honeybee venom using an electrical shock apparatus. *Journal of Fujian Agricultural College*, 12(4): 323–236.
- Mohanny, KM. 2005. Investigations on propolis and bee venom produced by two Hybrids of honey bee with reference to a new device for bee venom collection. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture EL- Fayoum , Cairo Univ., 134 pp.
- Mohanny, KM. 2015. Different colors of glass plates and their position in the hive for production of bee venom. (Unpublished data) (Son erişim tarihi: 06.04.2021) https://www.researchgate.net/publication/315628564_Different_colors_of_glass_plates_and_their_position_in_the_hive_for_production_of_bee_venom.
- Nobre, AAB. 1990. A device to provoke venom release from honeybees. *Bee world*, 71(4): 151–152. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930512931>.

- Nowar, EE. 2016. Venom glands parameters, venom production and composition of honeybee *Apis mellifera* L. Affected by Substitute Feeding. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5: 596–603.
- Pacakova, V., Štulík, K., Hau, P. T., Jelinek, I., Vinš, I., Sýkora, D. 1995. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, 700 (1), 187–193.
- Oluwaseyi, IG., Alebiosu, EO. 2020. Effect of Melittin and Apamin Co-therapy on the inhibition of coronavirus cell mediated entry- a potential viable management for covid-19. Project: Alternative Epidemic Management Path for Coronaviruses Management, (April). <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12151974>.
- Omar, EM. 2020. Anticipated factors affecting extraction of venom from honey bees colonies by electrical impulses. *Eslam. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 13(4): 213–220.
- Onari, P., Zaluski, R., Bovi, TS., Orsi, RO. 2016. Apitoxin harvest affects population development but not the hygienic behavior of African-derived honey bees. *Sociobiology*, 63(1): 688–692. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v63i1.739>.
- Owen, MD., Braidwood, J. L. 1974. A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.) venom. *Can. J. Zool.*, 52: 387.
- Owen, M.D., Braidwood, J.L., Bridges, A.R. 1977. Age dependent changes in histamine content of venom of queen and worker bees. *J. Insect Physiol.* 23(8): 1031–1035. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90131-7).
- Owen, MD. 1979. Relationship between age and hyaluronidase activity in the venom of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*, 17, 94.
- Owen, MD., Bridges, AR. 1982. Catecholamines in honey bee (*Apis mellifera*) and various vespid (Hymenoptera) venoms. *Toxicon*, 20(6): 1075–1084. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90110-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90110-6).
- Owen, MD., Sloley, BD. 1988. 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L.): Variation with season and with insect age. *Toxicon*, 26(6): 577–581. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90238-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90238-3).
- Owen, MD., Pfaff, LA., Reisman, RE., Wypych, J. 1990. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon*, 28(7): 813–820. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(09\)80004-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(09)80004-4).
- Owen, MD., Praff, AL. 1995. Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*. 33(9): 1181–1188. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00054-P](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00054-P).
- Robson, CH. 1988. Bee venom collection apparatus. U.S. Patent US4,739,531, 26 April 1988.
- Rybak-Chmielewska, H., Szczêsna, T. 2004. Hplc Study of Chemical Composition of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Venom. *Journal of Apicultural Science*, 48(2): 103–109.
- Rybak, M, Muszynska, J, Skubida, P., Marcinkowski, J. 1995. A technology for bee venom collection Pszczelnicze Zeszyty Naukowe. 39(2): 223–231.
- Samancı, T. 2019. Anadolu balarısı (*Apis mellifera anatoliaca*)’ndan doğal olarak elde edilen arı zehirlerinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sanad, RE. Mohanny, KM. 2013. The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects of honeybee colonies. *Journal of American Science*, 9(10): 177–182.
- Serrinha, V., Correia, SD. Marques, G. 2019. Productivity and economic analysis of a new intensive collector in the Portuguese market with implication of open innovation perspective. *J. Open Innov. Technol. Mark. Complex*, 5(3): 1–18. <https://doi.org/10.3390/joitmc5030071>.
- Shaldam, MA., Yahya, G., Mohamed, NH., Abdel-Daim, MM., Al Naggar, Y. 2020. In silico screening of potent bioactive compounds from honey bee products against COVID-19 target enzymes. *ChemRxiv*. Preprint.

DERLEME / REVIEW

- <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.1264410>
2.v1.
- Skubida, P., Muszynska, J., Rybak, M., Marcinkowski, J. 1995. Bee venom collection and its effect on the general output of the apiary and wintering. *Pszczelnicze-Zeszyty-Naukowe*, 39(2): 209–221.
- Somwongin, S., Chantawannakul, P., Chaiyana, W. 2018. Antioxidant activity and irritation property of venoms from *Apis* species. *Toxicon*, 145: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.049>.
- Son, DJ., Lee, JW., Lee, YH., Song, HS., Lee, CK., Hong, JT. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, 115(2): 246–270. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>.
- TSE (Türk Standartları Enstitüsü) (2005); ICS 65.140 Türk Standardı, TS 13126/Ocak 2005.
- Varanda, EA., Tavares, DC. 1998. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J. Venom Anim. Toxins*. 4(1): 5–21. <https://doi.org/10.1590/S0104-79301998000100002>.
- Zhang, W., Wang, X., Yang, S., Niu, Q., Wu, L., Li, Y., Zhou, J. 2019. Simultaneous quantification of five biogenic amines based on LC–MS/MS and its application in honeybee venom from different subspecies. *Biomedical Chromatography*, 34(2): 1–8. <https://doi.org/10.1002/bmc.4740>.
- Zhou, B., Zhang, S., Su, C., Zhou, G., Zhou, BF., Zhang, S., Su, C., Zhou, GH. 2003. Effect of collection of venom by electric shocking on honeybee population, production of royal jelly and honey. *Acta Agriculture Universitatis Jiangxiensis*. 25(1):141-145. <https://europepmc.org/article/cba/366770>.
- Zidan, HAE.-G., Mostafa, ZK., Ibrahim, MA., Haggag, Sl., Darwish, DA., Elfiky, AA. 2018. Venom composition of Egyptian and Carniolan honeybee, *Apis mellifera* L. affected by collection methods. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 11(4): 59–71. 10.21608/EAJBSA.2018.17733.